

## Le rôle des bêta-sécrétases dans la formation de fibres amyloïdes au cours de la mélanogenèse

Leïla Rochin

#### ► To cite this version:

Leïla Rochin. Le rôle des bêta-sécrétases dans la formation de fibres amyloïdes au cours de la mélanogenèse. Biologie moléculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT: 2014PA05T028 . tel-01208143

## HAL Id: tel-01208143 https://theses.hal.science/tel-01208143

Submitted on 30 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





## Université Paris Descartes

## THESE

Ecole doctorale Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie,

### Développement

Spécialité : Biologie Cellulaire Laboratoire / Equipe de recherche

Institut Curie-CNRS UMR144 / Structure et compartimentation membranaire

## Le rôle des bêta-sécrétases dans la formation de fibres amyloïdes au cours de la mélanogenèse

## Par Leïla Rochin

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris Descartes

Dirigée par Guillaume van Niel et Graça Raposo

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Devant un jury composé de :

-Dr. Alexandre Benmerah (Président du Jury)

-Dr. Robert Ballotti (Rapporteur)

-Dr. Marie-Claude Potier (Rapporteur)

-Dr. Thierry Galli (Examinateur)

-Dr. Eric Rubinstein (Examinateur)

-Dr. Ludger Johannes (Examinateur)

-Dr. Guillaume van Niel et Dr. Graça Raposo (Directeurs de thèse)

#### Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les directeurs de cette thèse, Graça Raposo et Guillaume van Niel, de m'avoir accueilli dans leur équipe et de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de l'Institut Curie. Merci à tout les deux pour l'encadrement que vous m'avez prodigué, pour la qualité de vos enseignements et votre disponibilité, et bien sûr pour votre soutien et vos conseils qui m'ont été si précieux tout au long de ma thèse. Merci pour tout ce temps que vous m'avez consacré. Je vous remercie également de la confiance et de la liberté que vous m'avez accordés qui m'ont aidé à gagner en maturité. Merci de m'avoir appris autant sur le métier de chercheur, et de m'avoir encouragé très tôt à présenter mes travaux lors de congrès nationaux (merci de m'avoir fait tant voyager). Merci d'avoir cru en moi.

Je tiens à remercier les membres du jury. Je remercie Alexandre Benmerah qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie Robert Ballotti et Marie-Claude Potier d'avoir accepté d'être rapporteurs, d'avoir évaluer mon travail et d'avoir contribué par leurs commentaires et suggestions à améliorer la qualité de mon manuscrit. Je remercie également Thierry Galli, Eric Rubinstein et Ludger Johannes d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examinateurs.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai travaillé et qui ont contribués à la réussite de cette thèse aussi bien par les discussions que j'ai eues avec eux que par leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements. Je pense bien sûr à tous les membres (les anciens compris) de l'équipe de Graça qui ont été présents tout le long de ma thèse : Léa, Christin, Cédric, Xavier, Anand, Ilse, Maryse, Alessandra, Floriane, Ptissam, Sabrina, Cécile, Francesca, Danièle... Merci à tous pour l'atmosphère positive, l'ambiance générale conviviale et chaleureuse ... parfois « déjantée » (surtout le vendredi), et pour l'environnement scientifique très stimulant. Merci pour tous les beaux moments de partage et les bons souvenirs. Je pense également à toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant ces superbes années passées à l'Institut Curie, avec lesquelles j'ai eu plaisir à discuter et qui ont pris le temps de m'aider et de me conseiller. Mes remerciements vont aussi à Aurélie et Edwige pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie l'Institut Curie en général pour la qualité de son centre de recherche et celle de son personnel qui m'ont permis de travailler dans de bonnes conditions, ainsi que pour la grande attention qui est porté aux jeunes chercheurs (séminaire, retraites, petits déjeuners professionnels...).

Je remercie tous les collaborateurs qui m'ont aidé dans mon projet de recherche: Michael Marks, Brenda Watt, Patrick Keller, Jean-Baptiste Brault, Jacques Neefjes, Pascal Leblanc. Je remercie particulièrement Bart de Strooper de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Louvain, ainsi que Lutgarde Serneels de m'avoir assisté dans mon travail pendant un mois. Un grand merci également à Lionel Larue pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire ainsi qu'à Gwendoline Gros pour sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité pendant ma semaine de travail à Orsay.

Je tiens à remercier Ian Prior pour m'avoir offert l'opportunité de présenter oralement mon projet de thèse au cours d'un congrès sur la Microcopie électronique à Liverpool. Cette expérience a été très enrichissante.

Je souhaite également remercier mon école doctorale, l'université Paris Descartes et la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer pour avoir financé mes études doctorales et permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Enfin, je remercie tous mes proches, qui m'ont toujours encouragés et qui m'ont soutenu tout au long de ces années. Je remercie plus particulièrement mes sœurs et mon frère pour leur présence et ma mère qui a été la première à croire en moi et qui m'a appris à ne jamais baisser les bras.

## Table des matières

ABREVIATIONS9				
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	11			
RESUME / ABSTRACT	13			
INTRODUCTION	15			
PARTIE 1. LA MELANOGENESE	17			
1.1. LES CELLULES PIGMENTAIRES	17			
1.1.1. Les cellules pigmentaires de la peau	17			
1.1.2. Les cellules pigmentaires des yeux	19			
1.2. CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DE LA MELANINE	21			
1.3. BIOCHIMIE DE LA MELANOGENESE	22			
1.3.1. La synthèse de la mélanine	22			
1.3.1.1. L'eumélanogenèse	22			
1.3.1.2. La phéomélanogenèse	22			
1.4. BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DE LA MELANOGENESE	24			
1.4.1. Mélanogenèse et adaptation de la voie d'endocytose	24			
1.4.2. Les organites de la voie d'endocytose	25			
1.4.2.1. Les endosomes précoces	25			
1.4.2.2. Les endosomes tardifs	28			
1.4.3. Les mélanosomes sont des organites spécialisés dans la synthèse de la mélanine	30			
1.4.3.1. Les différents stades de maturation des mélanosomes	30			
1.4.3.2. Les protéines mélanosomales	32			
1.4.3.3. L'origine endosomale des mélanosomes précoces	36			
1.4.3.4. Les mélanosomes sont des organites apparentés aux lysosomesmais sont distincts d	les			
lysosomes	37			
1.4.4. La prémélanogenèse et la formation des mélanosomes	40			
1.4.4.1. PMEL est à l'origine de la formation d'une matrice fibrillaire dans les mélanosomes	40			
1.4.4.2. Les fibres intraluminales de PMEL sont des fibres amyloïdes	43			
1.4.4.3. La fonction des fibres de PMEL	46			
1.4.4.4. Liens entre structure et fonction de PMEL	48			
1.4.4.5. Synthèse, glycosylation et trafic de PMEL	52			
1.4.4.6. Clivage et tri de PMEL	54			
1.4.4.7. Régulation de la fibrillogenèse de PMEL	60			
1.4.5. La mélanogenèse tardive et la maturation des mélanosomes	65			
1.4.5.1. Les mécanismes d'adressage des protéines mélanosomales aux mélanosomes en cour	rs de			
maturation : l'exemple d'AP-1 et de TYRP1	66			
1.4.5.2. Autres modulateurs de l'adressage des protéines mélanosomales	68			
1.4.6. La motilité des mélanosomes	69			
PARTIE 2. CONTEXTE DU TRAVAIL DE THESE	74			
2.1. ANALOGIES ENTRE PMEL ET APP				
2.1.1. Les sécrétases : analogie de clivage entre PMEL et APP	75			
2.1.1.1. Le complexe γ-sécrétase	78			
2.1.1.2. Les α-sécrétases	78			

2.1.1.3. Les β-sécrétases	79
2.1.2. Hypothèse de travail et objectifs	82
RESULTATS	83
PARTIE 1. BACE2 CLIVE PMEL POUR FORMER LA MATRICE FIBRILLAIRE AMYLOÏDE DES MELANOSOMES. DANS L	.ES
CELLULES PIGMENTAIRES	85
1.1. OBJECTIFS	85
1.2. METHODOLOGIES	85
1.3. Resume des resultats	86
1.4. Conclusions	88
1.5. ARTICLE 1 : BACE2 PROCESSES PMEL TO FORM THE MELANOSOME AMYLOID MATRIX IN PIGMENT CELLS	88
PARTIE 2. BACE1B SE LOCALISE AU NIVEAU DE CONTACTS RE-ENDOSOME	
2.1. OBJECTIES	
2.2. METHODOLOGIES	
2.3. Resultats preliminaires	
2.3.1. L'absence de <i>Bace1</i> affecte la prémélanogenèse in vivo	
2.3.2 BACE1 ne clive nas PMEL mais sa déplétion affecte la maturation des mélanosomes et la	
formation des fibres de PMEL	
2.3.3. BACE1B l'isoforme majoritaire dans les MNT1, co-localise et interagit avec VAP-A dans le	RF. 98
2.3.4. BACE1B se localise au niveau de contacts RE-endosomes tardifs dans les HeLa	104
2.4 CONCLUSIONS	109
	105
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	111
1. LA SPECIFICITE DE CLIVAGE DE PMEL PAR BACE2	113
1.1. La spécificité dans la localisation tissulaire	113
1.2. La spécificité dans la localisation subcellulaire	114
1.3. Différence de conformation	114
1.4. La spécificité du site de clivage	115
2. L'IMPLICATION DE BACE2 ET PMEL DANS LA PIGMENTATION	116
2.1. Le rôle de Bace2 dans la pigmentation chez les vertébrés	116
2.2. L'α-MSH, l'hormone de l'eumélanogenèse	117
2.3. MITF, le facteur transcriptionnel clé de la pigmentation	117
2.4. Les souris KO PMEL	118
2.5. La souris Silver et le poulet Dominant White	119
2.5.1. La souris Silver	119
2.5.2. Le poulet Dominant White	119
2.6. Les souris Bace2-/	120
2.7. Polymorphisme de Pmel chez l'homme et pigmentation	121
3. BACE1, RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET PIGMENTATION	121
3.1. BACE1 interagit avec des protéines du RE	122
3.2. Maturation des mélanosomes/ endosomes et lipides	123
4. BACE2 ET PMEL, UN MODELE D'ETUDE POUR LE CLIVAGE DE L'APP PAR BACE1	124
5. Les drogues pour traiter la Maladie d'Alzheimer	125
6. CONCLUSIONS	127
REFERENCES	120
	123
<u>ANNEXES</u>	149

1. SOURCES DES PHOTOS DE LA FIGURE 17	
2. ARTICLE 2 : THE TETRASPANIN CD63 REGULATES ESCRT-INDEPENDENT AND -DEPENDENT ENDOS	OMAL SORTING
DURING MELANOGENESIS	

#### Abréviations

ABC transporteur : transporteurs à ATP Binding Cassette ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase ADN : Acide désoxyribonucléique AICD : APP IntraCellular Domain **AP** : Adaptor protein Aph-1 : anterior pharynx defective-1 APP : Amyloid beta Precursor Protein **APP-CTF** $\beta$  : APP-fragment C-ter  $\beta$ **APPs\beta** : APP soluble  $\beta$ ATP : adénosine-5'-triphosphate **ATP7A** : ATPase copper transporter  $A\beta$  : peptide bêta-amyloïde **BACE1** : β-site of APP Cleaving Enzyme 1 **BSA** : bovine serum albumin **C-ter** : C-terminale CD63 : cluster de différenciation **CMV** : Corps Multivésiculaires **COP II** : coat protein II **CTF** : fragment C-ter DAMP: 3-(2,4-dinitroanillino)-3'-amino-N-methyldipropylamine **DCT** : dopachrome tautomerase DHI: dihydroxyindole **DHICA** : acide dihydroxyindole carboxylique **DTM** : domaine transmembranaire **EEA1** : Early Endosomal Antigen 1 **EGF** : Epidermal Growth Factor ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport GPR 143 : G-protein-coupled receptor 143 HPF : High Pressure Freezing HPS: Hermansky-Pudlak HRP : horseradish peroxidase HRS : Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate **ICD** : domaine intracytoplasmique ILV : vésicules intraluminales KIF13A : kinesin family 13A **KLD** : Kringle-Like Domain KO: knock-out L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine LAMP1 : Lysosomal-associated membrane protein 1 LRO : lysosome related organelle

Myrip : myosin VIIA and Rab interacting protein

 $M\alpha$ : Mature polypeptide alpha

 $M\beta$  : Mature polypeptide bêta

**N-ter** : N-terminal

NTR : N-Terminale Region

OA1: albinisme oculaire de type I

**OCA I** : albinisme oculo-cutané de type I

**ORD** : OSBP-related domain

**ORP1L** : oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 1L

**P1** : precursor 1

**P2** : precursor 2

**PC** : proprotéine convertase

**Pen-2** : presenilin enhancer-2

**PI3P** : phosphatidylinositol-3-phosphate

PKD-1 : Polycystic Kidney Disease associated protein, polycystin 1

**PMEL (Pmel17)** : melanocyte Protein (17)

PS1 : presenilin 1

Rab : Ras-associated binding

**RE** : réticulum endoplasmique

RILP : Rab7-interacting lysosomal protein

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**RPE** : retinal pigment epithelium (EPR, épithélium pigmentaire de la rétine)

**RPT** : repeat domain

s2p : site 2 protease

SILV : Silver

**SNARE** : soluble Nethylmaleimidesensitive facteur (NSF) attachement protein receptors

**TGN** : Trans Golgi Network

TI-VAMP : tetanus-insensitive vesicle associated membrane protein

TYRP1 : tyrosinase related protein 1

UV : ultraviolets

VAMP7 : vesicle associated membrane protein 7

VAP : VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated ER protein

## Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique de l'épiderme humain	18
Figure 2 : Représentation schématique de l'œil et de la rétine	20
Figure 3 : La synthèse de la mélanine	23
Figure 4 : La voie d'endocytose et le système endosomal	27
Figure 5 : Représentation schématique des complexes de la machinerie ESCRT	29
Figure 6 : Les différents stades de maturation des mélanosomes	31
Tableau 1 : Les protéines mélanosomales	35
Figure 7 : La voie mélanosomale	39
Figure 8 : PMEL est à l'origine de la formation d'un réseau fibrillaire	42
Figure 9 : Schéma de la structure des fibres amyloïdes	44
Figure 10 : Formation des fibres amyloïdes	44
Figure 11 : Topologie de PMEL	49
Figure 12 : Fibres formées à partir du domaine PKD de PMEL in vitro	51
Figure 13 : Trafic de PMEL	53
Figure 14 : Clivage de PMEL	56
Figure 15 : Trafic et tri de PMEL	58
Figure 16 : Nucléation des fibres de PMEL à partir des ILV dans les mélanosomes de stade I	59
Figure 17 : Pigmentation chez les modèles animaux mutants Pmel et Pmel-/	62
Figure 18 : Phénotypes associés aux mutations de Pmel et à Pmel-/	64
Figure 19 : Contacts entre intermédiaires tubulaires et mélanosome	67
Figure 20 : L'adressage de TYRP1 via AP-1 et KIF13A	67
Figure 21 : La motilité des mélanosomes dans les mélanocytes de l'épiderme	71
Figure 22 : ORP1L contrôle le positionnement des endosomes tardifs et les contacts RE-endos	omes.
	73
Figure 23 : Le clivage de l'APP	77
Figure 24 : Topologie de BACE1	80
Figure 25 : La prémélanogenèse est affectée chez les souris Bace1-/	91
Figure 26 : Les souris Bace1-/-, Bace2-/- ont un phénotype plus sévère que les souris Bace1-	-/- ou
Bace2-/	94
Figure 27 : BACE1 n'est pas impliquée dans le clivage amyloïdogénique de PMEL	95
Figure 28 : La déplétion de BACE1 affecte la formation des fibres de PMEL	97
Figure 29 : Les différentes isoformes de BACE1	98
Figure 30 : BACE1B est l'isoforme majoritairement exprimée dans les cellules MNT1	99

rigure 31 : Contacts étroits entre RE et mélanosomes précoces dans les cellules MNT1 100
igure 32 : BACE1A se localise dans des compartiments de recyclage dans les cellules MNT1 107
igure 33 : BACE1B co-localise dans le RE avec VAP-A dans les cellules MNT1
igure 34 : BACE1B interagit avec VAP-A dans les cellules HeLa
igure 35 : BACE1B co-localise partiellement avec LAMP1 dans les cellules HeLa
Figure 36 : Le mutant $\Delta ORD$ de Orp1l augmente les contacts RE-endosomes
Figure 37 : BACE1B co-localise avec le mutant $\varDelta$ ORD au niveau des endosomes tardifs dans les
rellules HeLa
igure 38 : Modèle des contacts RE-melanosomes 108
Figure 39 : Modèle comparatif PMEL/APP 12 $\epsilon$

#### Résumé / Abstract

Dans l'épiderme, les mélanocytes participent à la protection de la peau contre les rayons ionisants du soleil en synthétisant un pigment, la mélanine, dans des compartiments apparentés aux lysosomes appelés melanosomes. La mélanogenèse est un processus séquentiel initié par la production de fibres amyloïdes dont la composante principale est la protéine PMEL. Ces fibres séquestrent la mélanine et permettent l'élimination d'intermédiaires toxiques produits lors de sa synthèse. La mélanogenèse et le phénotype pigmenté sont affectés lorsque le processus de formation des fibres est altéré. Les fibres résultent du clivage de PMEL dans les endosomes précurseurs des mélanosomes mais les protéases impliquées dans ce processus restent peu ou pas caractérisées. Afin de mieux comprendre les mécanismes de formation des fibres amyloïdes dérivées de PMEL, j'ai étudié le rôle de deux protéases : les bêta-sécrétases BACE1 et BACE2. En combinant des techniques de biochimie, d'immunocytochimie et d'imagerie photonique et électronique, j'ai montré que la perte de l'expression de Bace2 in vivo (souris KO BACE2) ou sa déplétion (siRNA) dans une lignée de mélanocytes inhibent le clivage amyloïdogénique de PMEL et affectent à la fois la formation de fibres de PMEL dans les mélanosomes et la pigmentation. J'ai pu notamment reproduire *in vitro* le clivage spécifique de PMEL en utilisant une forme recombinante de BACE2. En parallèle, j'ai également étudié le rôle de BACE1 dans la mélanogenèse. Mes résultats indiquent que BACE1, bien que n'étant pas impliquée dans le clivage de PMEL, régulerait la maturation des mélanosomes précoces in vivo et in cellulo, en modulant les contacts entre mélanosomes et réticulum endoplasmique (RE). Dans les mélanocytes, BACE1 est présente dans le RE et interagit avec des protéines impliquées dans les contacts RE-endosomes. Ces contacts seraient cruciaux pour le transfert de molécules nécessaires à la maturation des mélanosomes. L'ensemble de ces résultats démontre un rôle pour chacune des bêta-sécrétases dans le processus de mélanogenèse, levant le voile sur des processus clés liés à la biogenèse des mélanosomes. Par ailleurs, les fibres de PMEL constituant le modèle le plus abouti de l'amyloïdogenèse physiologique chez les mammifères, ces études pourraient à plus long terme aider à la compréhension de la formation des fibres amyloïdes pathologiques; notamment dans la maladie d'Alzheimer où l'amyloïdogenèse d'APP est très similaire à celle de PMEL.

Mot clés : Mélanogenèse, mélanocytes, mélanine, mélanosomes, PMEL, BACE, fibres amyloïdes

In the epidermis, melanocytes synthetize a pigment called melanin, in lysosome-relatedorganelles called melanosomes, in order to protect the skin against the ionizing radiations of the sun. Melanogenesis is a sequential process initiated by the formation of amyloid fibrils whose principal component is the protein PMEL. Those fibrils sequester the melanin pigment and allow the removal of toxic intermediates formed during its synthesis. Melanogenesis and the pigmented phenotype are affected when the process of fibrils formation is altered. Fibrils come from the processing of PMEL in endosome precursors of melanosomes but the proteases implicated in this process are not well characterized. In order to better understand the mechanisms implicated in the formation of the PMEL amyloid fibrils, I studied the role of two proteases: the beta-secretases BACE1 and BACE2. Using a combination of biochemical, immunocytochemical methods and photonic and electronic imaging, I have shown that the loss of Bace2 expression in vivo (BACE2 KO mice) or its depletion (siRNA), in a melanocyte cell line, inhibit the amyloidogenic processing of PMEL and affect both the formation of the PMEL fibrils in melanosomes and pigmentation. I could reproduce in vitro the specific cleavage of PMEL by using a recombinant form of BACE2. In parallel, I have also studied the role of BACE1 in melanogenesis. My results indicate that BACE1, even though it is not implicated in PMEL processing, could regulate the maturation of early melanosomes in vivo and *in cellulo*, by modulating the contacts between melanosomes and endoplasmic reticulum (ER). In melanocytes, BACE1 is present in the ER and interacts with proteins implicated in ER-endosomes contacts. Those contacts would be crucial for the transfer of molecules that are necessary for melanosome maturation. All together those results demonstrate the role of both beta-secretases in melanogenesis, and reveal key processes involved in melanosome biogenesis. Moreover, because PMEL fibrils are the most completed model of physiological amyloidogenesis in mammals, theses studies could help in the future the understanding of the formation of pathological amyloid fibrils; in particular in the Alzheimer's disease where the amyloidogenesis of APP is very similar to the one of PMEL.

Keywords : Melanogenesis, melanocyte, melanin, melanosomes, PMEL, amyloid fibrils

# **INTRODUCTION**

#### INTRODUCTION

## PARTIE 1. La mélanogenèse

La mélanogenèse est l'ensemble des processus biochimiques, moléculaires et cellulaires, permettant la synthèse de la mélanine dans les cellules pigmentaires. La mélanine est le pigment responsable de la couleur de la peau et des yeux chez les vertébrés, mais également des poils chez les mammifères et des cheveux chez l'homme (Slominski et al., 2004).

1.1. Les cellules pigmentaires

#### 1.1.1. Les cellules pigmentaires de la peau

Chez l'homme, la peau est composée de trois couches : l'épiderme (la plus superficielle), le derme (la couche intermédiaire), et l'hypoderme (la plus profonde). Interagissant avec le milieu extérieur, l'épiderme est essentiellement constitué de cellules appelées kératinocytes (90 à 95%). Les cellules pigmentaires de la peau, les mélanocytes, sont situées dans la couche basale de l'épiderme. Les mélanocytes représentent 5 à 10% des cellules de l'épiderme. Les mélanocytes possèdent des prolongements dendritiques leur permettant d'entrer en contact avec plusieurs kératinocytes. Un seul mélanocyte peut entrer en contact avec une quarantaine de kératinocytes, formant ainsi l'unité épidermique de mélanisation (Fitzpatrick and Breathnach, 1963). La mélanine produite par les mélanocytes est contenue dans des organites, appelés mélanosomes, qui sont transférés aux kératinocytes (Van Den Bossche et al., 2006) (Figure 1). Une fois transférés, les mélanosomes se placent autour des novaux des kératinocytes afin de protéger leur matériel génétique des rayons UV (ultraviolets) du soleil. Sous l'influence de ces rayons UV, les mélanocytes augmentent leur synthèse de mélanine. A trop forte dose, les UV sont très nocifs et peuvent induire des lésions et des mutations de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) à l'origine de cancers de la peau (Brenner and Hearing, 2008). Les cancers de la peau les plus fréquents dérivent des kératinocytes ; ils sont appelés carcinomes. Les cancers de la peau dérivés des mélanocytes sont plus rares mais plus agressifs ; ils sont appelés mélanomes.

Tous les vertébrés possèdent les trois couches épiderme - derme- hypoderme ; cependant l'épiderme des mammifères se distingue par la présence de poils. Les poils (et cheveux) se

forment dans le follicule pileux qui est une invagination de l'épiderme. Les poils se composent majoritairement de kératinocytes et se forment au niveau du bulbe (partie basale du follicule). Les kératinocytes remontent le long du follicule et durcissent (kératinisation) pour former le poil. Les mélanocytes, situés à la base du poil dans le bulbe, assurent la pigmentation des poils par transfert de la mélanine aux kératinocytes (Slominski et al., 2005). L'homme fait parti des rares mammifères à posséder une peau quasiment « nue » (avec les mammifères marins) ; la majorité des mammifères étant recouvert de poils. A titre de comparaison, l'épiderme de la souris est peu pigmenté, par rapport à celui de l'homme, car les mélanocytes résident essentiellement dans les follicules pileux.



*Figure 1 : Représentation schématique de l'épiderme humain.* 

Chez l'homme, les mélanocytes de la peau sont localisés à la base de l'épiderme (ainsi que dans le bulbe pilaire). Les mélanocytes ont pour rôle de synthétiser la mélanine, qu'ils transfèrent aux kératinocytes voisins via des organites appelés mélanosomes. Un seul mélanocyte peut entrer en contact avec une quarantaine de kératinocytes, formant ainsi l'unité épidermique de mélanisation.

#### 1.1.2. Les cellules pigmentaires des yeux

L'œil est composé de différentes membranes, parmi lesquels figurent la choroïde, l'iris et la rétine (Figure 2). La mélanine est synthétisée dans les mélanosomes des cellules pigmentaires de la choroïde, et des épithéliums pigmentaires de la rétine (EPR), du corps ciliaire et de l'iris (Schraermeyer and Heimann, 1999). Dans les yeux, les mélanosomes ne sont pas transférés mais retenus dans les cellules pigmentaires. Le rôle de la pigmentation dans les yeux a surtout été étudié au niveau de la rétine. La rétine se compose de différentes couches, la plus externe est celle des photorécepteurs (neurones sensoriels capables de traduire le signal lumineux en influx nerveux) qui est apposée à l'EPR (Figure 2). Les mélanosomes présents dans l'EPR sont impliqués dans la fonction rétinienne (vision), ils absorbent et concentrent la lumière dans l'œil (Futter, 2006). Le segment externe des photorécepteurs est quotidiennement phagocyté et digéré par les cellules de l'EPR (Futter, 2006). Cette phagocytose induit la formation d'organites appelés phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes pour dégrader leur contenu. Les mélanosomes de l'EPR peuvent fusionner temporairement avec les phagosomes, probablement pour capturer les radicaux libres provenant de l'oxydation des membranes des photorécepteurs qui ont été internalisés par les phagosomes (Marmorstein et al., 1998).

Dans la peau, la formation des mélanosomes et la synthèse de la mélanine se déroulent tout au long de la vie. Dans l'EPR, la majorité de la mélanine est synthétisée au cours de la période embryonnaire et au début de la vie post-natale (Lopes, Wasmeier, et al., 2007).



#### Figure 2 : Représentation schématique de l'œil et de la rétine.

Dans l'œil les cellules pigmentaires sont localisées dans la choroïde, l'iris, le corps ciliaire et la rétine. La rétine, se compose de différentes couches de cellules neuronales (cellules ganglionnaire, bipolaires) dont les photorécepteurs qui sont capables de traduire le signal lumineux en influx nerveux. Les cellules pigmentaires de la rétine sont localisées au niveau d'un épithélium situé en dessous des photorécepteurs. La mélanine est synthétisée dans les mélanosomes qui ont pour rôle de concentrer la lumière dans la rétine et qui participent à la capture des radicaux libres issus de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs.

#### 1.2. Caractéristiques et propriétés de la mélanine

D'un point de vue étymologique, le mot mélanine est composé de l'élément *mélan*-, du grec ancient *melas* « noir » et du suffixe *-ine*. Ce terme semble avoir été utilisé pour la première fois dans le contexte de la pigmentation des mammifères, dans les années 1830-40 (Spiegel-Adolf, 1937). Dans la peau, il existe en fait deux types de mélanine représentés par l'eumélanine (préfixe grec *eu* pour « bon, vrai ») et la phéomélanine (préfixe phéo, du grec *phaios* pour « *foncé* »). L'eumélanine est un biopolymère insoluble de couleur brun/noir et la phéomélanine est un biopolymère soluble de couleur jaune/orange (malgré son sens éthymologique) (Wakamatsu and Ito, 2002).

Chez l'homme, quelle que soit l'intensité de la pigmentation de la peau, la proportion de mélanocytes par rapport aux kératinocytes est toujours constante ; bien que leur densité ne soit pas la même sur toutes les région du corps (par exemple, elle est faible sur la paume des mains). Ce n'est pas le nombre mais l'activité des mélanocytes (c'est à dire la quantité de mélanine synthétisée et transférée) et le type de mélanine majoritairement synthétisé qui déterminent la couleur de la peau. Les mélanocytes des peaux noires sont très actifs et synthétisent en majorité un pigment foncé (eumélanine), alors que ceux des peaux claires sont moins actifs et synthétisent en majorité un pigment clair (phéomélanine) (Thong et al., 2003).

La mélanine synthétisée dans les yeux est en majeure partie de type eumélanine. Chez l'homme, c'est la quantité d'eumélanine présente dans l'iris qui détermine la couleur des yeux (Prota et al., 1998; Wielgus and Sarna, 2005). Plus il y a de mélanine dans l'iris, plus les yeux sont foncés. En plus de ses propriétés colorantes naturelles, la mélanine possède des propriétés optiques. Elle absorbe les rayons de longueurs d'onde allant des UV jusqu'au domaine du visible. La mélanine en absorbant les rayons UV (effets mutagènes), assure donc la protection naturelle de la peau. L'eumélanine est très efficace pour protéger la peau du soleil, c'est pourquoi les cancers cutanés induits par le soleil sont très rares chez les individus à peau noire. Inversement, la phéomélanine n'a que peu (voire pas) d'effet photoprotecteur et le risque de développer un mélanome est plus élevé chez les personnes à peau claire (Fitzpatrick, 1986; Kadekaro et al., 2003; Kvam and Tyrrell, 1997; Pathak, 1991). Enfin, des études ont montré que la mélanine pouvait avoir des propriétés antioxydantes en capturant les radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène ou ROS) (Korytowski et al., 1986; X. Zhang et al., 2000). Ces radicaux libres, qui peuvent être induits par les UV, sont délétères pour les cellules (lésions de l'ADN). Les mélanosomes de l'EPR, notamment, seraient dédiés à la séquestration des radicaux libres (Rozanowska et al., 1999). Cependant, d'autres études ont montré de manière contradictoire que la mélanine pouvait former des radicaux libres sous l'action des UV. Il semblerait que les responsables de cette formation de radicaux libres soient surtout les intermédiaires de la mélanine (voir plus bas) et la phéomélanine (Kvam and Tyrrell, 1999; Wenczl et al., 1998).

#### 1.3. Biochimie de la mélanogenèse

#### 1.3.1. La synthèse de la mélanine

La mélanine est le produit final d'un processus biochimique complexe. La biosynthèse de mélanine est initiée soit par l'hydroxylation de L-phényalanine en L-tyrosine, soit directement à partir de L-tyrosine. La L-tyrosine est ensuite hydroxylée en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). La L-DOPA sert de précurseur à la formation de mélanine. L'étape d'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone est commune à la formation d'eumélanine et de phéomélanine (Slominski et al., 2004; N. Wang and Hebert, 2006) (Figure 3).

#### 1.3.1.1. L'eumélanogenèse

Elle requiert une étape de transformation de la dopaquinone en dopachrome. Le dopachrome, par une série de réactions, est transformé en dihydroxyindole (DHI) et en acide dihydroxyindole carboxylique (DHICA). Le DHI est oxydé en indole-5,6-quinone et le DHICA en acide indole-5,6-quinone carboxylique. L'eumélanine est un polymère fortement hétérogène (hétéropolymère ou copolymère), formé à partir des intermédiaires DHI et DHICA oxydés (liés par des liaisons carbones-carbones) (Figure 3). L'eumélanine peut se lier à des protéines par des liaisons co-valentes (Slominski et al., 2004; N. Wang and Hebert, 2006).

#### 1.3.1.2. La phéomélanogenèse

Elle débute par l'ajout de cystéine à la dopaquinone pour former la cystéinyldopa, qui est ensuite transformée en phéomélanine (Figure 3). Elle peut lier des composant chimiques et des médicaments (Slominski et al., 2004; N. Wang and Hebert, 2006).

La dopaquinone, le DHI, le DHICA et la phéomélanine peuvent être à l'origine d'attaques oxydatives (radicaux libres) (Kvam and Tyrrell, 1999; Wenczl et al., 1998).



#### Figure 3 : La synthèse de la mélanine.

Elle débute par l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA (catalysée par l'enzyme Tyrosinase) qui est le précurseur de la synthèse de la mélanine. L'étape d'oxydation de la DOPA en dopaquinone (catalysée par l'enzyme Tyrosinase) est commune à la formation d'eumélanine et de phéomélanine. (1) La synthèse d'eumélanine requiert une étape de transformation de la dopaquinone en dopachrome qui est ensuite transformé en DHI et en DHICA (sous l'action de l'enzyme TYRP2/ DCT). Le DHI et le DHICA, qui sont oxydés en indole-5,6-quinone et en acide indole-5,6-quinone carboxylique (respectivement), s'associent pour former l'eumélanine (sous l'action des enzymes Tyrosinase et TYRP1, respectivement). (2) La synthèse de la phéomélanine débute par l'ajout de cystéine à la dopaquinone pour former la cystéinyldopa qui est ensuite transformé en phéomélanine (adapté de Wang N. et Hebert DN., 2006).

#### 1.4. Biologie cellulaire et moléculaire de la mélanogenèse

Pour synthétiser et stocker la mélanine les cellules pigmentaires produisent des organites appelés mélanosomes. Cette séquestration de la mélanine à l'intérieur du mélanosome protège les composants du cytosol (et les autres organites) d'attaques oxydatives par les intermédiaires de la mélanine (Kobayashi et al., 1994). Dans le cas de la peau, cette séquestration facilite le transfert de la mélanine depuis les mélanocytes vers les kératinocytes (Van Den Bossche et al., 2006).

La pigmentation résulte d'une production mixte d'eumélanine et de phéomélanine dans les mélanosomes. Le ratio eumélanine /phéomélanine est dépendant de la disponibilité en cystéines dans les mélanosomes ; ces cystéines sont le facteur limitant de la production de phéomélanine (voir plus haut). Un faible taux de cystéines dans les mélanosomes favorise la synthèse d'eumélanine (Ito and Wakamatsu, 2008). Les mélanosomes composés principalement d'eumélanine sont appelés eumélanosomes et ceux composés principalement de phéomélanine sont appelés phéomélanosomes. Ces derniers sont encore peu caractérisés et ils diffèrent des eumélanosomes en structure et en composition, c'est pourquoi leur formation ne sera pas abordée dans cette thèse qui se focalisera uniquement sur l'eumélanogenèse (Furumura et al., 1998).

#### 1.4.1. Mélanogenèse et adaptation de la voie d'endocytose

Dans les cellules eucaryotes, la voie d'endocytose est essentielle à l'apport de nutriments, au contrôle des voies de signalisation et à la dégradation de macromolécules. La voie d'endocytose se compose de réseaux d'organites et de sous-domaines membranaires dont les principales structures sont les endosomes (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009; Gruenberg, 2001). Placés au carrefour des voies d'endocytose, de biosynthèse et de dégradation, les endosomes établissent une véritable plateforme de tri moléculaire. Les endosomes dits précoces se composent de domaines vacuolaires et tubulovésiculaires et ont pour rôle le recyclage et le tri de molécules. Ces endosomes précoces maturent ensuite en endosomes tardifs plus communément appelés Corps Multivésiculaires (CMV). Les CMV, ainsi formés, se différencient des endosomes précoces et s'individualisent dans la voie d'endocytose. Ils ont pour rôle principal la dégradation de macromolécules après lur fusion avec les lysosomes. Certaines cellules spécialisées exploitent le système endosomal pour créer des organites aux caractéristiques morphologiques uniques et assurer leurs fonctions spécifiques. Dans le cas des cellules pigmentaires, cette adaptation de la voie d'endocytose aboutit à la formation du

mélanosome, l'organite dédié à la synthèse et au stockage de la mélanine (Hearing, 2005; Marks and Seabra, 2001).

#### 1.4.2. Les organites de la voie d'endocytose

Les protéines et autres macromolécules, qui sont internalisés depuis la membrane plasmique par divers mécanismes d'endocytose (dépendant de la clathrine, indépendant de la clathrine, etc.), se retrouvent au niveau de compartiments qualifiés d'abord d'endosomes précoces puis d'endosomes tardifs. Cette qualification est basée sur l'accessibilité de ces différents compartiments à des « traceurs » (dextran, HRP [horseradish peroxidase], BSA [bovine serum albumin] etc.) et sur le temps d'internalisation des ligands depuis la surface cellulaire via des récepteurs (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009; Gruenberg, 2001; Maxfield and McGraw, 2004).

#### 1.4.2.1. Les endosomes précoces

Les endosomes précoces ou endosomes de tri sont la plateforme de tri moléculaire du système endosomal. Ils se composent de domaines tubulaires et vacuolaires, et ont un pH interne d'environ 6. Ils contiennent très peu de vésicules intraluminales (ILV), et sont accessibles aux traceurs dans les 5 à 15 minutes qui suivent leur internalisation (Maxfield and McGraw, 2004). Les marqueurs associés aux membranes des endosomes précoces sont : la petite GTPase Rab5 (Ras-associated binding 5), l'effecteur de Rab5 EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) et le PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate) (Simonsen et al., 1998).

Les différents domaines tubulaires et vacuolaires associés aux endosomes précoces sont définis par leur enrichissement relatif en marqueurs spécifiques, et par la cinétique de trafic de ligands associés à des récepteurs tels que la transferrine et l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Jovic et al., 2010). Ces domaines tubulaires et vacuolaires diffèrent par leur morphologie et leur composition permettant ainsi aux endosomes précoces de ségréger les molécules internalisées en deux voies bien distinctes : le recyclage et la dégradation (Figure 4).

Le recyclage permet un export très dynamique vers la membrane plasmique d'éléments (dits « cargos ») préalablement internalisés (par exemple, le récepteur à la transferrine). Pour ce faire, une portion des cargos internalisés s'accumule à l'intérieur de structures tubulovésiculaires qui émanent des endosomes de tri (Delevoye et al., 2014). Une fois dissociées des endosomes de tri, ces structures tubulovésiculaires vont former une sous population appelée endosome de recyclage. Les cargos qui s'engagent dans cette voie sont très rapidement recyclés vers la surface cellulaire par une voie de recyclage rapide associée à

la petite GTPase Rab4, et par une voie plus lente associée à Rab11 (Stenmark, 2009). Ces endosomes de recyclage peuvent accumuler des cargos jusqu'à 30 minutes après leur internalisation (Maxfield and McGraw, 2004).

En plus du recyclage de cargos vers la membrane plasmique, d'autres tubulations qui émanent des endosomes précoces assurent un transport rétrograde de certains cargos vers des compartiments de la voie de sécrétion tel que l'appareil de Golgi (Bonifacino and Hurley, 2008; Johannes and Popoff, 2008) (Figure 4).

Les domaines vacuolaires des endosomes précoces assurent quant à eux une ségrégation efficace des cargos destinés à être dégradés (par exemple, le récepteur à l'EGF) (Jovic et al., 2010). Ces domaines vacuolaires de tri sont caractérisés par la formation d'un manteau de clathrine plat au niveau de la face cytosolique de leur membrane limitante. Ce manteau de clathrine plat assure la ségrégation des récepteurs destinés à la dégradation du reste de la membrane limitante de l'endosome. Ces domaines se déformeront pour générer dans la lumière du compartiment des vésicules membranaires (intraluminal vesicles ou ILV). Ce processus accompagnera la « maturation » des endosomes de tri en endosomes dits tardifs (Sachse et al., 2002).



Figure 4 : La voie d'endocytose et le système endosomal.

Dans les cellules eucaryotes, les cargos tels que les récepteurs membranaires sont internalisés via les puits recouverts de clathrine qui se forment au niveau de la membrane plasmique. Une fois endocytés, ils se retrouvent dans l'endosome de tri (plateforme de tri moléculaire) où ils peuvent suivre deux destinées majeurs : leur adressage aux endosomes de recyclage pour être renvoyés à la membrane plasmique, ou leur adressage aux CMV (endosomes tardifs) pour être ensuite dégradés dans les lysosomes. Les protéines qui sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique transitent par l'appareil de golgi à partir duquel elles peuvent être adressées à la membrane plasmique ou bien directement aux endosomes. Certaines protéines localisées dans les endosomes peuvent être ré-adressées au réseau trans-golgien par transport rétrograde.

#### *1.4.2.2.* Les endosomes tardifs

Lors de sa maturation en endosome tardif, l'endosome de tri acquiert de nouveau marqueurs membranaires, son pH interne diminue (d'un pH de  $\approx$ 6,2 à un pH de  $\approx$ 5,5) et le nombre de vésicules dans sa lumière augmente. L'accumulation d'ILV confère à l'endosome une morphologie qui caractérise les endosomes tardifs, appelés plus communément CMV (**Figure 4**). Ces vésicules (50-100nm de diamètre), qui se forment par invagination de la membrane limitante de l'endosome de tri dans la lumière de ce dernier, permettent l'exclusion des cargos qui ont été ségrégés au niveau de la membrane limitante. Les CMV matures possèdent des marqueurs lysosomaux associés à leur membrane tels que CD63 (cluster de différenciation 63), LAMP1 et LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein 1), ainsi que des enzymes lysosomales (hydrolases) nouvellement synthétisées. Ils se caractérisent également par un pH compris entre 5 et 6, et sont accessibles aux traceurs 30 minutes après internalisation (Piper and Katzmann, 2007; Sachse et al., 2002; Jovic et al., 2010).

La première étape de formation des ILV est une étape de reconnaissance des cargos par une machinerie de tri appelée machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Cette machinerie est composée de 4 complexes numérotés de 0 à III. La reconnaissance des cargos se fait grâce à la présence d'un motif ubiquitine, au niveau de leur queue cytoplasmique, qui est reconnu par le composant Hrs (Hepatocyte growth factorregulated tyrosine kinase substrate) du complexe ESCRT 0. Hrs est enrichi au niveau de sous domaines membranaires formés par les manteaux de clathrine plats des endosomes de tri. Ce système de reconnaissance assure la bonne ségrégation sur des microdomaines membranaires des récepteurs à trier du reste de la membrane limitante de l'endosome. Brièvement, les autres complexes (ESCRT I, II et III) sont séquentiellement recrutés après la reconnaissance des cargos par le complexe ESCRT 0, ce qui aboutit à l'invagination des sous domaines membranaire et à la formation d'ILV (enrichis en cargos) (Figure 5) - notamment grâce à l'oligomérisation de protéines qui composent la sous-unité ESCRT III. Une fois les cargos accumulés sur les ILV, les CMV matures fusionnent avec les lysosomes assurant une dégradation spécifique de ces cargos grâce aux enzymes lysosomales (Hurley and Hanson, 2010; Raiborg and Stenmark, 2009).

Les mécanismes ESCRT-dépendant impliqués dans la formation des ILV et le tri de cargos ont été initialement décrits chez la levure (Piper and Katzmann, 2007) et sont très largement conservés chez les mammifères. Il existe cependant de nombreuses exceptions. Tous les CMV ne sont pas formés similairement. Certains cargos peuvent être internalisés sans être ubiquitinés et la formation d'ILV peut être initiée par d'autres mécanismes de tri (voie

ESCRT-indépendante). De plus, l'utilisation de machineries de tri ESCRT-indépendantes semble être également associée à la formation de CMV non dégradatifs. En effet, tous les CMV ne sont pas destinés à la fusion avec les lysosomes et à la dégradation. Dans certains types cellulaires, les CMV peuvent également fusionner avec la membrane plasmique pour sécréter leurs ILV dans le milieu extracellulaire ; les vésicules intraluminales sont alors appelées exosomes (Simons and Raposo, 2009). Dans certaines cellules spécialisées, les CMV peuvent également se spécialiser pour former des organites dits apparentés aux lysosomes (LRO pour lysosome related organelle) possédant des propriétés et des caractéristiques uniques. C'est notamment le cas des cellules spécialisées dans la pigmentation, tel que le mélanocyte qui engendre un LRO - le mélanosome - entièrement dédié à la synthèse et au stockage de la mélanine (Turner et al., 1975).



Figure 5 : Représentation schématique des complexes de la machinerie ESCRT.

A la membrane limitante de l'endosome de tri, le cargo ubiquitiné est reconnu par le complexe ESCRT 0 (contenant Hrs) qui recrute d'abord la clathrine puis le complexe ESCRT I. ESCRT I recrute ESCRT II qui par la suite recrute le complexe ESCRT III. Le complexe ESCRT III provoque l'invagination de la membrane limitante de l'endosome et la formation d'ILV chargés en cargos (dont l'ubiquitine a été retirée). (UB : ubiquitine).

#### 1.4.3. Les mélanosomes sont des organites spécialisés dans la synthèse de la mélanine

L'avènement de la microcopie électronique, dans les années 1930, a permis l'émergence dans les décennies qui suivirent de nombreuses études morphologiques sur les compartiments subcellulaires. Ces études morphologiques couplées à des études biochimiques ont permis de décrire et de caractériser le compartiment mélanosomal. Il faut notamment souligner les travaux des docteurs M. Seiji, T.B. Fitzpatrick et M. S. C Birbeck qui ont permis de définir, dès les années 1960, les mélanosomes comme étant des compartiments à la structure et à la fonction uniques, au sein des cellules pigmentaires (Seiji et al., 1961).

La cellule pigmentaire engendre un organite morphologiquement et fonctionnellement unique - le mélanosome - dans lequel s'accumulent les divers éléments nécessaires à la synthèse et au stockage de la mélanine. Le mélanosome se forme en plusieurs étapes, et se pigmente progressivement jusqu'à complète maturation. Dans la peau, le mélanosome mature est transféré des mélanocytes aux kératinocytes pour que la mélanine puisse y jouer son rôle photoprotecteur.

Ces dernières années, l'étude des mélanocytes de patients souffrant de maladies affectant les LRO (et leurs modèles murins) ont permis d'établir de nombreuses hypothèses sur la biogenèse des mélanosomes (Dell'Angelica et al., 2000; Spritz, 1999; Swank et al., 1998). L'identification des gènes qui sont à l'origine de ces maladies et la caractérisation fonctionnelle de leurs produits d'expression ont fortement contribué à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mélanogenèse (Huizing et al., 2008).

#### 1.4.3.1. Les différents stades de maturation des mélanosomes

Les études morphologiques à l'échelle ultrastructurale par microscopie électronique (Hurbain et al., 2008; Raposo et al., 2001) ont montré que la biogenèse des mélanosomes est un processus en plusieurs étapes au cours desquelles un organite précurseur non pigmenté mature en un compartiment pleinement pigmenté. Cette maturation requiert des modifications morphologiques, structurales et fonctionnelles d'intermédiaires endosomaux, ainsi que le transport de protéines cargos. Sur ces critères, quatre stades de maturation (Marks and Seabra, 2001; Seiji et al., 1963) morphologiquement distincts, sont observables :

- le stade I (prémélanosome/ mélanosome précoce), de forme ronde, caractérisé par une absence de pigment et la présence de quelques ILV.

le stade II (prémélanosome/ mélanosome précoce), de forme allongé, caractérisé par l'absence de pigment et la présence de fibres intraluminales.

- le stade III (mélanosome tardif), caractérisé par le dépôt de mélanine sur les fibres aboutissant à leur épaississement et leur assombrissement.

- le stade IV (mélanosome tardif/ mature), dans lesquel le dépôt de mélanine atteint son paroxysme, si bien que les fibres ne sont plus visibles (Raposo and Marks, 2002) (Figure 6).

La formation de mélanosomes dans les cellules pigmentaires des yeux a été moins bien caractérisée, mais des études suggèrent que les mécanismes sont similaires à ceux intervenant dans la peau. Dans l'EPR, les mélanosomes passent aussi par une maturation progressive (d'un précurseur non pigmenté immature à un mélanosome mature). Cependant, la mélanogenèse dans l'EPR intervient principalement avant la naissance et il y a très peu de mélanosomes nouvellement formés chez l'adulte (Lopes, Wasmeier, et al., 2007).

#### Mélanosomes



#### Figure 6 : Les différents stades de maturation des mélanosomes.

Les mélanosomes sont présents sous quatre stades de maturation distincts et reconnaissables en microscopie électronique : les stades I/endosomes de tri caractérisés par la présence d'ILV et de manteaux de clathrine (flèche noire); les stades II, caractérisés par la présence de fibres (flèche noire); les stades III et stades IV, caractérisés par la synthèse et le dépôt de mélanine sur ces fibres (Hurbain et al., 2008). (Barre d'échelle, 200 nm).

#### 1.4.3.2. Les protéines mélanosomales

La plupart des protéines mélanosomales connues sont des protéines transmembranaires qui ne sont exprimées que dans les cellules pigmentaires. Ces protéines mélanosomales sont requises pour la formation, la structure, la maintenance et la fonction des mélananosomes (Raposo et al., 2007).

Des mutations des gènes codant pour ces protéines affectent la couleur de la « robe » de certains animaux et sont la cause d'albinisme chez l'homme se traduisant par une hypopigmentation variable de la peau, des cheveux et/ou des yeux, due à des défauts affectant le nombre, la structure ou la fonction des mélanosomes (D. C. Bennett and Lamoreux, 2003).

Parmi ces protéines mélanosomales, se trouve la protéine structurale PMEL ou Pmel17 (pour melanocyte Protein 17), ou gp100, ou Silver (SILV) chez la souris. PMEL assure la formation d'un réseau fibrillaire ou « matrice fibrillaire » qui débute dans les mélanosomes de stade I et s'achève dans les stades II. Ces fibres intraluminales dérivées de PMEL optimisent la polymérisation et le stockage de la mélanine dans les cellules pigmentaires (Watt B, 2010). Des modèles animaux présentant des mutations du gène codant pour PMEL, ou des animaux KO (knock-out) pour PMEL (Pmel-/-), souffrent d'une hypopigmentation modérée à sévère (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011). PMEL est une protéine transmembranaire de type I possédant un grand domaine luminal, un domaine transmembranaire unique et un court domaine cytoplasmique. Au niveau du mélanosome de stade I, PMEL est clivée dans son domaine transmembranaire afin de libérer son domaine luminal. Le domaine luminal de PMEL ainsi libéré va s'agréger en un réseau de fibres intraluminales. La maturation du mélanosome de stade I en stade II se traduit par l'accumulation progressive de ces fibres intraluminales. Cette accumulation de fibres, qui confère aux mélanosomes une forme allongée caractéristique (ellipsoïde), a pour rôle majeur la séquestration de la mélanine et de ses intermédiaires cytotoxiques dans les mélanosomes de stades III et IV(Theos, Truschel, et al., 2005) (Figure 7). Les mécanismes aboutissant à la formation des fibres (synthèse, trafic, tri et clivage de PMEL etc.) seront abordés plus en détails dans la partie 1.4.4.

Les enzymes intervenant au cours de la synthèse de la mélanine constituent un autre bon exemple de protéines mélanosomales. Ces enzymes enrichies dans les mélanosomes de stade III et IV sont : la tyrosinase, TYRP1 (tyrosinase related protein 1) et la DCT (dopachrome tautomerase) également appelée TYRP2 (Kushimoto et al., 2001; Raposo et al., 2001). Ces trois enzymes possèdent environ 40% d'homologie de séquence. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. Elles possèdent un long domaine luminal où se situe leur site catalytique, un domaine transmembranaire unique, et un court domaine cytoplasmique contenant des signaux d'adressage aux mélanosomes (Blagoveshchenskaya et al., 1999; Calvo et al., 1999; Honing et al., 1998; Simmen et al., 1999; Vijayasaradhi et al., 1995).

La tyrosinase est une enzyme contenant des ions cuivre dans son site actif. Elle catalyse les étapes clés de la synthèse de la mélanine, c'est à dire l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA et l'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone (Lerner, 1949). La tyrosinase catalyse également l'oxydation du DHI en indole-5,6-quinone (Korner and Pawelek, 1982) (Figure 3). Les patients atteints d'albinisme oculo-cutané de type I (OCA I) possèdent des mutations sur le gène codant pour la tyrosinase, et souffrent dans la majorité des cas d'une perte totale de la pigmentation de la peau et des yeux (Costin et al., 2003).

La DCT ou TYRP2 catalyserait la réaction de transformation du dopachrome en DHI et DHICA (N. Wang and Hebert, 2006).

Le rôle enzymatique de TYRP1 est controversé, mais il semblerait qu'elle catalyse la réaction d'oxydation du DHICA en acide indole-5,6-quinone carboxylique (Kobayashi et al., 1994) (Figure 3). Les patients atteints d'albinisme oculo-cutané de type III (OCA III) possèdent des mutations sur le gène codant pour TYRP1, et le phénotype associé est une accumulation de pigments rouges et bruns (Sarangarajan and Boissy, 2001) (Figure 3). Les mécanismes de tri des enzymes mélanosomales aboutissant à la maturation des mélanosomes seront abordés dans la partie 1.4.5.2.

En plus de ces enzymes et de la protéine structurale PMEL, il existe de nombreuses autres protéines associées au mélanosomes qui sont importantes pour la synthèse de la mélanine. Des analyses protéomiques de fractions subcellulaires enrichies en mélanosomes, dérivées de lignées de cellules pigmentaires, ont identifié un grand nombre de protéines associées aux mélanosomes (Basrur et al., 2003; Chi et al., 2006). Cependant, seul un petit nombre de ces protéines a été expérimentalement vérifié. C'est le cas des protéine OA1 et OCA2 dont les gènes sont les cibles de mutations retrouvées chez des patients atteints d'albinisme oculaire de type I et oculo-cutané de type II (OA I et OCA II) respectivement (Innamorati et al., 2006; Sitaram et al., 2009).

OCA2 est également appelée protéine P car elle mutée chez la souris pink-eyed dilute (Rinchik, E.M., et al 1993). La fonction moléculaire d'OCA2 est encore inconnue mais les phénotypes associés à sa perte ou déplétion sont clairs. Les melanosomes dérivés de cellules pigmentaires déficientes pour OCA2 sont sévèrement hypopigmentés (Orlow and Brilliant, 1999) et n'ont plus de tyrosinase associée à leur membrane (Costin et al., 2003; Manga et al., 2001). Il a été suggéré qu'OCA2 soit une pompe à proton qui régulerait le pH des

mélanosomes (Brilliant and Gardner, 2001; Puri et al., 2000).

OA1 est comme son nom l'indique responsable de l'albinisme oculaire de type I. Les mutations affectant OA1 sont associées à une diminution du nombre de mélanosomes dans l'EPR et la choroïde. Bien que seuls les yeux soient hypopigmentés, des mélanosomes géants (appelés « macromélanosomes ») sont retrouvés aussi bien dans les yeux (EPR) que dans la peau (mélanocytes) des patients, suggérant un défaut de biogenèse des mélanosomes (Cortese et al., 2005). OA1 est également appelée GPR 143 (G-protein-coupled receptor) car c'est une glycoprotéine à sept domaines transmembranaires possédant d'importantes similitudes structurelles et fonctionnelles avec les récepteurs couplés aux protéines G - qui sont des récepteurs interagissant avec des GTPases ou des protéines G (Innamorati et al., 2006). Le ligand du récepteur OA1 est la L-DOPA, l'intermédiaire clé de la formation de la mélanine (Lopez et al., 2008). Dans la cellule mélanocyte, OA1 est située au niveau des membranes des mélanosomes (surtout les stade I et II) (Giordano et al., 2009; Schiaffino et al., 1996). La liaison de la L-DOPA à OA1 intervient dans la lumière du mélanosome et permettrait la transduction d'un signal de l'intérieur du mélanosome vers le cytosol. Ce signal régulerait la biogenèse des mélanosomes et plus précisément contrôlerait des évènements de fusion et de fission membranaires pendant la maturation des mélanosomes. Une étude menée par notre laboratoire, dans une lignée de mélanocytes déplétées pour OA1, a montré que ce récepteur était impliqué dans le trafic de protéines mélanosomales et la maturation des mélanosomes. En effet, la déplétion d'OA1 entraine une accumulation des protéines mélanosomales PMEL et TYRP1 dans des mélanosomes immatures anormaux. Les macromélanosomes, observés dans les mélanocytes de patients déficients pour OA1, seraient la conséquence d'événements aberrants de fusion/fission survenant au niveau des stades précoces de mélanosomes (Giordano et al., 2009).

Toutes les protéines ci-dessus ont été listées dans le tableau 1 ; il regroupe leur fonction, leur localisation et leur pathologie associé chez l'homme/et ou l'organisme modèle.

En plus de ces protéines strictement exprimées dans les cellules pigmentaires, les mélanosomes arborent également des protéines ubiquitaires. Ces protéines, en plus d'être exprimées dans des compartiments cellulaires classiques, se retrouvent également exprimées dans les mélanosomes. Parmi ces protéines ubiquitaires se trouvent des enzymes lysosomales (phosphatases acides et des cathepsines) (Diment et al., 1995; Seiji and Kikuchi, 1969) et des protéines membranaires lysosomales telles que LAMP1 et LAMP2 (Zhou et al., 1993). Des analyses protéomiques suggèrent que d'autres protéines lysosomales ainsi que des protéines du réticulum endoplasmique soient exprimées dans les mélanosomes (Basrur et al., 2003; Chi

et al., 2006; Kushimoto et al., 2001). L'implication de la plupart de ces protéines ubiquitaires dans la mélanogenèse reste à déterminer, mais pour d'autres elle a déjà été établie. On peut notamment citer le rôle de la protéine ATP7A (ATPase copper transporter 7A). ATP7A est membre de la famille des ABC transporteurs (transporteurs à ATP Binding Cassette); elle transporte les ions cuivre du cytosol aux organites de manière ATP-dépendante (adénosine-5'-triphosphate). Si dans des cellules non spécialisées ATP7A se localise dans le réseau trans-Golgien et les endosomes, dans les mélanocytes une portion d'ATP7A se localise également dans les mélanosomes. Dans le mélanosome, ATP7A aux mélanosomes engendre une hypopigmentation sévère due à la perte de l'activité de la tyrosinase. Il existe une pathologie associée à l'ATP7A (mutations), la maladie de Menkes. Elle se traduit par des anomalies développementales et des troubles neurologiques. Les modèles murins associés à cette maladie (souris *mottled* et *brindled*) avaient par ailleurs été remarqués à cause de leurs défauts de pigmentation (Lutsenko et al., 2007; Setty et al., 2008).

Protéine	Localisation	Fonction	Pathologie,
mélanosomale	(stade de		Homme/modèle
	mélanosome)		murin
Tyrosinase	III/ IV	Synthèse de la	OCA1/ Tyr <sup>C</sup> (albino)
		mélanine	
TYRP1	III/ IV	Synthèse de la	OCA3/ Tyrp1 <sup>b</sup>
		mélanine	(brown)
TYRP2/ DCT	III/ IV	Synthèse de la	Inconnue/ Dct <sub>slt</sub>
		mélanine	(slaty)
PMEL/ gp100/ silver	I/ II (épitopes	Formation de	Inconnue/ si (silver)
	masqués dans les III/	structures fibrillaires	
	IV)		
OCA2/ P	III/ IV	Régulation du pH des	OCA2/ p (pink-eyed
		mélanosomes	dilute)
OA1/ GPR143	I/ II/ III/ IV	Maturation des	OA1/Oa1
		mélanosomes	

Tableau 1 : Les protéines mélanosomales
#### *1.4.3.3. L'origine endosomale des mélanosomes précoces*

De nombreuses observations faites dans notre laboratoire ont permis de démontrer l'origine endosomale des prémélanosomes. Ces observations ne permettent pas de définir exactement comment les prémélanosomes divergent des endosomes conventionnels après leur formation, mais elles ont permis d'établir un nouveau concept dans la biogenèse des LRO en soulignant la remarquable adaptabilité de la voie endosomale (Raposo et al., 2001).

Ces observations ont pour point de départ l'étude de la localisation de la protéine mélanosomale PMEL. En effet, des analyses d'immunomarquages en microscopie électronique ont montré qu'au moins une portion de PMEL était localisée dans des compartiments tubulovésiculaires et vacuolaires positifs pour EEA1 (Raposo et al., 2001). Une partie de ces compartiments vacuolaires positifs pour EEA1 et PMEL, présente un manteau de clathrine plat. De plus, ces compartiments possèdent quelques ILV et sont accessibles aux traceurs endocytiques après une très courte période d'incubation. L'ensemble de ces observations a permis de conclure que ces compartiments vacuolaires étaient structurellement des mélanosomes de stade I et qu'ils correspondaient à des endosomes de tri (Raposo et al., 2001; Seiji et al., 1963). D'autres observations ont ensuite permis de montrer que ce mélanosome de stade I/ endosome de tri était bien le précuseur du mélanosome de stade II. Premièrement, la quantité du marqueur EEA1 diminue progressivement lorsque l'on passe des mélanosomes de stade I/ endosomes de tri aux mélanosmes de stade II ; cette diminution est inversement corrélée à l'augmentation progressive du signal de PMEL dans ces mêmes compartiments. Deuxièmement, les traceurs endocytiques qui se localisent dans les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri sont exclus des mélanosomes de stade II. Troisièmement, les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri sont marqués par un anticorps dirigé contre le domaine C-terminal de PMEL, mais pas les mélanosomes de stade II, suggérant que la protéine PMEL entière transite dans mélanosomes de stade I/ endosomes de tri avant que son domaine luminal ne soit libéré et ne s'agrège en fibres intraluminales. Enfin, une grande majorité du marquage de PMEL présent dans les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri s'accumule au niveau des ILV et lorsque PMEL est exprimée de manière ectopique dans des cellules non pigmentaires, elle se localise majoritairement dans des CMV (Berson et al., 2003; Raposo et al., 2001).

L'ensemble de ces observations démontre l'adaptation de la voie endosomale dans la cellule pigmentaire, qui en exploitant le compartiment endosomale précoce, assure la formation d'un nouveau compartiment à la structure et à la fonction uniques.

La ségrégation de la voie d'endocytose et de la voie mélanosomale intervient au moment de la formation du mélanosome de stade II. La présence commune de PMEL et de traceurs endocytiques aux mélanosomes de stade I/ endosomes de tri puis leur ségrégation vers deux compartiments différents (stade II et endosome tardif respectivement) montre que le mélanosome de stade I/ endosome de tri représente l'étape clé dans cette ségrégation. Le mélanosome de stade I grâce à ses propriétés communes à l'endosome de tri assure donc une séparation efficace des protéines, en fonction de leur destinée (dégradation, ou maturation du mélanosome) (Raposo et al., 2001).

## 1.4.3.4. Les mélanosomes sont des organites apparentés aux lysosomes...mais sont distincts des lysosomes

Diverses études d'immunocytochimie et de fractionnement subcellulaire ont pu mettre en évidence des caractéristiques communes aux mélanosomes et aux lysosomes. Ces caractéristiques permettent de qualifier les mélanosomes d'organites apparentés aux lysosomes (LRO). Les LRO représentent une famille très hétérogène d'organites présents dans différents types cellulaires : mélanocytes, lymphocytes, macrophages, plaquettes et cellules endothéliales (Raposo et al., 2007). Les caractéristiques que les LRO partagent avec les lysosomes comprennent : une présence de protéines lysosomales, un pH acide et une accessibilité aux traceurs endocytiques. Malgré ces caractéristiques communes, les structures et les fonctions des différents LRO sont très variées. Certains LRO sont considérés comme des lysosomes modifiés pouvant à la fois assurer leur rôle spécifique et un rôle plus classique. C'est le cas des granules cytolytiques des lymphocytes T cytotoxiques qui assurent la dégradation des macromolécules et la lyse des cellules cibles, lorsqu'ils sont sécrétés. En revanche, d'autres LRO comme les mélanosomes ont une fonction unique. En effet, dans les mélanocytes, les mélanosomes coexistent avec les lysosomes conventionnels et chaque organite remplit des fonctions distinctes (Orlow, 1995; Raposo et al., 2001) (Figure 7).

Ce fut d'abord des observations histochimiques qui ont permis de mettre en évidence cette coexistence entre les mélanosomes et les lysosomes. Le groupe de Seiji a montré que même si l'activité d'enzymes lysosomales pouvait être détectée dans les mélanosomes de cellules dérivées de mélanome, cette activité était plus faible que celle détectée dans les lysosomes (Seiji and Kikuchi, 1969). Parallèlement, des études menées par le groupe de Boissy ont montré que l'activité des phosphatases acides était absente des mélanosomes provenant de cellules mélanocytes non transformées (Boissy et al., 1987). Des études par immunomarquage en microscopie électronique ont permis de compléter ces observations (Raposo et al., 2001).

Ces analyses ont montré que seulement 10 à 20% des marguages LAMP1 et cathepsine D (enzyme lysosomale) étaient présents dans les mélanosomes et que la grande majorité était associée aux lysosomes. L'utilisation du marqueur cellulaire de bas pH DAMP (3-(2,4dinitroanillino)-3'-amino-N-methyldipropylamine) а permis de montrer aue ces compartiments lysosomaux étaient beaucoup plus acides que les mélanosomes matures (Anderson et al., 1984). Alors que l'indicateur DAMP s'accumule autant dans les mélanosomes de stades I que dans les lysosomes, cette accumulation diminue au fur et à mesure que les mélanosomes maturent. Cette alcalisation des mélanosomes pendant leur maturation doit résulter d'un retrait progressif d'ATPases de la membrane des mélanosomes ou de l'inactivation de pompes à proton prémélanosomales (peut être OCA2) (Puri et al., 2000). De manière très intéressante, des études ont montré que la tyrosinase était inactive à bas pH (pH inférieur à 5). Ainsi l'augmentation du pH mélanosomale au cours de la maturation du compartiment permettrait de réguler l'activité de la tyrosinase (Devi et al., 1987; Saeki and Oikawa, 1978). Le pH acide du mélanosome de stade I empêcherait une synthèse de mélanine trop précoce. Inversement, l'augmentation du pH dans les mélanosomes matures favoriserait l'activité de la tyrosinase et donc faciliterait la synthèse de mélanine dans ces compartiments.

Pour assurer sa fonction de cellule productrice de mélanine, la cellule pigmentaire exploite donc la voie d'endocytose. Elle créé, à partir d'un compartiment endosomale précoce, un LRO qui va maturer progressivement (en 4 stades) et se distinguer des endosomes et des lysosomes conventionnels. La ségrégation entre système endosomal et voie mélanosomale permet une régulation très fine de la mélanogenèse. La mélanogenèse peut se résumer en deux étapes clés : la prémélanogenèse qui repose sur la formation d'un compartiment aux caractéristiques morphologiques uniques (fibres intraluminales et élongation du compartiment), et la mélanogenèse tardive qui repose sur l'activité des enzymes synthétisant la mélanine (**Figure 7**).



Figure 7 : La voie mélanosomale.

Les mélanosomes sont des organites qui dérivent de la voie endosomale. Ils sont apparentés aux lysosomes et coexistent avec ces derniers dans les mélanocytes. La mélanogenèse est divisée en deux grandes étapes successives qui sont : la formation des fibres amyloïdes dans les mélanosomes de stade II, qui débute avec l'adressage de la protéine PMEL aux mélanosomes de stades I/ endosomes de tri depuis le TGN ou depuis la membrane plasmique (prémélanogenèse); et la synthèse de la mélanine avec l'adressage des enzymes tyrosinase, TYRP1 et DCT depuis les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri aux stades III (mélanogenèse tardive) (adapté de Raposo G. et Marks M., 2007).

#### 1.4.4. La prémélanogenèse et la formation des mélanosomes

Chez les vertébrés, la synthèse de la mélanine dans les mélanosomes matures intervient sur des fibres intraluminales. Ces fibres, qui s'organisent en réseau parallèle tout le long du mélanosome, donnent à ce dernier une forme ellipsoïdale caractéristique. Ces fibres intraluminales souvent qualifiées de « matrice du mélanosome » ou « matrice fibrillaire » sont composées de fragments protéolytiques d'une protéine spécifique des cellules pigmentaires, la protéine PMEL. Ces fibres dérivées de PMEL optimisent la polymérisation de la mélanine ainsi que sa concentration et sa rétention au sein du compartiment mélanosomal. Les fibres intraluminales commencent à se former dans le mélanosome de stade I, correspondant à un endosome de tri et caractérisé par la présence de quelques ILV. Dans les cellules pigmentaires, la formation d'ILV par invagination de la membrane limitante du mélanosome de stade I/endosome assure un tri efficace de la protéine PMEL sur ces ILV. Cette internalisation de PMEL dans la lumière du mélanosome permet la formation de fibres intraluminales qui nucléeraient à partir des ILV (Hurbain et al., 2008). Au fur et à mesure que ces fibres intraluminales s'assemblent, le compartiment s'allonge jusqu'à avoir la forme caractéristique du mélanosome de stade II.

Le trafic, le tri et le clivage de PMEL sont autant étapes indispensables à la prémélanogenèse. L'ensemble de ces étapes optimise la formation d'un compartiment à la morphologie et à la fonction uniques représenté par le mélanosome (Watt B, 2010; Watt et al., 2013).

# 1.4.4.1. PMEL est à l'origine de la formation d'une matrice fibrillaire dans les mélanosomes

L'un des composants spécifiques majeurs des mélanosomes est la protéine structurale PMEL ou Pmel17 (pour melanocyte Protein 17), également appelée gp100, ou ME20 dans la littérature et nommée Silver ou SILV chez la souris. PMEL est très conservée au cours de l'évolution chez les vertébrés. Son expression est largement limitée aux cellules pigmentaires de la peau (mélanocytes épidermaux) et des yeux (mélanocytes choroïdiens et cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine, de l'iris et du corps ciliaire) (Watt B, 2010; Watt et al., 2013). C'est en cherchant à identifier des antigènes associés aux mélanomes que PMEL fut découverte. En effet, cette glycoprotéine de 100 kDa (d'où sont appellation gp100) constitue l'un des meilleurs marqueurs pour le diagnostic de mélanome humain, car son expression est spécifique des mélanocytes (Gown et al., 1986; Vogel and Esclamado, 1988). PMEL est synthétisée sous la forme d'une protéine de type I, composée d'un court peptide signal N- terminal (N-ter), d'une grande région luminale, d'un domaine transmembranaire unique et d'une région C-terminale (C-ter) cytoplasmique.

Le groupe d'Orlow a été le premier à suggérer que PMEL pourrait faire partie de la « Matrice du mélanosome », en se basant sur les propriétés insolubles de PMEL dans des détergents tel que le triton X-114/100 (Orlow et al., 1993). En purifiant des fractions subcellulaires enrichies en mélanosomes et en utilisant une technique d'extraction différentielle par des détergents, le groupe d'Orlow a identifié des fragments protéolytiques de PMEL associés à la fraction enrichie en fibres insolubles (Orlow et al., 1993; Zhou et al., 1994). D'autres expériences ont montrés que la forme prédominante de PMEL qui s'associait avec la fraction subcellulaire enrichie en mélanosomes de stade II, correspondait à des fragments protéolytiques du domaine luminal de PMEL (Berson et al., 2003; Harper et al., 2008; Hoashi et al., 2006; Kushimoto et al., 2001; Watt et al., 2009). En accord avec ces résultats, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine luminal de PMEL a permis de montrer que PMEL se trouvait majoritairement dans les mélanosomes de stades I et II, et moins dans les stades III et IV (Lee et al., 1996). Ces observations ont été confirmées par des études réalisées en microscopie électronique montrant que l'immunomarquage de PMEL, dans les melanosomes de stades II, était associé aux fibres intraluminales (Raposo et al., 2001). Cette immunoréactivité décroît dans les mélanosomes matures (stade III et IV). En effet, la détection biochimique de PMEL est inhibée par la mélanisation (Donatien and Orlow, 1995), suite au masquage des fibres de PMEL par la mélanine synthétisée au cours de la maturation des mélanosomes. Il a été démontré que PMEL était la seule protéine spécifique des cellules pigmentaires nécessaire et suffisante pour produire des fibres intraluminales dans des cellules de vertébrés (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003). La formation de structures très similaires aux fibres de PMEL a été observée par microscopie électronique dans des cellules HeLa exprimant ectopiquement PMEL (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003). PMEL est aussi indispensable à la formation des fibres dans les cellules pigmentaires comme l'a montré l'analyse de lignées mélanocytaires dans lesquelles l'expression, le trafic ou le tri de PMEL sont altérés (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006; van Niel et al., 2011) (Figure 8). Enfin, des fragments recombinants dérivés du domaine luminal de PMEL (produits dans des systèmes d'expression bactériens) forment in vitro des fibres similaires à celles des mélanosomes (Fowler et al., 2006; McGlinchey et al., 2011; McGlinchey et al., 2009; Watt et al., 2009). Toutes ces études suggèrent fortement que PMEL est le composant essentiel (peut-être le seul) des fibres intraluminales des mélanosomes.



Figure 8 : PMEL est à l'origine de la formation d'un réseau fibrillaire.

La microscopie électronique permet d'observer la formation des fibres dérivées de PMEL dans les mélanocytes (Hurbain et al., 2008) et dans des cellules HeLa exprimant stablement une construction de PMEL (Berson et al., 2003). (Les flèches indiquent les fibres, et les têtes de flèches indiquent les ILV). (Barre d'échelle, 200 nm).

## 1.4.4.2. Les fibres intraluminales de PMEL sont des fibres amyloïdes

Un détail important à considérer est la nature même des fibres de PMEL. En effet, ces fibres possèdent toutes les caractéristiques des fibres amyloïdes (Fowler et al., 2006). Que sont les fibres amyloïdes ? Au sens étymologique, Amyloïde veut dire « qui a la forme de l'amidon ». Amyl est emprunté au grec amulon « ce qui n'est pas moulu », en référence à l'amidon; le suffixe oïde est emprunté au grec eidos « qui a la forme ». C'est le médecin pathologiste Rudolf Virchow qui créa le terme d'amyloïde au 19è siecle, pour désigner une substance d'origine inconnue qui s'accumulait dans des tissus pathologiques (Grateau et al., 2005). Cette substance possédait des propriétés tinctoriales communes à l'amidon en présence d'une solution à base d'iode (solution de Lugol), c'est pourquoi il la nomma amyloïde. Malgré l'origine de leur appellation, les amyloïdes ne sont pas des sucres mais des structures protidiques (peptidiques ou protéiques). En effet, les amyloïdes sont des structures quaternaires (oligomères) stables, constituées de monomères de chaines polypeptidiques adoptant une structure secondaire en feuillet bêta plissés (avec des brins bêta antiparallèles, liés par des liaisons hydrogènes intramoléculaires) (Figure 9). Ces oligomères s'autoassemblent pour former une fibre amyloïde (environ 10nm diamètre), de manière perpendiculaire à l'axe de la fibre en formation (Fowler et al., 2007). La formation de fibres amyloïdes suivrait le schéma suivant : monomère -dimère- oligomère -fibre (Hammer et al., 2008) (Figure 10).



Figure 9 : Schéma de la structure des fibres amyloïdes.

Les fibres amyloïdes se forment à partir de structures quaternaires, constituées de monomères de chaines polypeptidiques adoptant une structure secondaire en feuillet bêta plissé. Ces structures quaternaires, ou oligomères, s'auto-assemblent pour former une fibre amyloïde, de manière perpendiculaire à l'axe de la fibre en formation (Fowler et al., 2007).



## Figure 10 : Formation des fibres amyloïdes.

Les fibres amyloïdes se forment à partir d'un monomère (structure protidique en feuillet bêta), qui s'assemble en dimère puis en oligomère puis en fibre amyloïde.

Les amyloides sont retrouvées dans un vaste groupe de maladies appelée amylose ou amyloïdose – ce sont les pathologies inconnues qu'étudiait Rudolf Virchow. L'amylose se caractérise par l'accumulation d'amyloïdes dans divers tissus ou organes (cœur, rein, foie..) engendrant leur dysfonctionnement. Cette accumulation est la conséquence d'un repliement anormal de protéines ou peptides qui en changeant de conformation adoptent une structure amyloïde. Les amyloïdes sont également associées à des maladies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les maladies à prions (maladie de Creutzfeldt – Jakob) (Grateau et al., 2005).

Dans la maladie d'Alzheimer, qui se traduit d'abord par un trouble de la mémoire puis par des troubles cognitifs plus sévères (trouble de l'humeur, du langage, des émotions, etc.), c'est la formation d'un peptide amyloïde appelé A $\beta$  (bêta-amyloïde) qui est associée à la mort des neurones (De Strooper et al., 2010). Pourquoi ces amyloïdes sont-elles toxiques ? Même si le caractère toxique de ces amyloïdes d'A $\beta$  est encore soumis à controverse, les études s'accordent sur le fait que ni les monomères, ni les fibres formées à partir du peptide A $\beta$  ne sont toxiques. Il semblerait que seuls les oligomères (intermédiaires solubles) soient toxiques et que cette toxicité repose sur la nature du peptide lui-même et non pas sur son accumulation. Il existe différentes formes de peptide A $\beta$  allant de 37 à 43 acides aminés de long. Les peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 sont les plus communs ; A $\beta$ 40 est le peptide prédominant et A $\beta$ 42 est le plus toxique (De Strooper et al., 2010; Fowler et al., 2007; Jarrett et al., 1993). L'interaction de ces oligomères toxiques avec des lipides membranaires (perte de l'intégrité membranaire), des protéines (dénaturation) et d'autres composants du cytosol, serait à l'origine de pertes synaptiques (Kayed et al., 2003; Kayed et al., 2004; Gouras et al., 2014).

Comment reconnaît-on des amyloïdes ? Les amyloïdes ont de nombreuses propriétés : elles peuvent former des fibres qui sont insolubles en présence de détergents, elles peuvent se lier à des colorants spécifiques (le Congo Red et les thioflavines S et T), elles peuvent être observées en microscopie électronique, elles peuvent diffracter spécifiquement les rayons X et sont ultra-résistantes aux digestions protéolytiques (Chiti and Dobson, 2006; Fowler et al., 2007).

Si beaucoup de protéines sont capables d'adopter une conformation de type amyloïde dans un contexte pathologique, d'autres sont capables d'adopter cette conformation dans un contexte physiologique et fonctionnel. C'est ainsi qu'a émergé la notion de fibres amyloïdes physiologiques. La formation de ces fibres physiologiques est très conservée au cours de l'évolution (bactérie, levure, insectes et vertébrés) et elle a été adaptée à de nombreux contextes (protection contre des stress environnementaux, concentration de peptides bio-

actifs, organisation de l'environnement extracellulaire, etc.) (Blanco et al., 2012; Chapman et al., 2002; Iconomidou et al., 2000; Kenney et al., 2002; Maji et al., 2009; Uptain and Lindquist, 2002; Wickner et al., 2004). Dans les cellules pigmentaires, la formation de fibres amyloïdes a été adaptée au contexte de la mélanogenèse. Les fibres amyloïdes qui dérivent de PMEL ont été les premières fibres amyloïdes physiologiques et fonctionnelles décrites chez l'homme (Fowler et al., 2006; Fowler et al., 2007).

Diverses études ont permis de démontrer la nature amyloïdogénique des fibres de PMEL, en se basant sur les propriétés physico-chimiques des amyloïdes pathologiques. Tout d'abord, les fibres de PMEL sont insolubles dans des détergents et sont très stables. Ensuite, le groupe de Fowler a montré qu'une PMEL recombinante (isolée à partir de bactéries) formait rapidement des structures riches en feuillets bêta. Ces structures sont très similaires à celles des fibres amyloïdes d'un point de vue morphologique (microcopie électronique) et peuvent lier des colorants tels que la thioflavine S et le Congo Red et diffracter similairement les rayons X. Enfin, la formation des fibres amyloïdes dans le mélanosome requiert le clivage séquentiel de PMEL par plusieurs enzymes. Ce processus est analogue à la formation des fibres amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer qui repose également sur le clivage séquentiel d'une protéine spécifique pour en extraire un peptide amyloïdogénique (Berson et al., 2001; Kelly and Balch, 2003; Kummer et al., 2009; Kushimoto et al., 2001; van Niel et al., 2011). L'ensemble de ces observations a confirmé la nature amyloïdogénique des fibres de PMEL.

## *1.4.4.3.* La fonction des fibres de PMEL

PMEL est très conservée au cours de l'évolution des vertébrés et les orthologues de PMEL partagent de forts pourcentages d'identité (Theos, Truschel, et al., 2005). Quel avantage a la cellule pigmentaire (en terme d'évolution et de fonctionnalité) de former des fibres amyloïdes potentiellement toxiques pour elle-même ?

La mélanine est synthétisée sur les fibres dérivées de PMEL. Même si la fonction des fibres intraluminales n'est pas entièrement claire, un des rôles des fibres de PMEL serait d'accélérer la polymérisation de la mélanine comme l'ont montré des expériences *in vitro* réalisées à partir des intermédiaires DHI et DHICA (Chakraborty et al., 1996; Fowler et al., 2006; Lee et al., 1996). De manière très intrigante, le groupe de Fowler a pu observer une similitude entre les intermédiaires DHI/ DHICA et la thioflavine T. Il a également pu montrer que des fibres amyloïdes autres que celles de PMEL pouvaient accélérer la conversion du DHI en mélanine (Fowler et al., 2006). Les fibres de PMEL joueraient non seulement un rôle cinétique dans la

mélanisation, mais également un rôle de détoxification en séquestrant des intermédiaires hautement réactifs formés au cours de la synthèse de la mélanine (Simon et al., 2009). Ces intermédiaires en s'oxydant peuvent altérer les composants du mélanosome et ceux du cytosol, et perturber l'intégrité membranaire du mélanosome et d'autres organites. L'étude d'animaux modèles renforce cette notion de détoxification. Chez le poulet Dominant White, des mutations d'une séquence proche du domaine transmembranaire de PMEL altèrent la formation de fibres intraluminales. Le défaut de pigmentation est très sévère (absence de pigment) car il est associé à une forte diminution de la viabilité des mélanocytes (Watt et al., 2011). La mortalité des mélanocytes provient de la perte de l'intégrité membranaire des mélanosomes, qui est surement due en partie à la toxicité des intermédiaires de la mélanine. D'autre part, une mutation affectant le gène de PMEL chez la souris silver engendre une forme tronquée de PMEL qui ne peut plus former de fibres amyloïdes car sa localisation dans les prémélanosomes est altérée (Martinez-Esparza et al., 1999; Theos, Berson, et al., 2006). Cette mutation engendre un grisonnement prématuré du pelage des souris (d'où l'appellation silver) corrélé à une réduction de la survie des mélanocytes dans le bulbe pilaire. Enfin, l'absence de PMEL dans des souris Pmel-/- provoque également une dilution très modeste et difficilement visible du pigment associé au pelage de ces souris, associée à une atteinte de l'intégrité des membranes mélanosomales (Hellstrom et al., 2011). L'ensemble de ces observations, indique que les fibres de PMEL protègeraient la cellule pigmentaire d'attaques oxydatives provenant des intermédiaires hautement réactifs de la mélanine.

Une autre fonction des fibres intraluminales serait de faciliter la dynamique intracellulaire des mélanosomes ainsi que le transfert de la mélanine. Les différents mécanismes de transfert de la mélanine du mélanocyte au kératinocyte ne sont pas encore bien définis (Van Den Bossche et al., 2006). Cependant, une des hypothèses serait que la membrane limitante du mélanosome fusionne avec la membrane plasmique du mélanocyte pour libérer la mélanine, afin qu'elle soit ensuite phagocytée par le kératynocyte. Dans ce contexte, la phagocytose serait largement facilitée par la condensation de mélanine sur une structure compacte (formée par les fibres intraluminales) plutôt que par la formation de particules de mélanine isolées(Watt B, 2010). De plus, une structure compacte serait plus stable une fois internalisée dans les kératinocytes et lors de la fusion entre mélanosomes et phagosomes intervenant dans l'EPR (voir partie 1.1.2.) (Marmorstein et al., 1998; Schraermeyer et al., 1996; Schraermeyer and Heimann, 1999; Schraermeyer et al., 1999). Paradoxalement, malgré l'intérêt fonctionnel et physiologique de ces fibres de PMEL, ces fibres restent des amyloïdes et leur production si elle n'est pas correctement régulée pourrait aboutir à une toxicité cellulaire due à la formation

d'agrégats amyloïdes (voir partie 1.4.4.7) (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011).

Il faut souligner le fait que l'absence de formation des fibres de PMEL n'empêche pas la production de mélanine dans les cellules pigmentaires ; la formation des fibres intraluminales et la synthèse de mélanine sont deux étapes indépendantes. Chez la souris *silver*, les souris *Pmel-/-* et le poulet *Dominant White*, PMEL ne s'associe plus en fibres intraluminales mais la synthèse de mélanine a toujours lieu (Hellstrom et al., 2011; Martinez-Esparza et al., 1999; Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011). La sévérité du défaut de pigmentation repose donc sur plusieurs facteurs, la cinétique de mélanisation, une perte de l'intégrité des membranes mélanosomale et la viabilité des mélanocytes.

## *1.4.4.4. Liens entre structure et fonction de PMEL*

Chez l'homme, Il existe 4 formes protéiques différentes de PMEL, par épissage alternatif : une longue, une intermédiaire (la plus abondante) et 2 courtes (Theos, Truschel, et al., 2005). Aucune différence fonctionnelle entres ces isoformes n'a encore été déterminée à ce jour. Cette thèse se basera sur les études qui ont porté (majoritairement) sur la forme la plus longue de PMEL (668 acides aminés).

PMEL est une glycoprotéine transmembranaire de type I, elle s'insère dans la membrane via un unique domaine transmembranaire et elle possède un long domaine N-ter luminal et un court domaine C-ter cytoplasmique. Le long domaine luminal de PMEL s'organise en un court peptide signal suivit par quatre sous-domaines dont la plupart sont très conservés chez les vertébrés (Figure 11).

Le sous-domaine NTR (pour N-Terminale Region) suit directement le peptide signal qui est excisé de la protéine en cours de traduction par des peptidases. Le NTR n'a pas d'homologie avec un domaine protéique connu. Le domaine NTR contient trois sites consensus de N-glycosylation très conservés, et possède 3 résidus cystéine qui pourraient être impliqués dans la formation de ponts disulfures nécessaires au bon repliement de la protéine PMEL (prévenant une agrégation trop précoce).

Le sous-domaine qui suit le NTR est un domaine homologue à celui retrouvé dans la protéine PKD-1 (Polycystic Kidney Disease associated protein, polycystin 1) qui est donc appelé domaine PKD. Le PKD ne possède pas de site de glycosylation et peut adopter une conformation en feuillet bêta. Un seul résidu cystéine hautement conservé est présent dans ce domaine. Une courte région qui lie le NTR au PKD est indispensable au bon repliement de la protéine PMEL, à son trafic intracellulaire et à sa fibrillogenèse (Leonhardt et al., 2010).

Le PKD, est suivi par le domaine RPT (repeat domain) qui se compose de 10 répétitions directes mais imparfaites d'une séquence de 13 résidus riches en acide glutamiques, prolines et sérines/thréonines. Ce domaine RPT est fortement modifié par des O-glycosylations au cours de la maturation de la protéine PMEL (Harper et al., 2008; Valencia et al., 2007). Les trois sous-domaines NTR, RPT, PKD sont retrouvés dans le fragment protéolytique de PMEL appelé M $\alpha$  (pour Mature polypeptide alpha).

La dernière région du domaine luminal de PMEL est le domaine KLD (Kringle-Like Domain) appelé ainsi car il est très similaire au domaine protéique Kringle riche en cystéines. Le KLD possède des sites de N-glycosylations importants pour le repliement et la sécrétion de la protéine (Hoashi et al., 2010). Parmi les sept résidus cystéines retrouvés dans ce domaine, six seraient nécessaires au repliement du domaine KLD et un serait impliqué dans des interactions protéines-protéines et la formation de ponts disulfures avec les cystéines du NTR ou celui du PKD.

Le KLD est flanqué de deux régions, appelées GAP2 (en amont de son N-ter) et GAP3 (en aval de son C-ter) (Hoashi et al., 2006). GAP3 lie le KLD au domaine transmembranaire (DTM). Le DTM est suivi par le domaine cytoplasmique. Le sous-domaine KLD, le DTM et le domaine cytoplasmique sont retrouvés dans le fragment protéolytique de PMEL appelé M $\beta$  (pour Mature polypeptide bêta) (Figure 11).





#### Figure 11 : Topologie de PMEL.

PMEL est une protéine transmembranaire de type I que l'on retrouve associée à la membrane des mélanosomes de stade I. Elle possède une grande région N-ter luminale et une courte région C-ter cytoplasmique. PMEL s'organise en divers sous-domaines : le NTR, le PKD, le RPT et le KDL (situés dans la region luminale); le domaine transmembranaire DTM et le domaine cytoplasmique Cyt. Les trois sous-domaines NTR, RPT, PKD sont retrouvés dans le fragment protéolytique de PMEL appelé M $\alpha$ . Le sous-domaine KLD, le DTM et le domaine cytoplasmique sont retrouvés dans le fragment protéolytique de PMEL appelé M $\beta$  (Watt et al., 2013). (PS : peptide signal, S-S : pont disulfure, les nombres indiquent les acides aminés correspondant aux sous-domaines de PMEL).

Des études ont montré que le domaine luminal M $\alpha$  (isolé à partir de bactéries) avait la propriété de polymériser en fibres *in vitro* et que seule le M $\alpha$  était détecté dans la fraction mélanocytaire insoluble dans les détergents (Berson et al., 2003; Fowler et al., 2006; Watt et al., 2009). Mais quel est le rôle des différents sous-domaines dans la formation des fibres de PMEL ?

Pour répondre à cette question, la première approche expérimentale a consisté à exprimer des formes de PMEL tronquées au niveau d'un ou plusieurs sous-domaines (NTR, PKD, RPT et KLD), dans des cellules pigmentaires ou non spécialisées. Il a ainsi été montré que le PKD était essentiel au clivage correct de PMEL et à son adressage aux CMV (Hoashi et al., 2006; Theos, Berson, et al., 2006). Le RPT (et sûrement ses O-glycosylations) est également impliqué dans la formation de fibres dans les CMV, mais pas dans la localisation de PMEL au niveau de ces compartiments (Hoashi et al., 2006; Theos, Berson, et al., 2006; Valencia et al., 2007). Les rôles du NTR et du KLD sont plus controversés, mais il est clair que le NTR est important pour la formation des fibres, et qu'au moins une partie du KLD est essentielle au bon repliement de PMEL (Hoashi et al., 2006; Leonhardt et al., 2013; Theos, Berson, et al., 2006). Une autre approche utilisée par deux équipes de recherche consistait à utiliser des formes recombinantes de PMEL (purifiées à partir de bactéries) pour faire des essais in vitro. Le premier groupe a montré qu'une protéine recombinante correspondant au domaine RPT seul était suffisante pour produire des fibres in vitro (McGlinchey et al., 2009). Cependant, les propriétés de ces fibres in vitro issues du RPT (cinétique extrêmement lente de leur formation et leur dissolution dans des pH neutres) ne sont pas consistantes avec les propriétés que l'on attend des fibres in vivo. Les fibres de PMEL doivent se former rapidement pour éviter l'accumulation d'oligomères toxiques et doivent être stables à différents pH, notamment à un pH neutre qui caractérise la maturation des mélanosomes (Raposo et al., 2001). Au contraire, le groupe de Michael Marks a montré que seule une forme recombinante de PMEL correspondant au NTR au PKD, avait un potentiel amyloïde in vitro - en se basant sur l'utilisation de colorants (Congo Red, thioflavines), l'insolubilité dans des détergents, la diffraction des rayons X, l'analyse ultrastructurale en microscopie électronique et la résistance aux protéases (Watt et al., 2009). La cinétique de formation des fibres amyloïdes à partir des domaines recombinants NTR et PKD (dans des conditions de pH variés) est extrêmement rapide (quelques minutes) et identique à celle du domaine recombinant Mα entier (Fowler et al., 2006; Watt et al., 2009). De plus, la morphologie des fibres formées à partir du domaine Ma entier ou du PKD ressemble fortement aux fibrilles retrouvées dans les prémélanosomes de stade I (Figure 12). Finalement, un fragment du PKD a été retrouvé dans les fractions de mélanocytes enrichis en fibres insolubles dans des détergents (van Niel et al., 2011; Watt et al., 2009). De manière intéressante, le domaine PKD (qui ne subit pas de glycosylation) est constitué de feuillets bêta plats, structures propices à la formation d'amyloïdes (Greenwald and Riek, 2010). L'ensemble de ces données supporte l'idée que le domaine PKD formerait le cœur des fibres de PMEL. Le NTR, quant à lui, faciliterait le réarrangement conformationnel du domaine luminal en amyloïdes. Même si le RPT ne forme pas le cœur des fibres, il est impliqué dans la formation de fibres dans les CMV et les anticorps qui reconnaissent le PKD et le RPT décorent les fibres en microscopie électronique. Il semblerait que le RPT s'associe aux fibres issues du PKD, sûrement pour réguler l'assemblage de ces fibres en une structure compacte et organisée (appelée feuillet et à ne pas confondre avec la structure secondaire feuillet bêta), comme le montre la reconstruction en 3 dimensions (3D) par tomographie en microscopie électronique (Hurbain et al., 2008).



Figure 12 : Fibres formées à partir du domaine PKD de PMEL in vitro.

Des domaines recombinants PKD de PMEL, purifiés à partir de bactéries, sont capables de former *in vitro* des fibres amyloïdes dont la morphologie est très similaire à celle des fibrilles retrouvées dans les mélanosomes de stade I (Fowler et al., 2006; Watt et al., 2009). (Barre d'échelle, 200 nm).

## *1.4.4.5.* Synthèse, glycosylation et trafic de PMEL

Afin d'éviter toute toxicité associée aux amyloïdes (formation d'agrégats), la formation des fibres de PMEL doit être étroitement régulée. Cette régulation intervient à bien des étapes, que ce soit pendant la biosynthèse, la maturation ou le trafic de PMEL.

Pendant sa traduction PMEL est transférée dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle est également modifiée par le clivage de son peptide signal et par l'ajout de 4 oligosaccharides Nliées ; ces évènements aboutissent à la formation d'une forme immature de PMEL appelée P1 (precursor 1) (Berson et al., 2001; Maresh et al., 1994). P1 est exportée du RE au Golgi via des vésicules golgiennes formées à partir de la machinerie COPII (Coat Protein II); le recrutement de cette machinerie est facilité par la présence d'un résidu valine au niveau du domaine C-ter de PMEL (Berson et al., 2001). L'absence de cette valine dans la forme tronquée du mutant de PMEL chez la souris silver résulte en un transport ralenti de PMEL entre le RE et le Golgi (Theos, Berson, et al., 2006). Dans le Golgi, P1 subit des modifications au niveau de ses oligosaccharides N-liées ; elle est aussi modifiée au niveau de son domaine RPT par l'ajout de O-glycosylations (Berson et al., 2001; Hoashi et al., 2010; Maresh et al., 1994). Ces O-glycosylations sont également modifiées dans le golgi par l'ajout d'acides sialiques terminaux (Harper et al., 2008; Valencia et al., 2007). Tous ces événements survenant dans le Golgi aboutissent à la forme entière et mature de PMEL, appelée P2 (precursor 2). P2 va ensuite atteindre les mélanosomes (stade I) en transitant par le réseau trans-golgien (Trans-Golgi-Network ou TGN) (Raposo et al., 2001; Theos, Berson, et al., 2006). A partir du TGN, PMEL est envoyée à la membrane plasmique où elle est en suite internalisée par la voie d'endocytose clathrine/ AP-2 dépendante (Adaptor protein 2) (Figure 13). L'adapteur AP-2 interagit avec le motif di-leucine d'internalisation présent dans le domaine cytoplasmique de PMEL. La suppression d'AP-2 dans une lignée mélanocytaire, engendre une accumulation de PMEL à la membrane plasmique et perturbe fortement sa localisation aux prémélanosomes (Robila et al., 2008). De manière similaire, la mutation naturelle de PMEL chez la souris silver (absence de signal di-leucine due à une forme tronquée du domaine cytoplasmique de PMEL) provoque une accumulation de PMEL à la membrane plasmique et inhibe son adressage aux mélanosomes (Martinez-Esparza et al., 1999; Theos, Berson, et al., 2006). Même si une portion de PMEL peut atteindre les prémélanosomes directement via le TGN, cette voie de transit est largement minoritaire dans les cellules pigmentaires comme le confirment les observations précédentes (Figure 13). La maturation et le trafic de PMEL ne sont pas les seuls événements hautement régulés. Pour former des fibres amyloïdes de manière optimale et efficace, PMEL est clivée à de nombreuses reprises par différentes enzymes pour permettre la libération du fragment amyloïdogénique dans les prémélanosomes. La majorité de ces clivages intervient en concomitance au tri de PMEL sur des ILV, qui se forment à partir de la membrane limitante des mélanosomes de stade I.



Figure 13 : Trafic de PMEL.

PMEL est synthétisée dans le RE et transite ensuite dans l'appareil de Golgi. Les mécanismes d'adressage de PMEL aux mélanosomes de stade I impliquent : soit un passage à la membrane plasmique (1) puis une endocytose (2), soit un adressage direct de PMEL depuis le TGN aux stade I (1). Dans les mélanosomes de stade I, PMEL est ensuite clivée et triée sur des ILV pour former les fibres amyloïdes sur lesquelles la mélanine va se déposer (adapté de Raposo G. et Marks M., 2007).

#### *1.4.4.6. Clivage et tri de PMEL*

La forme entière et mature de PMEL, appelée P2, a une très courte demi-vie (2h) car elle subit différentes étapes de clivage. Le lieu du premier clivage de P2 est encore débattu, mais correspondrait certainement à un compartiment au pH acide (TGN ou mélanosome de stade I) (Leonhardt et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006). P2 est d'abord clivée par une protéase de la famille des furines (ou une PC pour proprotéine convertase) au niveau des résidus Lys468-469Arg de son domaine luminal (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003). Ce clivage engendre la formation d'un large domaine luminal M $\alpha$  (contenant le NTR, le PKD et le RPT) et d'un court domaine transmembranaire M $\beta$  (contenant le KLD, le DTM et le domaine cytoplasmique) (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003). Cependant, après le clivage par la PC, M $\alpha$  est toujours associé aux membranes à cause de la présence d'un pont disulfure (formé dans le RE) qui le lie au domaine transmembranaire M $\beta$  (Figure 14).

Au niveau du mélanosome de stade I, une seconde enzyme appelée « site 2 protease » (s2p) clive PMEL au niveau de sa région luminale juxtamembranaire (Kummer et al., 2009) (Figure 13 et 14). Ce clivage libère le domaine luminal Ma associé à la portion luminal du domaine Mß appelée MßN. La protéine à l'origine de ce clivage n'a pas encore été identifiée dans les cellules pigmentaires, mais des études ont montré que des protéases appartenant à la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase), notamment ADAM10 et ADAM17, étaient nécessaires au clivage de PMEL dans les HeLa au niveau des résidus Gln583-Leu584 (Kummer et al., 2009). Le clivage de PMEL par s2p est indépendant de celui assuré par la PC. Ces deux clivages sont nécessaires à la formation des fibres amyloïdes dans le mélanosome de stade I, mais pas à la localisation de PMEL dans ce compartiment. L'inhibition de ces deux clivages a pour conséquence la formation d'agrégats au dépend de fibres amyloïdes organisées (Berson et al., 2003; Kummer et al., 2009). De façon très intéressante, le clivage juxtamembranaire de PMEL est aussi requis pour la sécrétion des fragments Mα-MβN liés dans le milieu extracellulaire (Berson et al., 2001; Esclamado et al., 1986; Hoashi et al., 2010; Maresh et al., 1994; Vennegoor et al., 1988). Ces fragments sont solubles (probablement à cause du MBN) et ne forment pas de fibres amyloïdes. Seule une petite partie de PMEL clivées est sécrétée par les cellules en culture et la signification fonctionnelle de cette cohorte est encore inconnue. La séquence requise pour la sécrétion de PMEL est différente de celle requise pour la formation des fibres, suggérant l'intervention de deux enzymes différentes et/ou de clivages dans des compartiments distincts (Hoashi et al., 2010; Kummer et al., 2009).

En plus de libérer les fragments Ma et MBN liés dans la lumière des mélanosomes stades I

54

pour initier la formation des fibres, le clivage de PMEL par s2p génère un petit fragment C-ter (CTF) transmembranaire (Kummer et al., 2009). Le CTF est le substrat d'une autre protéine appelée  $\gamma$ -sécrétase (Kummer et al., 2009; van Niel et al., 2011). Le clivage du CTF par la  $\gamma$ -sécrétase libère un court domaine intracytoplasmique (ICD), dont la fonction demeure inconnue. Ce clivage est indispensable à la dégradation du CTF dans les CMV/ lysosomes (van Niel et al., 2011) (**Figure 13 et 14**). D'autres protéines mélanosomales (la tyrosinase, TYRP1 et DCT) sont aussi des substrats de la  $\gamma$ -sécrétase (N. Wang and Hebert, 2006).

L'action des enzymes PC et s2p est nécessaire à la libération du M $\alpha$ , mais elle n'est pas suffisante pour former des fibres amyloïdes organisées. Il semblerait que M $\alpha$  subissent plusieurs clivages impliqués dans la maturation des fibres amyloïdes et leur association en feuillets compacts. Les fragments M $\alpha$  entiers de PMEL sont bien enrichis dans la fraction subcellulaire insoluble des mélanocytes (Berson et al., 2003; Harper et al., 2008; Kummer et al., 2009), mais la majorité des fragments obtenus dans cette fraction correspond à des portions de M $\alpha$  (Harper et al., 2008; Hoashi et al., 2006; Kushimoto et al., 2001; Watt et al., 2009). Ces portions sont sûrement issues du clivage du M $\alpha$  par des protéases lysosomales présentes dans le mélanosome de stade I (Diment et al., 1995; Raposo et al., 2001). Cette maturation protéolytique du M $\alpha$  n'est pas nécessaire à la formation de structures amyloïdes *in vitro*, mais doit être importante pour la formation de fibres *in vivo* (fibres pleinement matures et capables de s'associer en une structure compacte) (Hurbain et al., 2008; Watt et al., 2009). Ces clivages libèreraient le domaine PKD (cœur des fibres) du RPT et d'une partie du domaine NTR (**Figure 13 et 14**) (Leonhardt et al., 2011).

Les études s'accordent sur le fait que le clivage de PMEL par la s2p se déroule dans des compartiments au pH acide de type mélanosome de stade I (dont dépendrait l'activité de l'enzyme s2p) (Raposo et al., 2001; Theos, Berson, et al., 2006). L'évènement de clivage de PMEL par s2p est concomitant à son tri dans les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri. Une fois arrivée dans les mélanosomes de stades I, PMEL se localise dans leur lumière où elle s'accumule. Pour ce faire PMEL subit une étape de tri sur des ILV. Plus précisément, ce sont les fragments M $\alpha$ -M $\beta$ N liés de PMEL issus de son clivage par la s2p qui sont triés et qui s'accumulent sur les ILV des mélanosomes de stade I - seul un infime pourcentage de CTF est associé aux ILV (Berson et al., 2001; Raposo et al., 2001; Theos, Berson, et al., 2006; van Niel et al., 2011). Les ILV sont formées par invagination de la membrane limitante des mélanosomes de stade I (**Figure 13 et 14**).



PMEL

Figure 14 : Clivage de PMEL.

PMEL est synthétisée dans le RE sous une forme P1 immature. Pour former les fibres amyloïdes dans les prémélanosomes, PMEL subit plusieurs étapes de clivages séquentiels. PMEL (P2) est tout d'abord clivée par une proprotéine convertase (PC) générant un domaine luminal appelé Mα et un domaine transmembranaire Mβ. Les deux domaines Mα et Mβ demeurent liés par un pont disulfure. Ensuite, un second clivage par une protéase inconnue (s2p) qui s'effectue dans le domaine Mβ assure la libération du domaine Mα (sous la forme Mα-MβN liés), ainsi que de la formation d'un petit fragment transmembranaire appelé CTF. Le CTF est par la suite clivé par la γ-sécrétase, ce qui libère un domaine cytosolique ICD. Enfin, plusieurs clivages qui s'effectuent dans le domaine Mα permettent sa maturation en fibres amyloïdes. Le domaine KLD est excisé, ainsi que le RPT et une partie du NTR. Le PDK avec le fragment restant du NTR forment ensuite le cœur des fibres amyloïdes par oligomérisation, et cette structure est stabilisée par l'association du domaine RPT (encart). (PS : peptide signal, S-S : pont disulfure) (adapté de Watt B., 2013).

Les ILV commencent à se former dans les domaines vacuolaires des endosomes précoces, et s'accumulent lors de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs (CMV). Dans la grande majorité des cellules, les ILV sont connues pour accumuler des cargos transmembranaires qui sont destinés à être dégradés dans les lysosomes. Ces cargos, tels que le récepteur à l'EGF, sont ubiquitinés sur des lysines ou cystéines de leur domaine cytoplasmique pour être adressés aux ILV. L'ubiquitine va permettre le recrutement de la machinerie ESCRT qui participe au tri des cargos et à la formation des ILV (Hurley and Hanson, 2010; Raiborg and Stenmark, 2009). Dans le mélanocyte, la fonction des CMV est détournée de la dégradation lysosomale pour réguler la formation des fibres de PMEL et permettre l'initiation de la mélanogenèse. Ainsi dans les mélanosomes de stades I, le tri de PMEL sur ces ILV est indépendant de l'ubiquitine et de la machinerie ESCRT (Theos, Truschel, et al., 2006). Des études récentes dans le laboratoire, auxquelles j'ai pu participer au cours de mon Master (voir article dans la partie Annexes), ont montré l'implication de la tétraspanine CD63 et des domaines PKD et NTR de PMEL dans le tri du Mα sur les ILV (Theos, Truschel, et al., 2006; van Niel et al., 2011). Des formes mutées de PMEL ne possédant pas de domaine PKD ou NTR ne sont pas triées sur les ILVs et ne peuvent pas produire de fibres. Parallèlement, ces études ont montré que si le fragment Ma est trié d'une façon ESCRT-indépendante, le CTF est quant à lui trié d'une façon ESCRT-dépendante. Le CTF de PMEL est ubiquitiné (directement ou indirectement). Le CTF est retenu à la membrane limitante du mélanosome de stade I (au niveau du manteau de clathrine contenant ESCRT 0) pour être dégradé, par la y-sécrétase, dans les lysosomes de façon ESCRTdépendante (van Niel et al., 2011). Le tri et la dégradation d'autres protéines mélanosomales (notamment OA1) fait intervenir à divers degrés la machinerie ESCRT (Giordano et al., 2011). La suppression de la tétraspanine CD63 dans une lignée mélanocytaire résulte en une dégradation des deux domaines Ma et CTF de PMEL par la voie ESCRT-dépendante ; cela suggère que CD63 est nécessaire à la ségrégation de ces deux domaines vers deux voies de tri distinctes (van Niel et al., 2011). Les tétraspanines sont des protéines à quatre domaines transmembranaires connues pour s'organiser en microdomaines au niveau des membranes et qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Charrin et al., 2009). CD63 formerait des micro-domaines au niveau de la membrane limitante du mélanosome de stade I et par son interaction avec PMEL favoriserait la séquestration puis le tri de PMEL sur les ILV (Figure 15). La microscopie électronique à 3 dimensions (tomographie électronique), suggère que le processus de nucléation des fibres s'effectue à partir de ces ILV (Hurbain et al., 2008) (Figure 16). En accord avec ces observations, la formation des ILV ainsi que le tri de PMEL

sur ces ILV sont essentiels à la formation des fibres. En effet, la déplétion de CD63 altère la formation des ILV dans les mélanosomes de stades I, ce qui abroge la formation des fibres dans ces compartiments (van Niel et al., 2011). De plus, les fibres issues de l'expression ectopique de PMEL dans des cellules non pigmentées telles que les HeLa s'accumulent dans des CMV (Berson et al., 2001; Berson et al., 2003).



Figure 15 : Trafic et tri de PMEL.

Après un adressage du TGN à la membrane plasmique (1) puis une endocytose (2) PMEL se localise dans la lumière des mélanosome de stades I (3). Pour ce faire PMEL subit une étape de tri sur des ILV. Le tri de PMEL sur ces ILV est indépendant de l'ubiquitine et de la machinerie ESCRT, mais il implique la formation de microdomaines formés à partir de la tétraspanine CD63 au niveau de la membrane limitante des mélanosomes de stades I. Ces microdomaines s'invaginent pour former les ILV sur lesquelles PMEL se localise. Le tri de PMEL sur les ILV est concomitant à son clivage, assurant ainsi la formation des fibres amyloïdes. La forme P2 (clivée par la PC) de PMEL se retrouve au niveau de la membrane limitante du mélanosome de stade I. Au niveau du mélanosome de stade I, elle est clivée par la protéase s2p pour libérer le domaine M $\alpha$  (+M $\beta$ N) ), qui est trié sur les ILV de façon CD63 dépendante et ESCRT indépendante. Sur les ILV, M $\alpha$  est clivée à plusieurs reprises pour libérer le fragment amyloïdogéniqe de PMEL. Le CTF de PMEL quant à lui suit un mécanisme de tri dépendant de la machinerie ESCRT pour être dégradé dans les lysosomes (adapté de Raposo G. et Marks M., 2007 et de Watt B., 2013).



Figure 16 : Nucléation des fibres de PMEL à partir des ILV dans les mélanosomes de stade I.

La microscopie électronique à 3 dimensions (tomographie électronique) suggère que le processus de nucléation des fibres s'effectue à partir des ILV des mélanosomes de stade I, comme le montre l'étroite apposition des fibres en formation et des ILV (Hurbain et al., 2008). (En rouge : la membrane du mélanosome de stade I, en or : les fibres de PMEL, en vert et bleu : les ILV ; la flèche noire indique une ILV associée aux fibres amyloïdes).

Trois hypothèses pourraient expliquer pourquoi la formation de ces ILV est essentielle à la formation des fibres de PMEL : 1) il est possible que le domaine luminal de PMEL puisse interagir avec des groupes lipidiques enrichis uniquement sur les ILV (cholestérol et glycosphingolipides), et que cette interaction puisse favoriser (voir accélérer) son réarrangement conformationnel en fibres amyloïdes ; 2) la liaison du M $\beta$ N au M $\alpha$  (pont disulfure) augmentant sa solubilité (Hoashi et al., 2010), l'association du M $\alpha$  aux ILV faciliterait sa dissociation du M $\beta$ N, ce qui serait suffisant pour initier la formation d'amyloïdes ; 3) il est possible qu'un facteur présent sur les ILV favorise la formation des amyloïdes à partir du M $\alpha$ .

La maturation progressive des fibres en feuillets compacts dans le mélanosome de stade I, s'accompagne d'une disparition des ILV - qui fusionneraient avec la membrane limitante du mélanosome de stade I ou seraient dégradées par des lipases (Hurbain et al., 2008). L'apparition de ces feuillets compacts marque la ségrégation entre la voie endosomal et la voie mélanosomale (voir partie 1.4.3.3.) (Raposo et al., 2001). Cependant, PMEL n'intervient pas dans cette ségrégation. En effet, dans les mélanocytes dérivés de souris *Pmel-/-* ou de souris *silver*, la formation des fibres est bien abrogée mais les protéines mélanosomales sont toujours bien ségrégées des autres protéines (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006). Les mécanismes impliqués dans cette ségrégation ne sont pas clairs mais ils feraient intervenir des protéines mélanosomales telle que OA1 (voir partie 1.4.3.2) (Giordano et al., 2009; Giordano et al., 2011; Theos, Truschel, et al., 2006; Watt et al., 2011).

## 1.4.4.7. Régulation de la fibrillogenèse de PMEL

La prémélanogenèse repose sur la formation de fibres amyloïdes dérivant du clivage séquentiel de la protéine PMEL. La non régulation de la formation de fibres amyloïdes peut avoir des effets toxiques, comme observés dans certaines pathologies amyloïdes et dans le cas de mutants non fonctionnels de PMEL (Theos, Truschel, et al., 2006; Watt et al., 2011). Le mélanocyte doit donc mettre en place divers mécanismes afin de réguler la formation d'amyloïdes et d'éviter leur toxicité.

Les fibres amyloïdes de PMEL sont détectables seulement dans les mélanosomes de stade I et II. Cependant, PMEL est exposée à divers environnements car elle doit transiter de son lieu de synthèse à sa destination finale, le mélanosome. Aucun agrégat ni aucune fibre ne sont observés dans le RE, le Golgi, le TGN et à la membrane plasmique. En effet les formes entières de PMEL (P1 immature, P2 mature, P2 clivée par la PC) sont incapables de former des fibres dans ces compartiments et les domaines M $\alpha$  et M $\beta$  sont toujours liés par un pont

disulfure après le clivage par la PC (empêchant ainsi une libération trop précoce du Mα) (Hoashi et al., 2005). De plus, les formes de PMEL sécrétées à la membrane plasmique sont solubles et ne se présentent pas sous forme de fibres. Cette « compartimentalisation » est donc un mécanisme important pour la formation d'amyloïdes dans des conditions physiologiques (Klein et al., 2001). Non seulement la formation des fibres de PMEL est limitée aux mélanosomes de stade I mais elle est de plus « sub-compartimentalisée » au niveau des ILV. En séquestrant PMEL sur les ILV, la fibrillogenèse de PMEL est restreinte à la lumière du mélanosome, empêchant ainsi toute interaction non désirée voir délétère avec la membrane limitante ou les protéines fonctionnelles qu'elle contient. L'utilisation d'un mécanisme ESCRT-indépendant pour le tri de PMEL sur les ILV permettrait d'améliorer la ségrégation de PMEL des autres cargos qui sont eux destinés aux ILVs de la voie ESCRT-dépendante. Parallèlement à cette compartimentalisation, un clivage séquentiel de PMEL est assuré par différentes enzymes permettant ainsi une régulation spatio-temporelle de fibrillogenèse de PMEL.

Le second mécanisme que la cellule pigmentaire pourrait utiliser pour éviter toute toxicité liée aux amyloïdes, serait la régulation de la vitesse de la formation des fibres. Même si cela est encore soumis à controverse, de nombreuses études suggèrent que ce sont les oligomères amyloïdes qui sont toxiques et non pas les fibres amyloïdes (De Strooper et al., 2010; Fowler et al., 2007). Si cette hypothèse est vraie, la formation rapide de fibres préviendrait la toxicité associée à la formation d'amyloïdes. *In vitro*, M $\alpha$  forme des fibres amyloïdes très vite (plusieurs minutes) et très efficacement comparé aux fibres amyloïdes pathologiques qui ont besoin de plusieurs jours (et sûrement de mois ou d'années *in vivo*) pour se former (Fowler et al., 2006; Watt et al., 2009). Dans les mélanocytes aussi la polymérisation du M $\alpha$  est très rapide; des analyses de la maturation de PMEL par pulse-chase montrent que le M $\alpha$ commence à être incorporé dans les fibres dans l'heure qui suit sa formation (Berson et al., 2001). Enfin, des analyses par microscopie électronique (en utilisant la congélation à haute pression ou HPF pour High Pressure Freezing) montrant des fibres naissantes au niveau de domaines du mélanosome de stade I en train de s'invaginer, supportent l'idée que la cinétique de formation des fibres de PMEL soit très rapide *in vivo* (Hurbain et al., 2008).

Un troisième mécanisme pourrait être utilisé pour réguler la fibrillogenèse de PMEL. Il s'agit de la « protection » du PKD formant le cœur des fibres, par le domaine hydrosoluble RPT. Même si le RPT ne constitue pas vraiment les fibres, il y est associé (Kushimoto et al., 2001; Raposo et al., 2001) et cette association permettrait d'éviter l'interaction des fibres en cours de formation avec d'autres éléments présents dans le mélanosome. Dans le même sens, le

RPT assurerait la maturation des fibres en feuillets compacts, ce qui devrait également éviter leur association hasardeuse avec des protéines du mélanosome.

Si ces mécanismes existent dans les cellules pigmentaires, il faut supposer que leur altération via des mutations associées au gène codant pour PMEL devrait conduire à des pathologies. C'est en effet le cas, des mutations du gène codant pour PMEL retrouvées chez des animaux modèles sont associées à des défauts de pigmentation. Ces défauts se traduisent par une hypopigmentation modeste chez la souris *silver* et le cheval *silver*, modérée chez le chien *merle* et sévère chez le poulet *Dominant White* (Brunberg et al., 2006; Clark et al., 2006; Kerje et al., 2004; Martinez-Esparza et al., 1999) (Figure 17).



Figure 17 : Pigmentation chez les modèles animaux mutants Pmel et Pmel-/-.

Des mutations associées à *Pmel* affectent la pigmentation de plusieurs animaux modèles comme : le poulet *Dominant White* (sévère), le chien *merle* (modéré) et la souris *silver* (modeste). (Voir Annexes pour les sources des photos prises sur Internet). Le défaut de pigmentation chez les souris *Pmel-/-* passe quant à lui inaperçu (très modeste) (Hellstrom et al., 2011)

Dans le modèle du poulet Dominant White, les mutations touchant Pmel sont des mutations dominantes (gain de fonction), associées à une perte totale de la pigmentation (Kerje et al., 2004). Des études dans des cellules non pigmentaires exprimant la protéine PMEL humaine recombinante hPMEL<sup>insWAP</sup> (correspondant un l'orthologue de la protéine PMEL mutée chez le poulet Dominant White) ont démontré que la maturation, le trafic et le clivage de cette protéine mutante n'étaient pas altérés (Watt et al., 2011). Cependant, ces études ont aussi montré que l'expression de ce mutant hPMEL<sup>insWAP</sup> dans des mélanocytes engendrait une agrégation aberrante de structures de PMEL (Figure 18). De manière intéressante, cette formation d'agrégats aberrants de PMEL est abolie lorsque le trafic du mutant hPMEL<sup>insWAP</sup> au mélanosome de stade I est perturbé. La formation d'agrégats n'est pas le seul phénotype observé dans les mélanocytes exprimant le mutant hPMEL<sup>insWAP</sup>. Une perte de l'intégrité des mélanosomes (diminution du nombre de mélanosomes), une diminution de la viabilité des mélanocytes, et une perte de la pigmentation sont également observées (Watt et al., 2011). Les Mutations chez le poulet Dominant White se situent dans le domaine transmembranaire de PMEL et ces mutations perturbent la pré-oligomérisation de PMEL (association de protéines entières de PMEL entre elles) ainsi que son association aux membranes (Kerje et al., 2004). Cette pré-oligomérisation des protéines de PMEL permettrait d'accélérer la cinétique de formation des fibres de PMEL. Une absence de pré-oligomérisation engendrerait la formation d'agrégats toxiques au dépend de structures organisées non toxiques. La toxicité de ces agrégats provoquerait une perte de l'intégrité membranaire au niveau des mélanosomes ainsi qu'une diminution de la viabilité des mélanocytes (à cause du relargage du contenu toxique des mélanosomes) résultant en une perte de la pigmentation. Il se pourrait également que ces agrégats amyloïdes de PMEL induisent une mauvaise incorporation des intermédiaires de la mélanine dans le mélanosome et/ ou leur mauvaise conversion en mélanine, ce qui serait également toxique pour le mélanocyte. Ceci expliquerait pourquoi les défauts de pigmentation chez les animaux modèles où PMEL est mutée sont plus sévères que ceux observés chez les souris ou PMEL est absente (Pmel-/-) (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011; Watt et al., 2013) (Figure 17).

Toutes ces observations, démontrent que la formation de fibres de PMEL, si elle n'est pas correctement régulée, peut perturber la mélanogenèse. Dans certains cas le défaut de mélanogenèse est flagrant car la pigmentation est plus ou moins affectée (poulet *Dominant White* et souris *silver* respectivement), dans d'autres cas il peut passer inaperçu car la pigmentation n'est quasiment pas touchée (souris *Pmel-/-*) (Figure 17 et 18).



Figure 18 : Phénotypes associés aux mutations de Pmel et à Pmel-/-.

La microscopie électronique a permis de mettre en évidence les défauts affectant la mélanogenèse, induits par des mutations de *Pmel* ou sa déplétion. Dans une lignée de cellules murines exprimant la forme mutée *silver* de *Pmel*, ces défauts se traduisent par la formation de mélanosomes géants, ronds (absence de fibres), remplis de mélanine ; alors que les cellules contrôles présentent des mélanosomes de forme allongée (Theos, Berson, et al., 2006). (Barre d'échelle, 500 nm). Dans les cellules *Pmel-/-*, les mélanosomes sont également de forme ronde à cause de l'absence de fibres de PMEL (par rapport aux cellules contrôle *Pmel+/+*) et sont toujours pigmentés mais le dépôt de mélanine est anormal (apparence granuleuse) (Hellstrom et al., 2011). (II, III et IV : indiquent les stades de mélanosomes, les flèches indiquent les mélanosomes allongés par la présence de fibres de PMEL, les têtes de flèches indiquent des mélanosomes avec des dépôts de mélanine anormaux). (Barre d'échelle, 500 nm). Dans une lignée de mélanocytes exprimant un mutant *Dominant White* de *Pmel*, la mélanogènese est très affectée : il y a très peu de mélanosomes tardifs et les mélanosmes précoces forment des agrégats aberrants de PMEL (Watt et al., 2011). (II, III et IV indiquent les stades de mélanosomes). (Barre d'échelle, 500 nm).

En résumé, la protéine structurale PMEL est nécessaire à la fonction des mélanosomes car elle optimise la synthèse et le transfert de la mélanine en formant des fibres amyloïdes. Ces fibres amyloïdes séquestrent et concentrent la mélanine dans les mélanosomes tout en protégeant la cellule pigmentaire des intermédiaires toxiques de ce pigment. Cependant, la formation des fibres amyloïdes représente un véritable challenge pour la cellule pigmentaire car une mauvaise organisation de ces fibres peut s'avérer toxique. C'est pourquoi la fibrillogenèse de PMEL est finement régulée à différent temps (trafic, clivage, tri, etc.) par divers mécanismes (compartimentalisation, cinétique de formation des fibres, etc.). La formation des fibres de PMEL définit la prémélanogenèse qui est une étape initiatrice de la formation d'un compartiment mélanosomal correctement structuré. Une fois cette structure établie, la synthèse de la mélanine peut débuter et se poursuit jusqu'à la maturation complète du mélanosome.

#### 1.4.5. La mélanogenèse tardive et la maturation des mélanosomes

La mélanogenèse tardive repose sur l'adressage des protéines mélanosomales impliquées dans la synthèse de la mélanine - telles que la tyrosinase, TYRP1, OCA2 et ATP7A - aux mélanosomes en cours de maturation. Pour véhiculer ces protéines vers les mélanosomes, la cellule doit mettre en place des systèmes de reconnaissance qui permettent leur identification et leur tri spécifique. La plupart de ces protéines mélanosomales sont des protéines transmembranaires dont le domaine cytoplasmique possède des signaux d'adressage au mélanosomes (Blagoveshchenskaya et al., 1999; Calvo et al., 1999; Honing et al., 1998; Simmen et al., 1999; Vijayasaradhi et al., 1995). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance de ces signaux font intervenir des complexes protéiques qui ont été mis à jour grâce à l'étude d'une maladie génétique autosomale récessive, le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS). Le HPS est une maladie multisystémique caractérisée par de nombreux symptômes dont un albinisme oculaire ou oculo-cutané. Ces nombreux symptômes sont dus à l'altération de la formation ou de la fonction de LRO, dont notamment les mélanosomes. Le HPS résulte de la mutation de gènes codant pour les sous-unités protéiques de complexes multimériques qui participent à diverses étapes du trafic intracellulaire (Wei, 2006). Bien qu'ils soient ubiquitaires, ces complexes se révèlent particulièrement essentiels à la biogenèse de certains LRO, tels que les mélanosomes (Raposo and Marks, 2007; Raposo et al., 2007). On peut citer comme exemple le complexe adaptateur hétérotétramériques AP-3 (adaptor protein-3). Dans la majorité des types cellulaires, les protéines cargos triées par AP-3 sont adressées aux endosomes tardifs ou aux lysosomes (Bonifacino and Traub, 2003). Dans les cellules pigmentaires, AP-3 interagit avec la tyrosinase et participe à son transport vers les mélanosomes. En effet, dans les mélanocytes issus de patients atteints de HPS de type 2 ou de leurs modèles murins associés (*pearl* ou *mocha*), portant une mutation dans une des sousunités du complexe AP-3, la tyrosinase s'accumule dans les endosomes. Cela conforte l'idée, qu'en plus d'adapter la voie d'endocytose, les mélanocytes exploitent les protéines ubiquitaires associées à divers mécanismes moléculaires intracellulaire, afin d'assurer la formation et la fonction des mélanosomes.

## 1.4.5.1. Les mécanismes d'adressage des protéines mélanosomales aux mélanosomes en cours de maturation : l'exemple d'AP-1 et de TYRP1

AP-1 n'est pas muté dans le HPS mais il est apparenté à AP-3. Ces adaptateurs sont connus pour reconnaître et interagir avec des signaux (di-leucine) situés dans les domaines cytoplasmiques de protéines transmembranaires, et permettre ainsi leur séquestration dans des intermédiaires de transport. Ces intermédiaires sont ensuite acheminés vers un compartiment avec lequel ils fusionnent pour y délivrer leur contenu. Dans les mélanocytes, AP-1 interagit avec TYRP1 et participe à son transport vers les mélanosomes via des intermédiaires de transport tubulovésiculaires (Theos, Tenza, et al., 2005). L'utilisation de la tomographie électronique a permis de mettre en évidence la présence de contacts tubulaires entre des compartiments de type endosomes de tri et des mélanosomes en cours de maturation (Delevoye et al., 2009) (Figure 19). Ces compartiments endosomaux correspondent aux mélanosomes de stade I qui servent de plate-formes de tri moléculaire dans le mélanocyte. AP-1 se localise dans les intermédiaires de transport tubulovésiculaires au niveau des mélanosomes stades I et en interagissant avec TYRP1 coordonne son tri dans ces intermédiaires de transport (Delevoye et al., 2009; Theos, Tenza, et al., 2005). L'acheminement et le positionnement de ces intermédiaires tubulovésiculaires à proximité des mélanosomes fait intervenir un moteur moléculaire, la kinésine KIF13A (kinesin family), qui en s'associant au réseau de microtubules et en interagissant avec AP-1 et TYRP1, coordonne à la fois le tri et le transport de cette dernière (Delevoye et al., 2009) (Figure 20).



Figure 19 : Contacts entre intermédiaires tubulaires et mélanosome.

L'utilisation de la microscopie électronique à 3 dimensions (tomographie électronique) a permis de mettre en évidence la présence de contacts étroits entre des intermédiaires tubulaires d'origine endosomale et les mélanosomes en cours de maturation (Delevoye et al., 2009). (En rouge : la membrane du mélanosome, en vert : les intermédiaires tubulaires, les flèches indiquent les intermédiaires en contact et en continuité avec le mélanosome). (PM : membrane plasmique, M : mélanosome, ER : réticulum endoplasmique). (Barre d'échelle, 200 nm).



Figure 20 : L'adressage de TYRP1 via AP-1 et KIF13A.

L'adaptateur AP-1 assure le tri de l'enzyme TYRP1 au niveau de sous-domaines du mélanosome de stade I, puis coordonne son adressage depuis le stade I au mélanosome en cours de maturation via des intermédiaires tubulaires. Ces intermédiaires sont acheminés au mélanosome tardif via la kinésine KIF13A qui assure leur positionnement (Delevoye et al., 2009). (MT : microtubule, en marron : TYRP1, en violet : AP-1 et en orange : KIF13A).

#### 1.4.5.2. Autres modulateurs de l'adressage des protéines mélanosomales

Les complexes protéiques comme AP-1 ne sont pas les seuls régulateurs de la maturation des mélanosomes ; l'adressage des protéines mélanosomales telle que TYRP1 aux mélanosomes fait aussi intervenir des SNARE (soluble Nethylmaleimidesensitive facteur [NSF] attachement protein receptors), des Rab et des lipides.

L'observation en microscopie électronique d'une continuité membranaire entre les intermédiaires tubulovésiculaires et les mélanosomes en cours de maturation suggère que des évènements transitoires de fusion membranaire s'établissent, afin de permettre des échanges entre les deux compartiments. Dans les cellules eucaryotes, le processus de fusion membranaire est régi par une famille de protéines appelées SNARE (Martens and McMahon, 2008). Aucune SNARE n'a été directement impliquée dans la fusion des intermédiaires de transport avec les mélanosomes. Cependant, plusieurs SNARE de la voie d'endocytose sont présentes à des taux élevés dans des lignées de mélanocytes (Wade et al., 2001), comme par exemple VAMP7 (ou TI-VAMP pour tetanus-insensitive vesicle associated membrane protein) qui interagit avec l'adapteur AP-3 (Martinez-Arca et al., 2003).

Les petites GTPases Rab sont des régulateurs clés des événements de trafic intracellulaire et plus précisément des modulateurs de l'homéostasie membranaire (formation de vésicules, mouvement des vésicules et fusion des membranes) (Stenmark, 2009; Zerial and McBride, 2001). Plusieurs Rab sont très fortement exprimées dans les mélanocytes (Q. Zhang et al., 2002). Parmi ces Rab se trouvent Rab32 et Rab38 qui sont toutes deux impliquées dans l'adressage des enzymes tyrosinase et TYRP1 au mélanosomes (Wasmeier et al., 2006). Ces deux Rab se localisent au niveau des mélanosomes matures et d'intermédiaires de transport tubulovésiculaires. D'autres Rab, qui ne sont pas enrichies dans les mélanocytes, seraient également impliquées dans ce processus d'adressage. Rab7, qui régule la dynamique des membranes au niveau des endosomes tardifs ainsi que les événements de fusion au niveau des lysosomes, interviendrait dans le trafic de TYRP1 (Hirosaki et al., 2002; Stenmark, 2009). Rab7 est aussi impliquée dans la motilité des mélanosomes dans les mélanocytes (voir partie 1.4.6.) (Jordens et al., 2006). Ceci suggère que maturation et motilité des mélanosomes soient liées.

Les lipides jouent un rôle important des dans le tri des protéines membranaires, notamment les glycosphingolipides qui sont des composants essentiels de la membrane plasmique et des membranes des compartiments endosomaux. Des études ont montré que lorsque la synthèse des glycosphingolipides était altérée, les mélanocytes souffraient d'hypopigmentation sévère dû à un défaut de trafic des enzymes tyrosinase et TYRP1. Dans des mélanocytes déficients en glycosphingolipides, au lieu d'être transportées du TGN aux mélanosomes de stade I/ endosomes de tri, la tyrosinase et TYRP1 se retrouvent à la membrane plasmique. Il semblerait que des interactions directes entre les glycosphingolipides et le domaine luminal des protéines mélanosomales assurent le tri efficace de ces dernières au niveau de membranes endosomales (Groux-Degroote et al., 2008; Sprong et al., 2001).

#### 1.4.6. La motilité des mélanosomes

La maturation des mélanosomes ne se traduit pas seulement par des évènements de trafic et de tri intracellulaire, les mélanosomes en cours de maturation ne sont pas statiques mais se déplacent dans les cellules pigmentaires. Cette motilité est très importante pour la localisation finale des mélanosomes matures à la périphérie cellulaire dans le cas des mélanocytes de l'épiderme, et à la face apicale de l'épithélium dans le cas des cellules de l'EPR.

Dans l'épiderme, le transfert des mélanosomes matures des mélanocytes aux kératinocytes est nécessaire à la pigmentation de la peau et à sa protection lors de son exposition aux rayons UV. Un mélanocyte grâce à ses projections dendritiques peut contacter environ quarante kératinocytes(Fitzpatrick and Breathnach, 1963). Les étapes précédant le transfert sont : le transport des mélanosomes du centre du mélanocyte à sa périphérie, puis leur positionnement aux extrémités dendritiques du mélanocyte sous la membrane plasmique. Pour assurer ce transport et ce positionnement, le mélanocyte utilise deux types de moteurs moléculaires : la kinésine (associée au réseau de microtubules) et la myosine (associée au réseau de filaments d'actine). Dans les mélanocytes de l'épiderme, les mélanosomes sont transportés le long des microtubules, des extrémités (-) aux extrémité (+), via la kinésine-1 conventionnelle (mouvement centrifuge) (Hara et al., 2000) (Figure 21). Une fois que les mélanosomes matures ont atteint la périphérie de la cellule, ils sont relâchés des microtubules et se lient aux filaments d'actine présents sous la membrane plasmique grâce à la myosine Va (Seabra and Coudrier, 2004) (Figure 21). Le rôle de la myosin Va dans l'arrimage des mélanosomes à la périphérie des mélanocytes a été mis en évidence grâce à l'étude d'une autre maladie affectant les LRO, le syndrome de Griscelli (Anikster et al., 2002; Bahadoran et al., 2003). L'étude des mélanocytes issus de patients atteints du syndrome de Griscelli (et des modèles murins associés), a montré que la myosin Va était recrutée aux mélanosomes matures grâce à l'action de deux protéines : une Rab GTPase, Rab27a, et son effecteur la mélanophiline (Fukuda et al., 2002; Strom et al., 2002; Wu et al., 2002). Le complexe Rab27a-mélanophiline-myosin Va coordonne le transfert des mélanosomes du réseau de microtubules au réseau d'actine sous membranaire. Dans le syndrome de Griscelli, les mouvements basés sur le réseau d'actine sont altérés, ce qui a pour conséquence un regroupement des mélanosomes matures dans la région périnucléaire (Bahadoran et al., 2003; Wilson et al., 2000). Ce regroupement est dû au mouvement centripète des mélanosomes des bouts (+) aux bouts (-) des microtubules, via un autre moteur moléculaire associés au réseau de microtubules, la dynéine (Figure 21). Ainsi le système actine-myosine en assurant la capture des mélanosomes à la périphérie, éviterait leur transport rétrograde vers le centre de la cellule par le système dynéine-microtubule. Deux études ont montré le rôle de la dynéine dans le mouvement des mélanosomes. La première étude par le groupe de Jacques Neefjes a montré le rôle de la petite GTPase Rab7, en complexe avec RILP (Rab7-interacting lysosomal protein), dans le recrutement du moteur dynéine aux mélanosomes de stade I à III (Jordens et al., 2006). La deuxième étude par le groupe Mitsunori Fukuda montre le rôle d'une autre protéine, la mélanoréguline (également en complexe avec RILP) dans le recrutement du moteur dynéine aux mélanosomes matures (Ohbayashi et al., 2012).

En résumé, les mélanosomes en cours de maturation sont transportés via la kinésine-1 du centre de la cellule à sa périphérie puis les mélanosomes pleinement matures (stade IV) sont trappés à la périphérie par le complexe Rab27a-mélanophiline-myosine Va. La présence de Rab7 aux mélanosomes de stade I à III maintient ces mélanosomes encore en maturation sur les microtubules (Figure 21). Ce système permettrait au mélanocyte de bien séparer les mélanosomes en fonction de leur stade de maturation et d'optimiser le transfert des mélanosomes pleinement matures aux kératinocytes. Des mécanismes similaires semblent s'appliquer dans les yeux, notamment au niveau de l'EPR où les mélanosomes matures se positionnent préférentiellement au niveau de la face apical de l'épithélium (sous les photorécepteurs) grâce au complexe myosin VIIa-Myrip-Rab27a (Myrip pour myosin VIIA and Rab interacting protein) (Futter et al., 2004; Lopes, Ramalho, et al., 2007). Ces mélanosomes matures ne sont pas transférés à un autre type cellulaire, mais il semblerait que leur positionnement apical à proximité des photorécepteurs soit directement impliqué dans leur fonction dans l'EPR (fusion avec les phagosomes) (voir partie 1.1.2.) (Marmorstein et al., 1998; Schraermeyer et al., 1999).



Figure 21 : La motilité des mélanosomes dans les mélanocytes de l'épiderme.

Dans l'épiderme, la motilité et le positionnement des mélanosomes dans les mélanocytes sont assurés par trois moteurs moléculaires : la kinésine, la myosine et la dynéine. La kinésine assure un transport antérograde des mélanosomes via les microtubules du centre de la cellule à la périphérie (dendrites). La myosine Va assure la rétention des mélanosomes matures au niveau des dendrites du mélanocyte où grâce à l'actine les mélanosomes conservent une certaine motilité. Enfin, la dynéine permet un transport rétrograde des mélanosomes non matures de la périphérie au centre de la cellule (adapté de Jordens I. et al., 2006).
Si la bonne maturation des mélanosomes est liée leur motilité, elle semble également dépendre de contacts avec d'autres organites intracellulaires. En effet, des études récentes ont montré que les mélanosomes établissaient des contacts étroits avec les mitochondries, et que ces contacts étaient importants pour leur formation (Daniele et al., 2014). De plus, l'utilisation de la tomographie électronique dans le laboratoire a également montré des contacts étroits entre mélanosomes et réticulum endoplasmique (travaux non publiés). Ces contacts permettraient l'échange de facteurs importants pour la maturation des mélanosomes. Cela expliquerait pourquoi des analyses protéomiques ont révélé la présence de protéines du réticulum endoplasmique associées aux mélanosomes (Basrur et al., 2003; Chi et al., 2006; Kushimoto et al., 2001). Une autre équipe a montré que des contacts entre endosomes et RE s'établissaient précocement et qu'ils étaient de plus en plus étroits au fur et à mesure que les endosomes maturent (Friedman et al., 2013). Une autre étude a montré que des contacts étroits entre endosomes tardifs et RE se formaient grâce à un complexe composé des protéines Rab7, RILP et ORP1L (oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 1L) (Rocha et al., 2009). ORP1L est un senseur de cholestérol, elle peut changer de conformation en fonction du taux de cholestérol présent dans les endosomes tardifs. Si le taux de cholestérol est élevé, ORP1L adopte une conformation fermée, ce qui permet à Rab7 et RILP de recruter le moteur la dynéine au niveau des endosomes tardifs, assurant ainsi leur positionnement en région périnucléaire (par transport rétrograde). Lorsque le taux de cholestérol est faible, ORP1L adopte une conformation ouverte, lui permettant d'interagir directement avec une protéine du RE appelée VAP (VAMP [vesicle-associated membrane protein]-associated ER protein) (Rocha et al., 2009) (Figure 22). Comme vu plus haut, Rab7 et RILP sont impliquées dans la motilité et le positionnement des mélanosomes dans les mélanocytes (Jordens et al., 2006). On peut donc supposer que les protéines ORP1L et VAP pourraient être impliquées dans le positionnement des mélanosomes et dans la formation des contacts RE-mélanosomes. Plus récemment la protéine STARD3, un transporteur potentiel du cholestérol aux endosomes, a également été identifiée comme étant un interactant de VAP et serait également impliquée dans les contacts RE-endosomes (Alpy et al., 2013). Ces contacts RE-endosomes permettraient d'assurer des échanges de cholestérol entre les deux compartiments (van der Kant and Neefjes, 2014).

Ainsi la maturation des mélanosomes reposerait sur une combinaison d'événement de trafic, de tri, de motilité et de contacts inter-organites faisant intervenir des protéines ubiquitaires et des mécanismes cellulaires universels.



Figure 22 : ORP1L contrôle le positionnement des endosomes tardifs et les contacts RE-endosomes.

ORP1L est une protéine associée à la membrane des CMV. Elle forme un complexe avec les protéines Rab7 et RILP. ORP1L possède un domaine ORD lui permettant de « sentir » le cholestérol présent au niveau des CMV. Lorsque le taux de cholestérol est élevé, ORP1L se replie et son domaine ORD se lie au cholestérol membranaire. Ce changement de conformation permet au complexe Rab7-RILP de recruter la dynéine au niveau du CMV, assurant un transport rétrograde du compartiment. Lorsque le taux de cholestérol est faible, ORP1L se déplie. Ce changement de conformation ne permet plus au complexe Rab7-RILP de recruter la dynéine au niveau du CMV. Le compartiment est alors acheminé via une kinésine (par transport antétrograde) à la périphérie cellulaire. Ce changement de conformation favorise également l'interaction d'ORP1L avec une protéine du RE nommée VAP. L'interaction ORP1L-VAP permet de former des contacts étroits entre CMV et RE. Ces contacts favorisent l'échange de facteurs entre les deux compartiments, qui sont importants pour leur maturation (adapté de Rocha N. et al., 2009). (ORD : OSBP-related domain, capable de lier le cholestérol ; FFAT : two phenylalanines [FF] in an acidic tract, le domaine d'interaction avec VAP; PH : pleckstrin homology domain, se lie aux phosphoinositides). L'encart montre l'étroite apposition d'un endosome (en jaune) et du RE (en vert) observés en tomographie électronique (Friedman et al., 2013). (En bleu : les microtubules, en rouge : la zone de contact entre RE et endosome, les flèches indiquent les contacts entres microtubules et le RE). (Barre d'échelle, 200 nm).

# PARTIE 2. Contexte du travail de thèse

Le travail que j'ai effectué durant ma thèse, se situe dans le contexte très particulier de la formation des fibres mélanosomales à partir de la protéine structurale PMEL au cours de la prémélanogenèse. Ces fibres de PMEL sont nécessaires à la structure correcte du mélanosome et optimisent la synthèse de la mélanine. Le détail important, réside dans le fait que ces fibres mélanosomales possèdent toutes les caractéristiques de structures amyloïdes qui sont surtout connues pour être associées à des pathologies. Les fibres de PMEL ont été les premières amyloïdes physiologiques et fonctionnelles décrites chez les mammifères. De part leur nature amyloïde, la formation de ces fibres se doit d'être très finement régulée. L'une des étapes majeures dans la régulation de la formation de ces fibres est le clivage séquentiel de la protéine PMEL par différentes enzymes. Mise à part la PC et la y-sécrétase, les autres enzymes impliquées dans le clivage de PMEL (permettant la libération du domaine luminale et la maturation des fibres) demeurent inconnues. La détermination de ces enzymes est pourtant primordiale à la compréhension des mécanismes régulant la formation des fibres de PMEL. C'est dans ce contexte que j'ai cherché à déterminer quelle(s) enzyme(s) étai(en)t responsable(s) du clivage juxtamembranaire de PMEL - permettant la libération du domaine fibrillogénique Ma dans la lumière du mélanosome. Pour cela, je me suis basée sur des analogies (notamment en terme de clivage) entre PMEL et l'APP (Amyloid beta Precursor Protein), la protéine à l'origine de la Maladie d'Alzheimer.

### 2.1. Analogies entre PMEL et APP

APP est une protéine ubiquitaire, mais elle est fortement exprimée dans les cellules du cerveau (notamment les neurones). APP est une protéine qui possède de nombreuses similitudes avec PMEL, notamment au niveau de son clivage et de son trafic. Comme PMEL, APP est une protéine transmembranaire de type I qui suit la voie des protéines sécrétées (RE, Golgi, membrane plasmique), et la voie d'endocytose (clathrine/ AP-2 dépendante). Comme PMEL, APP peut-être clivée à la membrane plasmique pour libérer une portion luminale soluble dans le milieu extracellulaire. Comme PMEL, APP est une protéine dont le clivage dans des compartiments endosomaux peut libérer une portion capable de former des amyloïdes. Enfin, dans les deux cas (clivage à la membrane plasmique ou clivage dans les endosomes), un domaine intracytoplasmique (ICD) est formé, comme pour PMEL (Sannerud and Annaert, 2009). De manière tout à fait intrigante, l'analogie de clivage entre PMEL et

APP peut-être étendue jusqu'aux enzymes impliquées dans le clivage de l'APP. Ces enzymes sont appelées sécrétases.

### 2.1.1. Les sécrétases : analogie de clivage entre PMEL et APP

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui est associée à l'accumulation anormale et l'agrégation toxique d'un peptide dans le cerveau, le peptide bêta-amyloïde ou  $A\beta$ . Le peptide  $A\beta$  est connu pour former des fibres amyloïdes dont les dépôts extracellulaires forment des « plaques séniles ». Le peptide  $A\beta$  résulte du clivage séquentiel de la protéine APP par des protéases transmembranaires nommées sécrétases. Les deux formes les plus extrêmes du peptide  $A\beta$  c'est à dire les monomères d' $A\beta$  et les fibres d' $A\beta$ , ne présentent qu'un insignifiant degré de toxicité. Seuls les oligomères d' $A\beta$  solubles ont un réel potentiel toxique (De Strooper et al., 2010).

Dans une voie dite « amyloïdogénique », APP est d'abord clivée par la β-sécrétase BACE1  $(\beta$ -site of APP Cleaving Enzyme 1) dans son domaine luminal. Ce clivage libère une forme soluble APPs $\beta$  (APP soluble  $\beta$ ) et forme un fragment C-ter appelé APP-CTF $\beta$ . APP-CTF $\beta$  est ensuite clivé par le complexe  $\gamma$ -sécrétase dans son domaine transmembranaire, libérant ainsi le peptide Aß qui a un caractère amyloïdogène neurotoxique. Ce second clivage libère également un fragment AICD (APP IntraCellular Domain) dans le cytoplasme (Thinakaran and Koo, 2008) (Figure 23). Cette voie amyloïdogénique n'est pas majoritaire dans une situation normale, où seulement 10% de l'APP est clivée par BACE1 (Sannerud and Annaert, 2009). Elle ne devient majoritaire que dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Les principaux facteurs de risque de la maladie sont liés à l'environnement, au mode de vie et à l'âge (forme sporadique de la maladie). Des études montrent que l'expression et activité de BACE1 dans le cerveau augmentent avec le vieillissement de l'organisme, et que l'activité de BACE1 est sensible à différents stress environnementaux. Il existe également un très faible pourcentage de personnes atteintes d'une forme héréditaire (ou familiale) et précoce de la maladie (mutations au niveau des gènes codant pour l'APP, ou pour la sous-unité catalytique du complexe  $\gamma$ -sécrétase). Les personnes atteintes de trisomie 21 (Down syndrome) ont aussi un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer, car le gène de l'APP est présent sur le chromosome 21 (Cheon et al., 2008). Différentes études suggèrent que les endosomes seraient le lieu privilégié de la production des peptides Aβ. La formation de ces peptides est fortement diminuée lorsque l'endocytose ou le trafic de l'APP dans les endosomes sont perturbés (accumulation à la membrane plasmique ou dans le TGN respectivement) (Carey et al., 2005; Fjorback et al.; Koo and Squazzo, 1994). De plus, l'activité de BACE1 est optimale dans des compartiments à pH acide tels que les endosomes où elle se localise (Sannerud and Annaert, 2009; Vassar et al., 1999). Plus précisément les peptides  $A\beta$  seraient produits au niveau des endosomes tardifs/ CMV (Almeida et al., 2006). Une étude a montré que ces peptides se formaient en association avec les ILV, et qu'après fusion du CMV avec la membrane plasmique, ils étaient sécrétés dans le milieu extracellulaire en association avec les exosomes pour ensuite former les fibres amyloïdes et les plaques séniles (Rajendran et al., 2006). Cependant, on ne peut pas exclure que des oligomères d'A $\beta$  toxiques soient formés au niveau des endosomes, induisant une mort cellulaire (par perte de l'intégrité membranaire et atteinte des composants du cytoplasme) (Kayed et al., 2003; Kayed et al., 2004). Cette mort cellulaire serait suivie d'un relargage du contenu cytoplasmique du neurone dans le milieu extracellulaire, et donc des oligomères d'A $\beta$  toxiques, qui formeraient ensuite les fibres amyloïdes et les plaques de serve de serve dans le milieu extracellulaire et atteinte des composants du cytoplasme) (Kayed et al., 2003; Kayed et al., 2004). Cette mort cellulaire serait suivie d'un relargage du contenu cytoplasmique du neurone dans le milieu extracellulaire, et donc des oligomères d'A $\beta$  toxiques, qui formeraient ensuite les fibres amyloïdes et les plaques séniles.

Dans une situation normale (voie non amyloïdogénique), APP est d'abord clivée par une  $\alpha$ sécrétase, notamment ADAM10 (A Disintegrin And Metallopeptidase 10), au niveau d'un site de coupure différent de celui de BACE1. Ce clivage libère une forme soluble APPs $\alpha$  (APP soluble  $\alpha$ ) et forme un fragment C-ter APP-CTF $\alpha$ . APP-CTF $\alpha$  est ensuite clivée par le complexe  $\gamma$ -sécrétase pour libérer une forme soluble extracellulaire p3 (non neurotoxique) qui est une forme tronquée du peptide A $\beta$ . Ce second clivage libère également un fragment AICD dans le cytoplasme (Thinakaran and Koo, 2008) **(Figure 23)**.



Voie amyloïdogénique

Voie non-amyloïdogénique

Figure 23 : Le clivage de l'APP.

L'APP est une protéine transmembranaire de type I, possédant un long domaine luminal (N-ter) et un court domaine cytoplasmique (C-ter). Dans la voie amyloïdogénique, APP est clivée par une  $\beta$ -sécrétase, libérant un fragment soluble APPs $\beta$  et formant un fragment transmembranaire APP-CTF $\beta$ . Ce clivage après intervention du complexe  $\gamma$ -sécrétase, libère le peptide A $\beta$  entier qui a un caractère amyloïdogène neurotoxique. Dans la voie non amyloïdogénique, APP est clivée par une  $\alpha$ -sécrétase au niveau d'un site de coupure différent de celui de la  $\beta$ -sécrétase pour libérer le fragment soluble APPs $\alpha$ . Puis le fragment transmembranaire résultant de ce clivage, APP-CTF $\alpha$ , est clivé par le complexe  $\gamma$ -sécrétase libérant ainsi une forme extracellulaire p3 non neurotoxique (qui est une forme tronquée du peptide A $\beta$ ). Dans les deux voies l'intervention de la  $\gamma$ -sécrétase aboutit à la formation d'un domaine cytosolique AICD.

### 2.1.1.1. Le complexe y-sécrétase

La y-sécrétase est un complexe multi-protéique transmembranaire comprenant 4 protéines : la préséniline qui est une aspartique protéase et qui assure l'activité catalytique, la nicastrine, Aph-1 (anterior pharynx defective-1) et Pen-2 (presenilin enhancer-2) (De Strooper et al., 2010). Il existe deux isoformes de la préséniline : PS1 (préséniline 1) et son homologue PS2. Dans les neurones, PS1 est la préséniline qui assure la majorité de l'activité du complexe ysécrétase, et sa déplétion aboutit à une abolition quasi-complète de la formation du peptide Aβ. Des mutations faux sens localisées dans les gènes codant pour PS1 et PS2 sont à l'origine de formes familiales de la maladie d'Alzheimer. La  $\gamma$ -sécrétase clive de nombreux substrats (surtout des protéines transmembranaires de type I), impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Parmi ces substrats sont aussi retrouvés APP, Notch, PMEL et les enzymes de la mélanogenèse (la tyrosinase, TYRP1 et DCT) (De Strooper et al., 2010; Kummer et al., 2009; van Niel et al., 2011; R. Wang et al., 2006). Les souris Ps1-/- ont un phénotype létal embryonnaire, mais les Ps2-/- sont viables et le clivage d'APP n'est pas altéré chez ces souris (Herreman et al., 1999; Shen et al., 1997). Au cours de ma thèse j'ai pu participer à des études portant sur le rôle des enzymes PS1 et PS2 dans la mélanogenèse. Ces études, en collaboration avec Ragna Sannerud et Wim Annaert sont en cours de publication et complètent une étude antérieure qui avait déjà montré l'implication de ces deux isoformes dans la pigmentation chez la souris (R. Wang et al., 2006).

La  $\gamma$ -sécrétase clive au niveau du domaine transmembranaire de ses substrats pour en libérer un domaine ICD. Dans le cas de Notch, il a été démontré que son domaine ICD pouvait « transloquer » dans le noyau des cellules et contrôler l'expression de gènes cibles, en s'associant avec des facteurs transcriptionnels (Nagase et al., 2011). Le rôle du domaine ICD de l'APP sur la régulation de sa propre expression est encore soumis à controverse (De Strooper et al., 2010), et celui de l'ICD de PMEL n'a pas encore été étudié.

### 2.1.1.2. Les a-sécrétases

Les α-sécrétases sont des enzymes protéolytiques, qui font parties d'une famille de protéines appelée ADAM. Les ADAM sont des métalloprotéases transmembranaires (elles possèdent des ions zinc dans leur site actif). Elles sont composées : d'une large région extracellulaire divisée en cinq sous-domaines (un pro-domaine, un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine, un domaine riche en cystéines et un domaine de type EGF), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique dont la longueur est extrêmement variable (Alfandari et al., 2009). ADAM9, ADAM10, ADAM17 et ADAM19 ont toutes été reconnues

comme étant des α-sécrétases et ADAM10 semble être l'α-sécrétase majoritaire impliquée dans le clivage de l'APP (De Strooper et al., 2010) (Figure 23). ADAM10 possède de nombreux autres substrats, par exemple la N-cadhérine, la E-cadhérine et Notch, dont elle assure le clivage à la membrane plasmique (« ectodomain shedding »). En clivant ces substrats dans leur région juxtamembranaire, elle assure la sécrétion d'une forme soluble de ces protéines dans le milieu extracellulaire. ADAM10 est ainsi impliquée dans de nombreux processus cellulaires allant du développement embryonnaire, à l'adhésion et signalisation cellulaire. Cela explique pourquoi les souris *Adam10-/-* meurent au cours de leur développement embryonnaire (De Strooper et al., 2010). Même si ADAM10 est un bon candidat dans le clivage juxtamembranaire de PMEL (Kummer et al., 2009), sa localisation à la membrane plasmique (Sannerud and Annaert, 2009) l'impliquerait plutôt dans la libération du domaine extracellulaire de PMEL (comme dans le cas de l'APP) que dans la formation des fibres amyloïdes de PMEL. A l'inverse, les β-sécrétases ont une localisation endosomale; elles devraient donc constituer de meilleurs candidats pour le clivage de PMEL nécessaire à la formation des fibres amyloïdes.

### 2.1.1.3. Les $\beta$ -sécrétases

BACE1, qui est également appelée Asp2 ou memapsin 2, représente à ce jour la seule bêtasécrétase impliquée dans le clivage amyloïdogénique de l'APP (Figure 23). A cause de son rôle dans la pathologie d'Alzheimer, elle a été l'objet de très nombreuses études visant à la caractériser et à inhiber son activité au moyen de drogues dans un but thérapeutique (De Strooper et al., 2010). BACE1 est une acide aspartique protéase comme la cathepsine D (site catalytique avec deux résidus acide aspartique), essentiellement active à pH acide (pH optimal 4.5-4.8) (Vassar et al., 1999). BACE1 est ubiquitaire mais elle est surtout enrichie dans le cerveau, en particulier dans les neurones. BACE1 est une protéine transmembranaire de type I et est organisée en plusieurs domaines : un grand domaine luminal (comprenant un peptide signal, un pro-domaine et le sous-domaine catalytique), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 24). BACE1 immature est synthétisée dans le RE sous une forme pro-BACE1 (avec le pro-domaine) puis son peptide signal est excisé par une « signal peptidase ». Dans le Golgi, BACE1 est sujette à de nombreuses modifications (Nglycosylation par exemple) et son pro-domaine est excisé par une furine, ce qui aboutit à une forme BACE1 mature. BACE1 mature trafique entre divers compartiments subcellulaires, le TGN, la membrane plasmique, les endosomes et les lysosomes (où elle est dégradée). A l'état d'équilibre BACE1 est surtout localisée dans les endosomes et le TGN (Sannerud and

Annaert, 2009). BACE1 possède une très longue demi-vie (de 12 à 16H), elle cycle plusieurs fois entre la membrane plasmique, les endosomes, et le TGN (transport rétrograde) avant d'être dégradée par la voie lysosomale (He et al., 2005; Koh et al., 2005; Wahle et al., 2005). De manière intéressante BACE1 peut être clivée à la membrane plasmique par des ADAM (« ectodomain shedding ») (Hussain et al., 2003). Enfin une étude a montré qu'il existait différentes isoformes de BACE1 (« splicing alternatif ») notamment les isoformes BACE1A, B et C, et que ces isoformes n'avaient pas la même distribution subcellulaire. L'isoforme A (la plus longue, 501 acides aminés) (Figure 24) possède une activité catalytique et est majoritairement présente dans des compartiments de types TGN et endosomes, alors que les isoformes B et C (plus courtes, 476 et 457 acides aminés respectivement) ne sont présentes que dans le RE et ne possèdent pas d'activité catalytique (Ehehalt et al., 2002). D'autres études seront nécessaires pour déterminer le rôle de ces isoformes de BACE1 dans le RE.





Figure 24 : Topologie de BACE1.

BACE1 est une protéine transmembranaire de type I. Elle possède un long domaine luminal comprenant : un peptide signal PS, un pro-domaine PD et un domaine catalytique Cat. Ce domaine luminal est suivit d'un domaine transmembranaire DTM et d'un domaine cytoplasmique Cyt.

BACE1 possède un homologue, BACE2, également appelée Asp1 ou memapsin 1. Ces deux enzymes partagent environ 75% d'homologie au niveau de leur séquence d'acide aminés (Bennett et al., 2000; Sun et al., 2006). Des études montrant que BACE2 pouvait elle aussi cliver l'APP *in vitro* au niveau du même site de clivage que BACE1 ( $\beta$ -site), ont suggéré que cette enzyme pouvait également être impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Hussain et al., 2000). Cependant, d'autres études ont montré que BACE2 clivait l'APP préférentiellement dans le peptide A $\beta$ , *in cellulo* (Basi et al., 2003; Farzan et al., 2000; Fluhrer et al., 2002; Yan, Munzner, et al., 2001). De plus, il a été montré que BACE2 était peu exprimée dans le cerveau (quasiment absente dans les neurones). Même si des travaux complémentaires seront nécessaires pour comprendre le rôle de BACE2 dans le cerveau, les études s'accordent sur le fait que cette enzyme ne représente pas la voie majoritaire de production du peptide A $\beta$ (Dominguez et al., 2005; Roberds et al., 2001). Cela est conforté par des études sur la trisomie 21 montrant que la copie surnuméraire du gène *Bace2* (présent au niveau du chromosome 21) n'était pas responsable de la maladie d'Alzheimer parfois associée à ce syndrome (Sun et al., 2006).

Comme le montrent des études protéomiques, BACE1 serait impliquée dans le clivage de nombreux substrats, surtout des protéines transmembranaires de type I, au niveau de leur région juxtamembranaire (Hemming et al., 2009). Les souris Bace1-/- n'ont pas de phénotype létal embryonnaire, mais un nombre variables de souris Bacel-/- meurent après la naissance (Dominguez et al., 2005; Roberds et al., 2001). Les souris Bacel-/- ont d'abord été décrites comme normales, tout comme les souris Bace2-/- (Dominguez et al., 2005). Depuis cette première description, des études ont permis d'identifier de nouveaux substrats de BACE1 impliqués dans divers processus physiologiques, et ont démontré que le phénotype des souris Bace1-/- était en fait très complexe (De Strooper et al., 2010; Yan and Vassar, 2014). A l'inverse, peu de substrats de BACE2 ont été reportés à ce jour. Une étude récente a montré que l'activité catalytique de BACE2 était impliquée dans l'homéostasie du glucose dans les cellules bêta pancréatiques (Esterhazy et al., 2011). Ces observations suggèrent que si d'autres substrats de BACE2 sont découverts, les souris Bace2-/- pourraient avoir un phénotype beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. En accord avec ces résultats, le taux de mortalité associé aux souris Bace1-/- est augmenté dans les souris double KO Bace1-/-, Bace2-/-(Dominguez et al., 2005).

BACE1 ne clive pas au niveau de la membrane plasmique, mais préférentiellement dans des compartiments à pH acide (optimal pour son activité enzymatique) tels que les endosomes où elle est présente (Sannerud and Annaert, 2009). BACE2 subit les mêmes types de

modifications post-traductionnelles que BACE1, et trafique dans les mêmes types de compartiments (Fluhrer et al., 2002). BACE1 et son homologue BACE2 représentent donc de bons candidats pour le clivage amyloïdogénique de PMEL dans les mélanosomes de stade I/ endosomes de tri.

### 2.1.2. Hypothèse de travail et objectifs

Face à autant d'analogies entre les protéines APP et PMEL (notamment le clivage par la  $\gamma$ sécrétase et la formation de fibres amyloïdes), il est intéressant d'émettre l'hypothèse selon laquelle les  $\beta$ -sécrétases et/ou les  $\alpha$ -sécrétases qui sont impliquées dans le clivage de l'APP, pourraient également cliver PMEL au niveau juxtamembranaire pour former les fibres amyloïdes dans les mélanosomes. Les études préliminaires que j'ai menées dans le laboratoire au cours de mon Master ont suggéré une possible implication des  $\beta$ -sécrétases BACE1 et BACE2 dans la mélanogenèse et ont exclu les  $\alpha$ -sécrétases. L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier le rôle des  $\beta$ -sécrétases BACE1 et BACE2 dans la formation de fibres amyloïdes physiologiques et fonctionnelles de PMEL, ainsi que leur implication dans la mélanogenèse.

# **RESULTATS**

# RESULTATS

# Partie 1. BACE2 clive PMEL pour former la matrice fibrillaire amyloïde des mélanosomes, dans les cellules pigmentaires

# 1.1. Objectifs

Le but de cette première étude était de caractériser le rôle de la  $\beta$ -sécrétase BACE2 dans le clivage amyloïdogénique de PMEL *in vivo*, *in cellulo* et *in vitro*.

## 1.2. Méthodologies

Les études *in vivo* ont été réalisées à partir de tissus, notamment la peau et les yeux, de souris Bace2-/- qui avaient déjà été générées dans le laboratoire du Pr. Bart de Strooper (Dominguez et al., 2005). Ces tissus ont été analysés par des techniques de microscopie électronique (enrobage en résine EPON pour l'étude morphologique conventionnelle, et immunomarquage à l'or colloïdal sur coupes congelées), et de microscopie à fluorescence (enrobage en paraffine, coupes au cryostat et immunomarquage).

Les études *in cellulo* ont été réalisées sur une lignée de cellules mélanocytaires, MNT1. Cette ligné de mélanocytes hautement pigmentés dérive d'un mélanome humain. Contrairement à d'autres mélanomes humains, les MNT1 présentent l'avantage d'avoir conservé un système de mélanogenèse intacte (les quatre stades de mélanosomes sont présents) et très proche du système physiologique (Raposo et al., 2001). Ces cellules MNT1 ont été traitées : par siRNA (déplétion) dirigés contre BACE2 ou par transduction de constructions plasmidiques codant pour BACE2 ou par l'ajout d'une drogue inhibitrice spécifique des β-sécrétases. Les cellules après traitement ont été analysées par une ou plusieurs des techniques suivantes : western blot, immunofluorescence, Duolink® (ou « ligation par proximité » qui sert à observer en fluorescence la proximité entre deux protéines), HPF et cryo-substitution, reconstruction 3D

par tomographie électronique et immunomarquage à l'or colloïdal sur coupes congelées (microscopie électronique).

Les études de clivage *in vitro* ont été réalisées à partir d'une protéine recombinante soluble humaine PMEL (ou à partir de la protéine PMEL immunoprécipitée à partir d'un lysat cellulaire de MNT1) et de protéines recombinantes solubles humaines BACE2 et BACE1. PMEL et BACE1 ou BACE2 ont été mélangées dans un tampon de clivage adéquat en présence ou non d'une drogue inhibitrice spécifique des  $\beta$ -sécrétases (contrôle de clivage) et les produits de réaction ont été analysés par western blot.

### 1.3. Résumé des résultats

Le point de départ de cette étude a été l'établissement d'une collaboration avec le Pr. Bart de Strooper (université Catholique de Louvain, Belgique) qui m'a donné accès à des souris KO pour BACE1 et BACE2 (Dominguez et al., 2005). Ma première interrogation a été de savoir si les souris Bace1- /- et Bace2-/- possédaient un défaut de pigmentation (ce qui impliquerait un rôle de ces enzymes dans la mélanogenèse). De façon surprenante, les souris Bace2-/-(mais pas les Bace1-/-) présentent un défaut de pigmentation : leur fourrure est grise/ argentée au lieu d'être noire comme les souris sauvages (fond génétique C57BL/6 ou C57 Black 6). Ce phénotype n'a pas été décrit dans l'étude originale de ces souris (Dominguez et al., 2005) bien que sur les photos publiées dans l'article l'hypopigmentation est visible. Ce phénotype est très similaire à celui associé à l'expression d'une forme mutée de Pmel chez la souris silver, qui présente un grisonnement du pelage résultant d'une altération de la formation des fibres amyloïdes de PMEL dans les prémélanosomes (Theos, Truschel, et al., 2006). L'analyse morphologique par microscopie électronique des mélanosomes de la peau et de l'EPR des souris Bace2-/- a révélé un défaut de formation de fibres amyloïdes. La morphologie des mélanosomes (ronde au lieu d'allongée) et le dépôt de la mélanine sont affectés chez les souris Bace2-/-, et plus particulièrement dans l'EPR où la mélanogenèse n'intervient que sur une courte période de temps (Lopes, Wasmeier, et al., 2007), suggérant fortement le rôle de BACE2 dans la formation des fibres amyloïdes de PMEL. La déplétion par siRNA de BACE2 dans la lignée mélanocytaire MNT1 couplée à une analyse morphologique par microscopie électronique (HPF, cryo-substitution et reconstruction 3D par tomographie électronique), ont montré une accumulation de compartiments vacuolaires anormaux (présentant des agrégats amyloïdes dans leur lumière), ainsi qu'une diminution de la formation de mélanosomes de stade II. En tomographie électronique, ces agrégats se présentent comme des protofibres ou fibrilles, plutôt que comme des fibres bien organisées parallèlement. Un marquage sur des cryo-sections de cellules déplétées pour BACE2, utilisant un anticorps reconnaissant le domaine luminal de PMEL, indique que ces agrégats sont des agrégats amyloïdes de PMEL confirmant mes observations par microscopie à fluorescence qui montrent que la déplétion de BACE2 dans les cellules MNT1 n'affecte ni l'expression de PMEL ni sont trafic aux mélanosomes. Ces agrégats de PMEL sont également observables in vivo dans les mélanocytes de la peau des souris Bace2-/- (EPON). L'utilisation de la technique du Duolink® (« ligation par proximité ») couplée à la microscopie à fluorescence, ainsi que la microscopie électronique (immunomarquage à l'or colloïdal) montrent que BACE2 interagit et co-localise partiellement avec PMEL dans les prémélanosomes. La déplétion par siRNA de BACE2 ou sa surexpression (construction plasmidique) dans les MNT1 couplées à une analyse biochimique du clivage de PMEL par western blot ont permis de révéler le rôle de BACE2 dans le clivage amyloïdogénique de PMEL. Le clivage de la forme mature de PMEL (P2) par une proprotéine convertase (PC) forme un fragment luminal Ma et un fragment transmembranaire Mß qui sont liés par un pont disulfure. Mß est clivé au niveau du site de clivage s2p, pour libérer le fragment M $\alpha$  (associé à la portion M $\beta$ -N de M $\beta$ ) de la membrane et produir un fragment C-terminal CTF. M $\alpha$  est ensuite clivé pour former les fibres amyloïdes qui s'accumulent dans les prémélanosomes (Watt B, 2010; Watt et al.) (Figure 14). La déplétion de BACE2 dans les MNT1 inhibe le clivage du Mβ en CTF, comme le prouve l'accumulation du signal Mß et diminution du signal CTF dans la fraction TX-soluble (TX pour le détergent Triton X-100) et la diminution du signal associé aux fibres de PMEL dans la fraction TX-insoluble. Par opposition, la surexpression de BACE2 dans les MNT1 augmente le clivage du Mβ en CTF, ainsi que le signal associé aux fibres de PMEL dans les fractions TX-insolubles. L'utilisation de protéines recombinantes BACE2 et PMEL, in vitro, confirme que l'activité enzymatique de BACE2 est impliquée dans le clivage de PMEL. La protéine recombinante soluble BACE2 est capable de cliver PMEL pour former un fragment de poids moléculaire identique à celui du CTF de PMEL retrouvé dans les lysats des MNT1. Ce clivage *in vitro* est inhibé par l'ajout d'un inhibiteur spécifique des β-sécrétases. Finalement, la technique d'immunomarquage en microscopie électronique montre que BACE2 est également impliquée dans le clivage de PMEL in vivo. Les domaines luminal et C-ter de PMEL colocalisent dans les mélanosomes de l'EPR des souris Bace2-/-. De plus, l'utilisation de la technique du Duolink® démontre que ces deux domaines se situent à moins de 40nm l'un de l'autre, suggérant que PMEL est certainement sous forme entière (alors que dans une situation contrôle, ces deux domaines sont bien dissociés). Ces expériences prouvent que BACE2 clive PMEL pour libérer le domaine luminal du fragment CTF, pour initier la formation des fibres amyloïdes.

# 1.4. Conclusions

Mon étude de BACE2 a mis en évidence son rôle dans le clivage de PMEL et la formation de fibres amyloïdes *in vivo*, *in cellulo* et *in vitro*, lui attribuant ainsi un nouveau substrat et une nouvelle fonction physiologique directement liée à son activité enzymatique. Ce travail établit BACE2 comme un gène régulateur de la pigmentation. Enfin, mon étude de BACE2 renforce les analogies entre les fibres amyloïdes « pathologiques » de l'APP et fibres amyloïdes physiologiques de PMEL, faisant de ces dernières un excellent modèle physiologique pour une meilleure compréhension de la Maladie d'Alzheimer.

1.5. Article 1 : BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells

# BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells

Leila Rochin<sup>a,b</sup>, Ilse Hurbain<sup>a,b,c</sup>, Lutgarde Serneels<sup>d,e</sup>, Cecile Fort<sup>a,b</sup>, Brenda Watt<sup>f</sup>, Pascal Leblanc<sup>g</sup>, Michael S. Marks<sup>f</sup>, Bart De Strooper<sup>d,e</sup>, Graça Raposo<sup>a,b,c</sup>, and Guillaume van Niel<sup>a,b,1</sup>

<sup>a</sup>Institut Curie, Centre de Recherche and <sup>b</sup>Unité Mixte de Recherche 144, Centre National de la Recherche Scientifique, F-75248 Paris, France; <sup>c</sup>Cell and Tissue Imaging Facility, Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie, 75248 Paris, France; <sup>d</sup>Center for Human Genetics and Leuven Institute for Neurodegenerative Diseases, University of Leuven, 3000 Leuven, Belgium; <sup>e</sup>VIB Center for the Biology of Disease, 3000 Leuven, Belgium; <sup>†</sup>Departments of Pathology and Laboratory Medicine and Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104; and <sup>9</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 60007 Lyon, France

Edited by Thomas C. Südhof, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved May 15, 2013 (received for review December 13, 2012)

Amyloids are often associated with pathologic processes such as in Alzheimer's disease (AD), but can also underlie physiological processes such as pigmentation. Formation of pathological and functional amyloidogenic substrates can require precursor processing by proteases, as exemplified by the generation of A<sub>β</sub> peptide from amyloid precursor protein (APP) by beta-site APP cleaving enzyme (BACE)1 and  $\gamma$ -secretase. Proteolytic processing of the pigment cell-specific Melanocyte Protein (PMEL) is also required to form functional amyloid fibrils during melanogenesis, but the enzymes involved are incompletely characterized. Here we show that the BACE1 homologue BACE2 processes PMEL to generate functional amyloids. BACE2 is highly expressed in pigment cells and Bace2<sup>-/-</sup> but not Bace  $1^{-/-}$  mice display coat color defects, implying a specific role for BACE2 during melanogenesis. By using biochemical and morphological analyses, combined with RNA silencing, pharmacologic inhibition, and BACE2 overexpression in a human melanocytic cell line, we show that BACE2 cleaves the integral membrane form of PMEL within the juxtamembrane domain, releasing the PMEL luminal domain into endosomal precursors for the formation of amyloid fibrils and downstream melanosome morphogenesis. These studies identify an amyloidogenic substrate of BACE2, reveal an important physiological role for BACE2 in pigmentation, and highlight analogies in the generation of PMEL-derived functional amyloids and APPderived pathological amyloids.

myloids are insoluble protein or peptide aggregates with A cross  $\beta$ -sheet structure that are often associated with pathologic processes, such as the A $\beta$  fibrils that correlate with neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD). However, the amyloid fibrils can also be exploited for physiological processes. "Functional amyloids" have recently emerged in increasing numbers of physiological eukaryotic processes such as peptide hormone storage, long-term memory maintenance, and early steps of melanogenesis (1-3). The formation of physiological and pathological amyloid can require sequential proteolysis of a precursor to release amyloidogenic fragments. For example, cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by the  $\beta$ -secretase, beta-site cleaving enzyme (BACE)1, and the  $\gamma$ -secretase complex (4) generates the amyloidogenic  $A\beta$  peptide in AD (5). Whether similar proteases control the formation of functional amyloid is not known. Neither BACE1 nor its close homologue BACE2, which has no role in APP processing during amyloidogenesis and few known substrates (6), is yet known to process other amyloidogenic proteins. Given the multiplicity of amyloidogenic substrates, we hypothesized that BACE proteases play a conserved role in functional amyloidogenesis.

As an excellent candidate for BACE-dependent amyloidogenesis, we focused on the physiological amyloids derived from processing of the pigment cell-specific protein Melanocyte Protein (PMEL) (also referred as Pmel17/silver/gp100) (7). PMEL was the first natural amyloid described in mammals and is thus far the best studied (8). PMEL is a type I transmembrane glycoprotein specifically expressed in pigment cells of the eye and skin. These cells synthesize melanin pigments within specialized lysosomerelated organelles called melanosomes (9). As they are synthesized in melanosomes, melanins deposit on a sheet-like matrix of amyloid fibrils, the main components of which are proteolytic fragments of PMEL. The fibrils form within endosomal precursors of melanosomes through coordinated sorting events and enzymatic processing that culminate in a conformational change that drives physiological amyloid formation by luminal PMEL fragments (8). PMEL amyloidogenesis during the generation of early stage I and II melanosomes (10) underlies the ellipsoidal shape and striated ultrastructure of melanosomes, and facilitates melanocyte homeostasis likely by sequestering toxic intermediates in melanin synthesis as melanosomes mature (9, 11).

PMEL transition to the amyloid form requires proteolytic processing steps (12-14) that are reminiscent of APP processing but are incompletely characterized in pigment cells (Fig. S14). They include (i) cleavage of the full-length transmembrane form of PMEL by a proprotein convertase (PC) into an amyloidogenic luminal Ma fragment and a disulfide-linked transmembrane domain-containing M $\beta$  fragment (12), (*ii*) further cleavage of M $\beta$  by an "endosomal" sheddase to release  $M\alpha$  linked to  $M\beta$  luminal domain (i.e., M $\beta$ -N) from the transmembrane C-terminal fragment (CTF) and to allow Ma oligomerization to form amyloid fibrils (13, 14), (iii) further processing of Ma by unknown proteases into smaller fragments found in mature fibrils and fibrillar sheets (15, 16), and (iv) intramembrane proteolysis of the CTF by the  $\gamma$ -secretase complex (13, 14). The analogy between the processing of PMEL and APP led us to investigate the role of BACE secretases in PMEL processing and functional amyloid formation. By using in vivo, in cellulo, and in vitro assays, we demonstrate that BACE2, the major homologue of BACE expressed in pigment cells (17), is the sheddase required for the processing of the PMEL  $M\beta$  fragment and for subsequent functional amyloidogenesis. Our results extend the role of BACE secretases to functional amyloid biogenesis and define BACE2 as an important pigmentation gene.

#### Results

**Bace2**<sup>-/-</sup> Mice Display Pigmentation Defect. BACE1 and BACE2 mRNAs are both expressed in pigment cells, but BACE2 levels were 37-fold higher than BACE1 levels in retinal pigment

Author contributions: L.R. and G.v.N. designed research; L.R., I.H., L.S., C.F., and B.W. performed research; L.S., P.L., M.S.M., and B.D.S. contributed new reagents/analytic tools; L.R., B.D.S., and G.v.N. analyzed data; and L.R., M.S.M., B.D.S., G.R., and G.v.N. wrote the paper.

Conflict of interest statement: B.D.S. is consultant for several companies involved in the development of the rapeutics for Alzheimer's disease.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: guillaume.van-niel@curie.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10. 1073/pnas.1220748110/-/DCSupplemental.

epithelial cells (17), suggesting that BACE2 is the major BACE homologue in pigment cells. To address whether BACE secretases function during melanosome biogenesis, we first tested whether  $Bace1^{-/-}$  and  $Bace2^{-/-}$  mice exhibit coat color dilution, which reflects melanogenesis defects in mice (9). Compared with their WT littermates, previously generated Bace2<sup>-/-</sup> but not Bace1<sup>-/-</sup> mice (18) on a C57BL/6 background revealed a "silvery" coat color (Fig. 1A), similar to that of mice with Pmel mutations that impair PMEL accumulation in melanosomes (19). Coat color dilution in Bace2<sup>-/-</sup> mice might therefore reflect impaired melanosome morphogenesis caused by the inability to produce the PMEL amyloid fibril matrix in melanosomes (20). Consistently, morphological analysis by conventional EM of the retinal pigment epithelium (RPE) and skin melanocytes of  $Bace2^{-/-}$  mice revealed abnormal melanosome morphology (Fig. 1B and Fig. S1D), particularly in the RPE, in which melanosomes form during a limited developmental period (21). The proportion of round melanosome profiles was significantly increased in Bace2<sup>-/-</sup> RPE  $(47\% \text{ in } Bace 2^{-/-} \text{ RPE vs. } 29\% \text{ in WT; Fig. } 1C)$ , but the number of melanosomes per cell in WT and  $Bace2^{-/-}$  RPE was similar (Fig. S1B). In addition, skin melanocytes in  $Bace2^{-/-}$  mice harbored unusual vacuolar compartments filled with dense unstructured aggregates, and were devoid of elongated fibrilcontaining premelanosomes (Fig. 1D). Although melanosomes in *Bace2<sup>-/-</sup>* melanocytes were densely pigmented, more than 80%of them harbored abnormal melanin deposits (Fig. S1C). These



**Fig. 1.** Melanogenesis is impaired in  $Bace2^{-/-}$  mice. (A) Coat color defect of  $Bace2^{-/-}$  mice compared with their WT and  $Bace1^{-/-}$  littermates. (B) EM analysis of epon-embedded RPE of WT and  $Bace2^{-/-}$  mice. Note the presence of ellipsoidal-shaped melanosomes in WT mice and round-shaped melanosomes with heterogeneous melanin deposition in  $Bace2^{-/-}$  mice (white arrows). (Scale bar: 1  $\mu$ M.) (C) Ratio (marked as "R") between maximum width and length of an average of 150 melanosomes per condition. Melanosomes are significantly less elongated in  $Bace2^{-/-}$  RPE (\*\* $P \le 0.01$ ). (D) Altered early-stage melanosome morphology in  $Bace2^{-/-}$  skin melanocytes. Detail of epon-embedded dorsal skin sections of WT ( $Bace2^{+/+}$ ) and  $Bace2^{-/-}$  mice. Note the presence of stage II melanosomes containing amyloid fibrils in  $Bace2^{+/+}$  mice and round vacuoles containing unstructured aggregates in  $Bace2^{-/-}$  mice (black arrows). (Scale bar: 500 nm.)

morphological features are similar to those of RPE and skin melanocytes in PMEL mutant *silver* and  $Pmel^{-/-}$  mice (11, 20). Together, these observations demonstrate altered melanosome morphogenesis in the absence of BACE2, likely as a consequence of impaired PMEL amyloid fibril formation.

**BACE2** Depletion Inhibits Formation of PMEL-Derived Amyloid Fibrils in Cultured Melanocytic Cells. To further probe the requirement for BACE2 in PMEL-driven amyloidogenesis and melanosome morphogenesis, BACE2 was depleted by siRNA treatment in human pigmented MNT1 melanoma cells (see Fig. 4A), a faithful model for eumelanogenesis (22). Control and BACE2-depleted MNT1 cells were prepared by high-pressure freezing (HPF) and freeze substitution to preserve fibril structure, and thin sections were analyzed by EM (23) (Fig. 2A). Similar to observations in PMEL-deficient melanocytes (11, 20, 24), neither the number of stage IV melanized melanosomes nor the total melanin content was significantly reduced in MNT1 cells depleted for BACE2 (Figs. S2A and S3A). Moreover, the melanin-synthesizing enzyme tyrosinaserelated protein 1 was localized appropriately to mature pigmented melanosomes in BACE2-depleted MNT1 cells (Fig. S3B), as reported in PMEL-deficient melanocytes (11, 20). However, BACE2 depletion resulted in a dramatic impairment of structured PMEL amyloid sheets, with a threefold decrease in the number of fibrillar stage II and III melanosomes and a sixfold increase in the number of round organelles containing unstructured aggregates (Fig. S24); the latter abnormal organelles were very similar to those observed in  $Bace2^{-/-}$  skin melanocytes (Fig. 1D). Because these organelles accumulated concomitantly with the loss of stage II and III melanosomes, they likely reflect a defect in early and not in late steps of melanogenesis.

To further assess how BACE2 depletion impairs amyloidogenesis, we generated 3D tomographic reconstructions from single tilt tomographic analyses of thick sections of control and BACE2-depleted MNT1 cells prepared by HPF and freeze substitution. In control MNT1 cells, PMEL fibrils begin to form in stage I premelanosomes from intraluminal vesicles and organize into parallel sheets in stage II melanosomes (23). BACE2 depletion strongly impaired the organization of fibrils into parallel sheets, leading to accumulation of aggregates of small fibrils (Fig. 2B). These dense aggregates contain PMEL, as indicated by immunogold labeling on ultrathin cryosections of BACE2-depleted cells using an antibody to the PMEL luminal domain (Fig. 2C). Taken together, these observations support a requirement for BACE2 in the maturation of PMEL fibrils and their assembly into sheets.

**BACE2** Closely Apposes with PMEL in Melanosomes. Organelles with irregular electron-dense deposits are observed in pigment cells with impaired amyloid formation as a result of a loss of PMEL expression (in  $Pmel^{-/-}$  mice) (11) or impaired endosomal sorting (14, 20) or processing (12) of PMEL. However, immunofluorescence microscopy (IFM) of BACE2-depleted MNT1 cells using an antibody to the PMEL luminal domain revealed punctate labeling, confirming that PMEL expression and trafficking to post-Golgi compartments, per se, were not impaired (Fig. S3C). By standard EM and immuno-EM analyses, the formation of multivesicular bodies and the sorting of PMEL to intraluminal vesicles also proceeded normally in the absence of functional BACE2 (Fig. 2C, Inset, and Fig. S2A). Given the role of the BACE2 homologue BACE1 in APP processing to the amyloidogenic A $\beta$ , we reasoned that BACE2 might function in processing PMEL to its amyloidogenic state. If this were true, BACE2 would be expected to localize in melanocytes to compartments in which PMEL processing occurs. By IFM, endogenous BACE2 could not be detected (even though it was detected by immunoblotting; Fig. 4A), but overexpressed BACE2 localized to



Fig. 2. BACE2 depletion affects PMEL-derived amyloidogenesis. (A) EM analyses of HPF/freeze substituted MNT1 cells treated with control (siCtrl) or BACE2 (siBACE2) siRNA. Black arrows indicate a stage II melanosome containing PMEL amyloid fibrils in control cells and a vacuole containing unstructured aggregates in BACE2-depleted cells; a magnified view is also shown (Inset). (Scale bar: 500 nm.) Fig. S2A provides guantification of endosomal/melanosomal compartments in siCtrl and siBACE2 cells. (B) Three-dimensional single tilt electron tomographic reconstructions were performed on thick sections of MNT1 cells treated with control or BACE2 siRNA. In control cells, black arrows indicate PMEL fibrils and the black arrowhead indicates intraluminal vesicles in a stage II melanosome. In BACE2-depleted cells, black arrows point to unstructured aggregates and white arrowheads indicate limiting membrane of a vacuolar compartment (Scale bar: 150 nm.) Fig. S2B shows tilt series and tomographic reconstruction. (C) EM analysis of ultrathin cryosections of MNT1 cells treated with control or BACE2 siRNA and Immunogold labeled for PMEL luminal domain [NKI beteb; protein-A gold 10-nm diameter (Pag 10)]. Note the presence of PMEL luminal labeling in fibrillar structures in control cells and in unstructured aggregates in BACE2-depleted cells (black arrows). Corresponding structures are also shown magnified (Inset); note the association of PMEL with intraluminal vesicles (white arrowheads) in BACE2-depleted cells. (Scale bar: 200 nm.)

puncta that partially overlapped with labeling for the PMEL luminal domain (Fig. 3A). To better appreciate the compartments in which PMEL and BACE2 overlapped, we performed an in situ proximity ligation assay (PLA) (25), in which fluorescent puncta are detected only when two proteins are in close proximity (<40 nm). By using antibodies directed against BACE2 and the PMEL luminal domain, we detected punctate PLA fluorescence in MNT1 cells expressing exogenous BACE2 but not in cells expressing an empty vector (Fig. 3B). The puncta were substantially less numerous than those labeled by IFM for BACE2 or PMEL alone. This indicates that PMEL and BACE2 are in close proximity within a subset of punctate compartments. By using immunolabeling and EM analysis of cryosections of MNT1 cells overexpressing BACE2, the compartments in which BACE2 colocalized with PMEL and CD63 [enriched in melanosomes (14)] were identified as stage I and II melanosomes (Fig. 3C). Thus, BACE2 is present in a subset of PMEL-containing melanosomes, likely reflecting involvement of BACE2 in PMEL processing at an early stage of melanosome biogenesis.

**BACE2** Releases PMEL Luminal Domain to Generate Amyloidogenic Mα Fragment. To determine whether BACE2 functions in PMEL processing, we analyzed the effect of siRNA-mediated BACE2 depletion on the production of the different cleaved forms of PMEL in MNT1 cells. In control cells, PMEL is cleaved sequentially by a series of proteases to distinct fragments that can be detected by immunoblotting (Fig S14). The efficiency of each cleavage can be deduced by immunoblotting by using the αPmel-C antibody; in control cells, this antibody detected the immature core-glycosylated P1 form (90 kDa), the Mβ (28 kDa) product of PC cleaved full-length PMEL, and the CTF (10 kDa) product of the cleavage of Mβ (Fig. 4*A* and Fig. S14). By using a metabolic pulse/chase analysis of MNT1 cells and immunoprecipitation of PMEL fragments with  $\alpha$ Pmel-C antibody, we observed that treatment with the  $\gamma$ -secretase inhibitor N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) delays the accumulation of the CTF relative to M $\beta$  (Fig. S44); this indicates that PC cleavage precedes sheddase cleavage.

In cells treated with siBACE2#2 (which depletes BACE2 by 75%), the steady-state level of M $\beta$  was increased nearly threefold whereas the level of CTF was decreased by 60%, indicating a defect in sheddase cleavage of M $\beta$  (Fig. 4A). Similar results were observed with the use of three other BACE2 siRNAs (Fig. S4B). When they have been released from the membrane in control cells, Ma fragments assemble into Triton X-100 (TX)-insoluble fibrils (12) and undergo further proteolytic processing to smaller fragments (detected by antibodies HMB45 and I51) (16, 26, 27) (Fig. S1A). The level of I51-detectable fragments was not affected by BACE2 depletion, but levels of HMB45-reactive fragments were reduced by 70% (Fig. 4B). The TX-insoluble fractions were also aberrantly enriched in M $\beta$  (detected by  $\alpha$ Pmel-C) and in misprocessed and aggregated forms of M $\alpha$  (detected by  $\alpha$ Pmel-N), but not in an unrelated membrane marker (transferrin receptor; Fig. 4B). These data indicate that normal cleavage and polymerization of PMEL is impaired by BACE2 depletion.

To test whether BACE2 is also required for PMEL cleavage in vivo, we probed cryosections of developing RPE cells from neonatal WT and *Bace2<sup>-/-</sup>* mice by PLA (28) by using HMB45 and  $\alpha$ Pmel-C as primary antibodies. We reasoned that M $\beta$  cleavage should separate the luminal HMB45 epitope on M $\alpha$  from the cytoplasmic  $\alpha$ Pmel-C epitope on the CTF, reducing the PLA signal. Consistent with this prediction, very little PLA signal was observed in RPE of WT mice, but a consistent PLA signal was observed in RPE of *Bace2<sup>-/-</sup>* mice (Fig. 4*C* and Fig. S4*C*). The increase of fluorescent puncta in *Bace2<sup>-/-</sup>* mice supports the view that full-length PMEL accumulates in *Bace2<sup>-/-</sup>* RPE cells as it



**Fig. 3.** BACE2 partially colocalizes and interacts with PMEL. (A) IFM analysis of MNT1 cells transfected with a BACE2-Flag construct, labeled for PMEL (NKI beteb) and BACE2-Flag. Insets and white arrows show examples of partial colocalization of BACE2 with PMEL. (*B*) PLA signals between BACE2-Flag and PMEL (NKI beteb) in MNT1 cells transfected with BACE2-Flag or an empty vector as a control (Ctrl) observed by IFM (*Left*) and merged with a bright-field image (*Right*). (C) EM analysis of ultrathin cryosections of MNT1 cells transfected with BACE2-Flag construct and Immunogold-labeled for PMEL luminal domain (NKI beteb; PAG 10) and BACE2-Flag (PAG 15; main image) or for BACE2-Flag (PAG 10) and CD63 (PAG 15; *Inset*). Black arrows indicate BACE2-Flag labeling in melanosomes. (Scale bar: 200 nm.)

does in BACE2-depleted MNT1 cells. By using HMB45 and  $\alpha$ Pmel-C to label ultrathin cryosections of the RPE, we also observed that both domains of PMEL recognized by these antibodies localize to unstructured melanosomes in *Bace2<sup>-/-</sup>* but not in *Bace2<sup>+/+</sup>* RPE (Fig. S4D). These data confirm the accumulation of full-length PMEL in the absence of BACE2 in vivo.

To complement analyses of BACE2 depletion, we assessed the effects of BACE2 overexpression on PMEL processing in MNT1 cells. BACE2 overexpression resulted in depletion of Mß and accumulation of CTF at steady state (Fig. 4D). Similarly, overexpression of BACE2 in BACE2-depleted MNT1 cells also rescued the production of CTF (Fig. S4E). To determine whether BACE2 cleaves PMEL directly, we performed in vitro processing assays by using recombinant proteins. Treatment of full-length recombinant PMEL with recombinant BACE2 for 10 min resulted in the generation of a PMEL fragment that comigrates with PMEL CTF and that is recognized by  $\alpha$ Pmel-C antibody (Fig. 4*E*). Similar results were obtained when BACE2 was added to unprocessed PMEL that was immunoprecipitated from MNT1 cell lysates by using an antibody (aPmel-I) that binds only to preprocessed PMEL isoforms (26) (Fig. 4E). Using similar conditions, APP but not PMEL was cleaved by BACE1 (Fig. S4F).

Finally, to confirm that the impaired PMEL cleavage in BACE2depleted cells reflected a loss of BACE2 proteolytic activity, we treated MNT1 cells with  $\beta$ -secretase inhibitor IV. At high concentrations, this inhibitor acts on BACE1 and BACE2, but, at low concentrations, it blocks only BACE1 (29). Treatment of MNT1 cells with the high concentration of  $\beta$ -secretase inhibitor IV, but not the low concentration, resulted in increased levels (45%) of M $\beta$ at steady state compared with cells treated with a vehicle control (Fig. S4G). Addition of high concentrations of  $\beta$ -secretase inhibitor IV also inhibited PMEL CTF production in our in vitro processing assays (Fig. 4*E*). This supports the notion that the proteolytic activity of BACE2, but not of BACE1, is required for M $\beta$  cleavage. A previous study implicated the  $\alpha$ -secretases a disintegrin and metalloproteinase (ADAM)10 and ADAM17 as necessary for M $\beta$  cleavage in PMEL-expressing transfected HeLa cells (13). However, in MNT1 cells, ADAM10 did not show intracellular colocalization with PMEL (Fig. S4*H*), and treatment with siRNA to ADAM10 (Fig. S4*I*) or with inhibitors of  $\alpha$ -secretases (Fig. S4*G*) did not consistently affect PMEL cleavage, causing only a moderate reduction of intracellular HMB45-reactive fragments. Moreover, CTF of PMEL in MNT1 cells and PMEL-expressing transfected HeLa cells did not display similar molecular weights (Fig. S4*I*), and production of the CTF in PMEL-expressing transfected HeLa cells was not sensitive to BACE2 depletion (Fig. S4*K*). These observations demonstrate that PMEL-M $\beta$  follows distinct processing in PMEL-expressing transfected HeLa cells and in pigment cells.



Fig. 4. BACE2 cleaves PMEL-M $\beta$ . (A) TX-soluble lysates of MNT1 cells treated with control or BACE2 siRNA were analyzed by immunoblotting by using antibodies against the PMEL C terminus (aPMEL-C), BACE2, and tubulin as a loading control. BACE2 knock-down increases the relative abundance of MB and decreases the abundance of the CTF. (B) TX-insoluble material from the same cells was analyzed by using aPMEL-C, aPMEL-N (which recognizes Ma), HMB45 and I51 (which recognize distinct fragments of Ma associated with PMEL fibrils), and transferrin receptor. Note the accumulation of  $M\beta$  and uncleaved  $M\alpha$  and a loss of HMB45-reactive fragments upon depletion of BACE2. (C) Merged image illustrating PLA signal quantified in Fig. S4C and the corresponding bright field showing melanosomes with PLA signal. (D) Lysates of MNT1 cells transfected with BACE2 or an empty vector (Ctrl) were analyzed by immunoblotting as in A and B. Note the decrease of Mß and the increase of CTF in the BACE2-overexpressing cells. (E) PMEL cleavage by BACE2 in vitro. A soluble recombinant PMEL (rPMEL) or the uncleaved form of PMEL immunoprecipitated from TX-soluble lysates of MNT1 cells with aPmel-I antibody (IP PMEL I) was incubated in the absence or presence of soluble recombinant BACE2 with or without  $\beta$ -secretase inhibitor ( $\beta$ -sec I). The products of the reactions were analyzed by immunoblotting using aPMEL-C and compared with signals obtained from untreated MNT1 cell lysate (Ctrl lysate). BACE2 addition to either source of PMEL leads to the production of a fragment that migrates similarly to the CTF (black arrow); addition of β-secretase inhibitor prevents cleavage.

Altogether, these data demonstrate that, in pigment cells, BACE2 functions as the endosomal sheddase that cleaves PMEL-M $\beta$  and releases the amyloidogenic PMEL luminal domain containing M $\alpha$  and M $\beta$ -N fragments that is required for subsequent processing of fibrillogenic M $\alpha$ .

#### Discussion

Our results define a physiological and amyloidogenic substrate for BACE2 in pigment cells. Contrary to BACE1, BACE2 has no known role in A $\beta$  generation or the etiology of AD (30), and to date has been implicated in the degradation of A $\beta$  (31) and in the maintenance of pancreatic  $\beta$ -cell function and mass through the cleavage of transmembrane protein 27 (TMEM27) (32). Very recently, loss of BACE2 activity in zebrafish was shown to modestly influence pigmentation by an apparent alteration in melanophore migration, whereas loss of BACE1 activity had no apparent effect on pigmentation (33), consistent with the absence of hypopigmentation defect in  $Bace1^{-/-}$  mice. Although a migration defect could account for the coat color dilution observed in  $Bace2^{-/-}$  mice, we propose that hypopigmentation also reflects melanocyte mortality caused by leakage of melanin and cytotoxic intermediates, as has been proposed for PMEL-deficient silver and  $Pmel^{-/-}$  mice (11, 34).

Our work and other studies (13, 14) reveal similarities in the processing of functional and pathogenic amyloid substrates. However, we could not demonstrate a role for BACE1 in PMEL cleavage. The molecular basis for BACE subtype specificity in PMEL cleavage is not totally clear, but likely in part reflects the differential expression (17) and subcellular compartmentalization of BACE1 and BACE2 in pigment cells. Although substrate recognition also likely differs between BACE1 and BACE2, BACE2 has no known consensus recognition site (35), and the sheddase cleavage site for PMEL that is likely targeted by BACE2 in MNT1 cells (13) shares only a single leucine with other known BACE2 substrates like TMEM27 (32), or seizure 6-like protein (35).

PMEL sheddase activity upon ectopic expression in HeLa cells was previously ascribed to ADAM10 (13). Although ADAM10 is expressed in melanocytes, its inhibition and/or depletion did not significantly alter PMEL processing in MNT1 cells. Similar differences between PMEL-transfected HeLa and melanocytic cells have been reported for the PC mediated cleavage of full-length PMEL (20, 36). We speculate that this difference results from the distinct localization of ADAM10 in pigment cells and HeLa cells caused by cell type-specific regulators (37) and limitation of the proteolytic activity of ADAM10 to the plasma membrane of pigment cells and not in endosomes (38). We therefore conclude that ADAM10 does not function in the intracellular formation of PMEL amyloid in pigment cells. However, ADAM10 might participate in PMEL shedding from the plasma membrane (36) as reported previously (13) and suggested by the persistence of low levels of the PMEL-derived CTF in BACE2-depleted cells.

Our work defines BACE2 as a tissue-specific protease and defines BACE2 as a pigmentation gene. Although numerous genetic loci in which mutations affect pigmentation have been identified (39), genes required for early steps of melanogenesis might have been missed because their disruption causes only minor coat color alterations (11). Moreover, our demonstration here of the generation of functional PMEL amyloid by BACE2 highlights analogies with the generation of pathogenic amyloid from APP by the highly homologous BACE1. Our work therefore strengthens the model of physiological formation of PMELderived amyloids as a template to investigate the mechanisms involved in the generation of pathological amyloid during AD. For PMEL, regulated cleavage by BACE2 within melanosome precursors likely serves as a mechanism to accurately time and compartmentalize amyloid formation within melanocytes. This regulation likely contributes to the lack of toxicity of the amyloid

fibrils and of the intermediates in fibril formation toward cellular components that might be present in earlier compartments (7).

#### **Materials and Methods**

**Mice**. Dorsal skin and eyes from  $Bace1^{-/-}$ ,  $Bace2^{-/-}$  and WT mice (3 mo of age for Fig. 1 *B* and C and Fig. S1 *B* and C; 5 d of age for Figs. 1*D* and 4C and Fig. S4 C and *D*) (*n* = 4) on the C57BL/6J background (18) were dissected and fixed. Dorsal skin was fixed by immersion in modified Karnovsky's fixative (2% paraformaldehyde, 2% (wt/vol) glutaraldehyde, 0.06% CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3) at 4 °C. Eyes were dissected after transcardial perfusion with ice-cold PBS solution followed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde and 2% (wt/vol) glutaraldehyde in PBS solution, and postfixed by immersion in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 2.5% (wt/vol) glutaraldehyde. Mice were housed under specific pathogen-free conditions and were used in accordance with the University of Leuven Animal Ethics Committee.

**Cell Culture, Drug Treatment, Transfection, and siRNA Depletion.** HeLa cells expressing PMEL and human melanocytic MNT1 cells were maintained as previously described (10, 22). Cells were treated for 24 h with  $\alpha$ -secretase inhibitor tumor necrosis factor- $\alpha$  protease inhibitor-2 (TAPI II) (Enzo Life Sciences), DAPT (Sigma Aldrich), or  $\beta$ -secretase inhibitor IV (Calbiochem). Cells were subjected to one round of siRNA transfection with siRNA duplex oligonucleotides as reported, and collected after 72 h (24). MNT1 cells were transfected with plasmid constructs by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations, and collected after 48 h. For rescue experiment, cells were subjected to two rounds of siRNA transfection and transfected with plasmid constructs for BACE2 after 72 h and collected after 72 h b. ACE2 constructs were generated and provided by B.d.S. (40). APP cDNA was a gift of Jean-Baptiste Brault (Unité mixte de Recherche 144, CNRS, Paris, France). siRNA sequences as well as antibodies list are detailed in *SI Materials and Methods*.

**Immunoprecipitation.** TX-soluble material from MNT1 and HeLa cells was obtained as previously described (10) and precleared for 30 min by addition of 50  $\mu$ L protein G-agarose beads (Invitrogen) and for 30 min by addition of 50  $\mu$ L protein G-agarose beads coated with irrelevant rabbit antibody (Dako). Proteins were then immunoprecipitated by adding 50  $\mu$ L protein G-agarose beads coated with irrelevant rabbit antibody (Dako). Proteins were then immunoprecipitated by adding 50  $\mu$ L protein G-agarose beads coated with  $\alpha$ Pmel-1 in MNT1 lysates and antibody specific for APP luminal domain antibody in HeLa cells lysate. After 2 h at 4 °C under constant agitation, beads were washed five times in lysis buffer. The immunoprecipitates were subjected to in vitro cleavage as described below in In Vitro Cleavage.

**Western Blot.** TX-soluble and insoluble material from MNT1 cells was obtained as previously described (10) and analyzed by Western blot as described previously (14). Signal intensities were quantified with ImageJ software.

In Vitro Cleavage. PMEL (0.40  $\mu$ g), SILV human recombinant protein P01 (Abnova), or immunoprecipitates against PMEL or APP were incubated with 1.6  $\mu$ g of recombinant BACE2 (Enzo Life Sciences) or with 2  $\mu$ g of recombinant BACE1 (Enzo Life Sciences) in assay buffer (Enzo Life Sciences). As a control, no recombinant BACE2 was added or  $\beta$ -secretase inhibitor IV was added to the PMEL/BACE2 mixture. After 10 min, the reaction mixture was withdrawn, incubated in sample buffer, and analyzed by SDS/PAGE.

**IFM.** Untreated, drug-treated, or transfected MNT1 cells were grown on coverslips at 70% confluence and treated for IFM as previously described (14) and examined on a Leica DM-RXA2 3D deconvolution microscope equipped with a piezo z drive (Physik Instrument) and a  $100 \times 1.4$  NA PL-APO objective lens. Images are maximum-intensity z projections of 3D image stacks (except Fig. S4H, which shows a single deconvolved layer) acquired every 0.2  $\mu$ m using Metamorph software (MDS Analytical Technologies) and a Coolsnap HQ cooled CCD camera (Photometrics).

PLA. BACE2-transfected MNT1 cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde/PBS solution at room temperature. Whole eyes of 5-d-old WT and *Bace2<sup>-/-</sup>* mice were dissected and fixed in 4% (wt/vol) PFA/PBS solution for 2 h, washed for 10 min in PBS solution, and cryoprotected in 30% (wt/vol) sucrose for 24 h before being frozen in optimum cutting temperature compound (TBS tissue freezing medium), cryosectioned (8-µm sections), and collected on Superfrost Plus glasses (Menzel-Gläser). Fixed cells and cryosections were washed in PBS solution and blocked and permeabilized during 30 min with PBS solution/0.1% saponin/BSA 0.2%. After incubation with primary antibodies, their proximity was assayed by using the Duolink II PLA Probes and detection kit (Olink Bioscience) according to manufacturer instructions. Images were acquired as described earlier for IFM and compared with the corresponding bright-field 8-bit image. Cell counter was delineated by using the polygon selection tool in ImageJ software, and the number of dots corresponding to the PLA signal was determined by using the colocalization plug-in (Pierre Bourdoncle, Cochin Institut, Paris, France) and then object counter 3D (i.e., counting number of 3D objects in *z*). The mean value of PLA signal was determined on 18 cells.

**EM.** For conventional EM analysis of RPE sections and dorsal skin sections, tissues from *Bace2<sup>-/-</sup>* mice and WT mice were processed for epon embedding and ultrathin sections and then contrasted with uranyl acetate and lead citrate as described previously (21). For ultrathin cryosectioning and Immunogold labeling, BACE2 MNT1-depleted cells, BACE2-Flag transfected MNT1 cells, and tissue blocks from the eyes were processed for ultracryomicrotomy and single or double Immunogold labeling using PAG10 and PAG15 as reported (22). All samples were analyzed by using a FEI CM120 electron microscope (FEI Company), and digital acquisitions were made with a numeric camera (Keen View; Soft Imaging System).

**Electron Tomography.** MNT1 cells grown on carbonated sapphire discs were high-pressure frozen and processed as described previously (23, 41). Tomographic acquisitions were made on 300-nm-thick sections. Tilt series (angular range from  $-65^{\circ}$  to  $+65^{\circ}$  with 1° increments) were recorded by using Xplore3D (FEI) or TEMography (JEOL) on 200-kV transmission electron microscopes (Tecnai 20 LaB6, FEI; or JEM 2200FS equipped with an  $\Omega$ -filter; JEOL). A 10-eV

- 1. Fowler DM, et al. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4(1):e6.
- Maji SK, et al. (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. Science 325(5938):328–332.
- 3. Majumdar A, et al. (2012) Critical role of amyloid-like oligomers of Drosophila Orb2 in the persistence of memory. *Cell* 148(3):515–529.
- 4. De Strooper B (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90(2):465–494.
- De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: Enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol 6(2):99–107.
- Fluhrer R, et al. (2002) A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. J Neurochem 81(5):1011–1020.
- Watt B, Raposo G, Marks MS (2010) Pmel17: An amyloid determinant of organelle structure. *Functional Amyloid Aggregation*, eds Rigacci S, Bucciantini M (Trivandrum, Kerala, India), pp 89–113.
- Watt B, van Niel G, Raposo G, Marks MS (2013) Pmel: A pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment Cell Melanoma Res* 26(3):300–315.
- Raposo G, Marks MS (2007) Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. Nat Rev Mol Cell Biol 8(10):786–797.
- Berson JF, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS (2001) Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 12(11):3451–3464.
- 11. Hellström AR, et al. (2011) Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genet* 7(9):e1002285.
- Berson JF, et al. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. J Cell Biol 161(3): 521–533.
- Kummer MP, et al. (2009) Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase. J Biol Chem 284(4):2296–2306.
- 14. van Niel G, et al. (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21(4):708–721.
- Kushimoto T, et al. (2001) A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. Proc Natl Acad Sci USA 98(19):10698–10703.
- Watt B, et al. (2009) N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils. J Biol Chem 284(51):35543–35555.
- 17. Wang J, Ohno-Matsui K, Morita I (2012) Elevated amyloid β production in senescent retinal pigment epithelium, a possible mechanism of subretinal deposition of amyloid β in age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 423(1):73–78.
- Dominguez D, et al. (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. J Biol Chem 280(35):30797–30806.
- Dunn LC, Thigpen LW (1930) The silver mouse: A recessive color variation. J Hered 21(12):495–498.
- Theos AC, et al. (2006) Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell* 17(8): 3598–3612.
- Lopes VS, Wasmeier C, Seabra MC, Futter CE (2007) Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. Mol Biol Cell 18(10):3914–3927.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. J Cell Biol 152(4):809–824.

energy window was used to record Z-loss filtered images with the JEOL electron microscope. Images (1,024  $\times$  1,024 pixels) were recorded using a CCD camera (Temcam F214; TVIPS; or Ultrascan 894; Gatan). Tilt series alignment and weighted back-projection reconstruction were performed by using eTomo (IMOD) software (42). PAG 10 at the surface of the sections were used as fiducial markers. Reconstructed structures were computationally identified with the isosurface selection tool in IMOD (42).

**Image Analysis and Quantification.** Melanosome stages were defined by morphology (22, 43). Quantification of the length and width of melanosomes was determined by using iTEM software (Soft Imaging System).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Siska Deforce, who first drew our attention to the silver coat color of Bace2<sup>-/-</sup> mice; C. Delevoye, Tina Ho, Gwendoline Gros, Gaëlle Boncompain, Eric Rubinstein, Francesca Giordano, Guillaume Montagnac, and Jean-Baptiste Brault for technical help, insightful discussions, and critical reading of the manuscript; and V. Fraisier and L. Sengmanivong [The Biolmaging Cell and Tissue Core Facility of the Institut Curie (PICT-IBISA), Institut Curie; Nikon Imaging Center] for assistance with deconvolution microscopy. This work was supported by Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer Grant SL220100601359 (to G.R.), National Institutes of Health Grant R01 AR048155 (to M.S.M.), Fund for Scientific Research Flanders, Katholieke Universiteit Leuven, a Methusalem Grant from Katholieke Universiteit Leuven and the Flemish government, Stichting Alzheimer Onderzoek/ Fondation pour la Recherche sur la Maladie d'Alzheimer (SAO/FRMA), and Interuniversity Attraction Poles Program P7/16 of the Belgian Federal Science Policy Office. B.D.S. is the Arthur Bax and Anna Vanluffelen Chair for Alzheimer's disease.

- Hurbain I, et al. (2008) Electron tomography of early melanosomes: Implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. Proc Natl Acad Sci USA 105(50):19726–19731.
- Theos AC, et al. (2006) A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell* 10(3):343–354.
- Teranishi Y, et al. (2012) Erlin-2 is associated with active gamma-secretase in brain and affects amyloid beta-peptide production. *Biochem Biophys Res Commun* 424(3): 476–481.
- Harper DC, et al. (2008) Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only Golgi-processed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. J Biol Chem 283(4):2307–2322.
- Hoashi T, et al. (2006) The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/ GP100 is required for the formation of organellar fibers. J Biol Chem 281(30): 21198–21208.
- Fredriksson S, et al. (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. Nat Biotechnol 20(5):473–477.
- Ahmed RR, et al. (2010) BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. J Neurochem 112(4):1045–1053.
- Sun X, He G, Song W (2006) BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. FASEB J 20(9): 1369–1376.
- Abdul-Hay SO, Sahara T, McBride M, Kang D, Leissring MA (2012) Identification of BACE2 as an avid β-amyloid-degrading protease. Mol Neurodegener 7:46.
- Esterházy D, et al. (2011) Bace2 is a β cell-enriched protease that regulates pancreatic β cell function and mass. Cell Metab 14(3):365–377.
- van Bebber F, Hruscha A, Willem M, Schmid B, Haass C (2013) Loss of Bace2 in zebrafish affects melanocyte migration and is distinct from Bace1 knock out phenotypes. J Neurochem, 10.1111/jnc.12198.
- Quevedo WC, Jr., Fleischmann RD (1980) Developmental biology of mammalian melanocytes. J Invest Dermatol 75(1):116–120.
- Stutzer I, et al. (2013) Systematic proteomic analysis identifies beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 288(15):10536–10547.
- Leonhardt RM, Vigneron N, Rahner C, Cresswell P (2011) Proprotein convertases process Pmel17 during secretion. J Biol Chem 286(11):9321–9337.
- Dornier E, et al. (2012) TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. J Cell Biol 199(3):481–496.
- Rose AA, et al. (2010) ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS ONE* 5(8):e12093.
- Bennett DC, Lamoreux ML (2003) The color loci of mice-a genetic century. Pigment Cell Res 16(4):333–344.
- Kuhn PH, et al. (2007) Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. J Biol Chem 282(16):11982–11995.
- Delevoye C, et al. (2009) AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. J Cell Biol 187(2):247–264.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR (1996) Computer visualization of threedimensional image data using IMOD. J Struct Biol 116(1):71–76.
- Seiji M, Fitzpatrick TB, Simpson RT, Birbeck MS (1963) Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* 197:1082–1084.

# **Supporting Information**

### Rochin et al. 10.1073/pnas.1220748110

#### **SI Materials and Methods**

Antibodies. Monoclonal antibodies and their sources were as follows. Mouse monoclonal antibodies NKI-beteb [ab34165; used for immunofluorescence microscopy (IFM)] and HMB45 (ab787) to melanocyte protein (PMEL), TA99 to tyrosinase-related protein 1 (TYRP1; ab3312; used for IFM), and 11G2 to a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM)10 (ab59482); rabbit polyclonal antibodies to beta-site cleaving enzyme (BACE)2 (ab8024) and β-tubulin (ab6046); and amyloid precursor protein (APP) luminal domain (ab15272) and horseradish peroxidase-conjugated goat polyclonal antibodies to rabbit IgG (ab6721) and to mouse IgG (ab6789) were from Abcam. Mouse monoclonal antibody to transferrin receptor was from Zymed. Rabbit polyclonal antibody to Flag (F7425) and APP C-terminal domain antibody (A8717) was from Sigma-Aldrich. Rabbit antibodies to the human PMEL N terminus (αPmel-N) (1), C terminus (αPmel-C) (2), residues 326 to 344 ( $\alpha$ Pmel-I) (3), and polycystic kidney disease-like domain (PKD) (I51; gift from P. Cresswell, N. Vigneron, and R. M. Leonhardt, Yale University, New Haven, CT) (4) were described previously. Mouse monoclonal antibody to CD63 was described previously (5). Secondary goat antirabbit or anti-mouse antibodies conjugated to Alexa Fluor-488, 555, or 647 were from Invitrogen. Protein A conjugated to 10or 15-nm gold particles (PAG10, PAG15) were from Cell Microscopy Center (Utrecht University Hospital, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands).

- 1. Berson JF, et al. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. J Cell Biol 161(3):521–533.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. J Cell Biol 152(4):809–824.
- Nichols SE, Harper DC, Berson JF, Marks MS (2003) A novel splice variant of Pmel17 expressed by human melanocytes and melanoma cells lacking some of the internal repeats. *The Journal of investigative dermatology* 121(4):821–830.
- 4. Watt B, et al. (2009) N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils. J Biol Chem 284(51):35543–35555.

siRNA Sequence. The sense strands for the indicated double-stranded siRNAs (21-mers) were synthesized with the following sequences or derived from the following references. siRNA BACE2 1, 5'-C-AUGUGCCACCAACAUAAATT-3'; siRNA BACE2 2, 5'-GA-UUCUCGUUGACACTGGA-3'; siRNA BACE2 4, 5'-CCAUG-AACUCAGCUAUUAATT-3'; and siRNA BACE2 5, 5'-CUA-UUAAGGAAGAGUGGUATT-3' (Qiagen); siRNA ADAM10 was a gift of Eric Rubinstein (6).

**Melanin Assay.** Cells were disrupted by sonication in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, and protease inhibitors. Pigment was pelleted at 20,000 Å~ g for 15 min at 4 °C, rinsed once in ethanol/ether (1:1), and dissolved in 2 M NaOH/20% dimethyl sulfoxide at 60 °C. Melanin content was measured as optical density at 492 nm (7).

**Metabolic Labeling and Immunoprecipitation.** Cells were processed as described previously (1, 8). Briefly, MNT1 cells were metabolically pulse-labeled for 15 to 30 min with [35S]methionine/ cysteine and chased for indicated times. Cell pellets were lysed in 1% (wt/vol) TX, and lysates were clarified by centrifugation for 15 min at 20,000  $\times$  g. Samples were diluted with TX lysis buffer for immunoprecipitation. Immunoprecipitations, SDS/PAGE on 10% polyacrylamide gels, and phosphor imaging analysis were performed as described previously (1).

- Abache T, et al. (2007) The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells. J Cell Biochem 102(3):650–664.
- 6. Arduise C, et al. (2008) Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNFalpha and epidermal growth factor. *Journal of Immunology* 181(10):7002–7013.
- Wasmeier C, et al. (2006) Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. J Cell Biol 175(2):271–281.
- Berson JF, Frank DW, Calvo PA, Bieler BM, Marks MS (2000) A common temperature sensitive allelic form of human tyrosinase is retained in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. J Biol Chem 275(16):12281–12289.



**Fig. 51.** (*A*) Schematic representation of PMEL maturation and the epitopes recognized by the antibodies used in this study. The maturation process is described in the text. Gray bar, membrane; orange, red, burgundy, and blue, distinct PMEL subdomains; green/yellow structures, mature N- and O-linked glycosylation; blue bar, disulfide bond that links M $\alpha$  and M $\beta$ . ICD, intracellular domain of C-terminal fragment (CTF); PC, proprotein convertase. The names of the anti-PMEL antibodies used in this study and the isoforms they recognize are indicated at the top and bottom. NTR, N-terminal region; PKD, polycystic kidney disease protein-1-like repeat domain; RPT, imperfect direct repeats domain; KLD, Kringle like domain; Cyt, cytoplasmic domain. (*B*) BACE2 KO has no effect on melanosome number. Epon-embedded ultrathin sections of retinal pigment epithelium (RPE) cells from control *Bace2<sup>-/-</sup>* or *Bace2<sup>-/-</sup>* mice were analyzed by EM as in Fig. 1*B*, and the number of melanosomes per square micrometer was determined by using iTEM software. (C) Heterogeneous melanin deposits on melanosomes (\*\**P* ≤ 0.01). (*D*) Altered melanosome morphology in skin melanocytes of *Bace2<sup>-/-</sup>* mice. EM analysis of thin sections of epon-embedded dorsal skin of WT (*Bace2<sup>-/-</sup>* mice. Note the presence of large round melanosomes and melanosomes with heterogeneous melanin deposits in *Bace2<sup>-/-</sup>* mice. Note the presence of large round melanosomes and melanosomes with heterogeneous melanin deposits in *Bace2<sup>-/-</sup>* mice. State Stat



**Fig. 52.** (A) Depletion of fibrillar immature melanosomes and accumulation of structures with dense aggregates in BACE2-depleted MNT1 cells. Quantification of different morphologically defined compartments (indicated on x axis) in MNT1 cells treated with control siRNA (siCtrl) or BACE2#2 siRNA (siBACE2#2), expressed as a percentage of the number of endosomal/melanosomal compartments among 200 compartments counted in each cell type (\*\* $P \le 0.01$ ). (B) Ultrastructural analysis of early-stage melanosomes in MNT1 cells depleted of BACE2. Tilt series (*Left*) and tomographic reconstruction (*Right*) corresponding to Fig. 2B.

S A



**Fig. 53.** (A) BACE2 depletion does not significantly affect melanin content. Quantification of melanin content of MNT1 cells treated with control siRNA (siCtrl) or BACE2 siRNA (siBACE2#2). (B) BACE2 depletion does not affect localization of melanosomal proteins. Localization of the mature melanosomal protein TYRP1 was analyzed by IFM relative to the corresponding bright-field image in MNT1 cells treated with control or BACE2 siRNA as indicated. (*Insets*) Magnification of 3× of boxed region. Note the overlap of TYRP1 with pigment granules in both control siRNA and siBACE2#2 samples. (C) BACE2 depletion does not grossly alter PMEL distribution in MNT1 cells. PMEL localization in MNT1 cells treated with control siRNA or siBACE2#2 was analyzed by IFM. Note the punctate distribution of PMEL in both samples.



**Fig. 54.** (*A*) Sheddase cleavage occurs after proprotein convertase cleavage in MNT1 cells. MNT1 cells treated for 24 h with 1  $\mu$ M N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) or DMSO were metabolically pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine and chased as indicated. Triton X-100 cell lysates at each time point were immunoprecipitated with  $\alpha$ PMEL-C, fractionated by SDS/PAGE, and analyzed by phosphor imaging. Migration of molecular weight markers and P1, P2, M $\alpha$ , M $\beta$  and CTF forms of PMEL are indicated. Note that CTF accumulates after the peak accumulation of M $\beta$  in DAPT-treated cells. (*B*) BACE2 depletion impairs sheddase cleavage of M $\beta$  in MNT1 cells. Whole-cell lysates of MNT1 cells treated with four different BACE2 siRNAs were analyzed by immunoblotting using  $\alpha$ PMEL-C, HMB45, and BACE2 antibodies. All four siRNAs caused depletion of CTF, accumulation of M $\beta$ , and depletion of HMB45-reactive PMEL cleavage products, but siBACE2#2 has the strongest effect on the HMB45 and  $\alpha$ PMEL-C signals. (C) Quantification of PLA signal between HMB45 and  $\alpha$ PMEL-C antibodies on 5- $\mu$ m-thick cryosections of RPE of WT and Bace2<sup>-/-</sup> mice. Note the strong PLA signal in the RPE of Bace2<sup>-/-</sup> but not control mice (\*\* $P \le 0.01$ ). (*D*) EM analysis of ultrathin cryosections of RPE of WT and Bace2<sup>-/-</sup> mice Immunogold labeled with HMB45 (PAG 10) and  $\alpha$ PMEL-C (PAG 15) antibodies. Note the presence of both labels on melanosomes in Bace2<sup>-/-</sup> RPE (black arrows). (Scale bar: 200 nm.) (*E*) Excess BACE2 restores sheddase cleavage in cells depleted of endogenous BACE2. MNT1 cells treated with siCtrl or siBACE2#2 for 72 h were transfected with BACE2 or a vector control for 24 h, and whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using  $\alpha$ PMEL-C and BACE2 antibodies. Note that reexpression of BACE2 in BACE2 siRNA cells restored production of Legend continued on following page

CTF. (*F*) Substrate specificity of BACE isoforms. (*Left*) In vitro cleavage assay using soluble recombinant BACE1 or BACE2 added to full-length APP ectopically expressed in HeLa cells and immunoprecipitated with an antibody specific for the APP luminal domain. The product of the cleavage assay was analyzed by immunoblotting using anti-APP C-terminal domain (APP-C) and is shown at lighter (*Upper*) and darker exposures (*Lower*). Note that the 12-kDa  $\beta$ CTF is mainly observed upon incubation with BACE1 (black arrow). (*Right*) In vitro cleavage assay using soluble recombinant BACE1 added to a soluble recombinant PMEL. The product of the cleavage assay analyzed by immunoblotting using  $\alpha$ PMEL-C. Note that the PMEL CTF is not generated upon BACE1 addition. (G) Lysates of MNT-1 cells treated with DMSO,  $\alpha$ -secretase inhibitor IV at low concentration had no effect, but  $\beta$ -secretase inhibitor IV at high concentration increased the M $\beta$  amount. (*H*) PMEL does not colocalize with ADAM10 in MNT1 cells. IFM analysis of MNT1 cells labeled for PMEL (NKIbete; green) and ADAM10 (red). Note the absence of colocalization of ADAM10 with PMEL. (*I*) ADAM10 depletion does not impair PMEL processing in MNT1 cells. Lysates of MNT1 cells reated with ADAM10 siRNA were analyzed by immunoblotting using  $\alpha$ PMEL-C, HMB45, and ADAM10 antibodies. ADAM10 depletion caused only a minor depletion of CTF and HMB45-reactive fibril fragments, and also a minor depletion—rather than the expected accumulation—of M $\beta$ . (*J*) PMEL is differentially cleaved in melanocytic cell lines. Lysates of MNT1 cells and HeLa cells expressing PMEL were analyzed by immunoblotting on 12.5% gels using  $\alpha$ PMEL-C antibody. Both cell lines display a CTF of PMEL were treated with control and BACE2 siRNA and analyzed by immunoblotting on 4%–12% gels by using tubulin,  $\alpha$ PMEL-C, and BACE2 antibodies. The production of the CTF of PMEL is inhibited by BACE2 depletion in MNT1 cells but not in HeLa cells.

# Partie 2. BACE1B se localise au niveau de contacts REendosome

# 2.1. Objectifs

Le but de cette deuxième étude était de caractériser le rôle de la  $\beta$ -sécrétase BACE1 dans la prémélanogenèse.

En parallèle de mon étude sur BACE2, j'ai étudié le possible rôle de BACE1 dans la prémélanogenèse malgré l'absence de défaut de pigmentation apparent des souris *Bace1- /-* (souris au pelage foncé comme les souris sauvages) (Dominguez et al., 2005). En effet, un défaut de prémélanogenèse (affectant la formation des fibres de PMEL) ne se traduit pas toujours par un défaut de pigmentation (par exemple les souris *Pmel-/-* ont un défaut de pigmentation très modeste) (Hellstrom et al., 2011).

# 2.2. Méthodologies

Les études *in vivo* ont été réalisées à partir de tissus, notamment les yeux, de souris *Bace1-/-*, *Bace2-/-* et *Bace1-/-* + *Bace2-/-* qui avaient déjà été générées dans le laboratoire du Pr. Bart de Strooper (Dominguez et al., 2005). Ces tissus ont été analysés par des techniques de microscopie électronique (enrobage en résine EPON pour l'étude morphologique conventionnelle).

Les études *in cellulo* ont été réalisées sur une lignée de cellules mélanocytes, MNT1. Ces cellules MNT1 ont été traitées : par siRNA (déplétion) dirigés contre BACE1 ou par transduction de constructions plasmidiques codant pour BACE1A (Jean Baptiste Brault, Institut Curie, Paris), BACE1B (Patrick Keller, MPI-CBG Dresden, Allemagne), VAP-A et ORP1L-ΔORD (Jacques Neefjes, Netherlands Cancer Institut, Amsterdam, Pays-Bas). Les cellules après traitement ont été analysées par une ou plusieurs des techniques suivantes : western blot ; RT-PCR ; immunofluorescence; HPF, cryo-substitution, et immunomarquage à l'or colloïdal sur coupes congelées (microscopie électronique). Les études *in cellulo* ont également été réalisées sur une lignée de cellules non pigmentaires, les cellules HeLa. Ces cellules HeLa ont été traitées : par transduction de constructions plasmidiques codant pour BACE1B (Patrick Keller, MPI-CBG Dresden, Allemagne), VAP-A et ORP1L-ΔORD

(Jacques Neefjes, Netherlands Cancer Institut, Amsterdam, Pays-Bas). Les cellules après traitement ont été analysées par une ou plusieurs des techniques suivantes : co-immunoprécipitation et immunofluorescence.

Les études de clivage *in vitro* ont été réalisées à partir d'une protéine recombinante soluble humaine PMEL ou de la protéine APP (Jean Baptiste Brault, Institut Curie, Paris) immunoprécipitée à partir d'un lysat cellulaire de HeLa exprimant ectopiquement l'APP; et de protéines recombinantes solubles humaines de BACE2 et BACE1. PMEL ou APP et BACE1 ou BACE2 ont été mélangées dans un tampon de clivage adéquat et les produits de réaction ont été analysés par western blot.

### 2.3. Résultats préliminaires

### 2.3.1. L'absence de Bacel affecte la prémélanogenèse in vivo

Bien que les souris *Bace1-/-*, ne possèdent pas de défaut apparent de pigmentation, l'analyse morphologique par microscopie électronique des mélanosomes de l'EPR indique un défaut de formation de fibres amyloïdes chez ces souris. En effet, les mélanosomes des souris *Bace1-/-* ont une morphologie arrondie au lieu d'allongée (Figure 25A) - l'allongement des mélanosomes attestant de la bonne formation des fibres de PMEL (Watt et al., 2013). La quantification des mélanosomes selon le rapport longueur/largeur (R) montre une augmentation significative des mélanosomes ronds ( $1 \le R \le 1,5$ ) corrélée à une diminution significative des mélanosomes très allongés ( $2 \le R$ ) dans la situation BACE1-/- par rapport à la situation contrôle (Figure 25B). Ces résultats indiquent donc que les fibres de PMEL ne se forment pas correctement dans l'EPR des souris *Bace1-/-* et que BACE1 est impliquée dans la prémélanogenèse.



Figure 25 : La prémélanogenèse est affectée chez les souris Bace1-/-.

(A) Les EPR des souris contrôles (*Bace1+/+*) et des souris Bace1-/- ont été observés au microscope électronique après enrobage en EPON et ultramicrotomie. Les flèches blanches pointent des mélanosomes allongés dans la situation contrôle, et des mélanosomes ronds et anormaux dans la situation *Bace1-/-*. (Barre d'échelle 1µM). (B) Quantification des mélanosomes contenus dans les EPR des souris *Bace1+/+* et *Bace1-/-* (en fonction de leur ratio R, longueur sur largueur) exprimée en fonction du pourcentage total de compartiments (logiciel iTEM). (\*\*p  $\leq$  0,01).

En complément, j'ai également analysé l'EPR des souris double KO BACE1 et BACE2 (qui présentent un défaut de pigmentation identique aux souris KO BACE2), et comparé le phénotype des souris Bace1-/- avec ceux des souris Bace2-/- et Bace1-/-, Bace2-/-. Les souris Bace1-/- présentent un défaut de formation de fibres dans l'EPR (augmentation des mélanosomes ronds), cependant le phénotype de ces souris diffèrent de celui des souris Bace2-/-. Premièrement, il y a un plus grand nombre de mélanosomes arrondis dans l'EPR des souris *Bace1-/-* que dans celui des souris *Bace2-/-* (pourcentage du rapport  $1 \le R \le 1,5$ , plus élevé) (Figure 26B). Deuxièmement, dans l'EPR des souris Bace2-/-, le dépôt de mélanine est très affecté (pourcentage de mélanosomes présentant un dépôt de mélanine hétérogène très élevé) alors que dans celui des souris Bacel-/-, le dépôt de la mélanine ne l'est pas par rapport au souris contrôles (Figure 26C). L'absence de Bacel associée à celle de Bace2 induit un phénotype combinant les défauts de mélanogenèse observés chez les souris Bace1-/- et ceux observés chez les souris Bace2-/- (Figure 26A). Dans l'EPR des souris Bace1-/-, Bace2-/-, les mélanosomes présentent un phénotype morphologique intermédiaire entre celui des souris Bace1-/- et celui des souris Bace2-/- et le dépôt de la mélanine est altéré de la même manière que pour les souris Bace2-/- (Figure 26B et C). Finalement, on peut constater une diminution de 10% du nombre de mélanosomes par  $\mu m^2$  de EPR dans le cas des souris Bace1-/-, Bace2-/-, alors que ce nombre n'est pas affecté dans le cas des souris Bace1-/- et *Bace2-/-*, par rapport aux souris contrôles (Figure 26D). Ces observations indiquent que ces deux protéines ont un rôle différent et n'interviennent donc pas de la même manière dans la prémélanogenèse.









Figure 26 : Les souris Bace1-/-, Bace2-/- ont un phénotype plus sévère que les souris Bace1-/- ou Bace2-/-.

(A) Les EPR des souris contrôles sauvages (*WT* pour wild type), *Bace1-/-*, *Bace2-/-* et *Bace1-/-*, *Bace2-/-* et *Bace1-/-*, *Bace2-/-* et *Bace1-/-*, *Bace2-/-* et *ace1-/-*, *Bace2-/-* et *ace1-/-*, *Bace2-/-* et *ace1-/-*, *Bace2-/-* et *ace1-/-*, *Bace2-/-*. Les flèches blanches pointent des mélanosomes allongés dans la situation contrôle, et des mélanosomes ronds et anormaux dans les situation *Bace1-/-* et/ ou *Bace2-/-*. (Barre d'échelle 1µM). (B) Quantification des mélanosomes contenus dans les EPR des souris *WT* et *Bace1 et/ou 2-/-*, en fonction de leur ratio R, longueur sur largueur, exprimée en fonction du pourcentage total de compartiments (logiciel iTEM). (\*\*p  $\leq$  0,01). (C) Quantification des mélanosomes contenus dans les EPR des souris *WT* et *Bace1 et/ou 2-/-*, en fonction du pourcentage total de compartiments (logiciel iTEM). (b) Quantification du nombre de mélanosomes par µm2 de EPR pour les souris *WT* et *Bace1 et/ou 2-/-* (logiciel iTEM).

2.3.2. BACE1 ne clive pas PMEL mais sa déplétion affecte la maturation des mélanosomes et la formation des fibres de PMEL

Pour comprendre comment BACE1 affecte la prémélanogenèse dans les cellules pigmentaires, j'ai utilisé la lignée mélanocytaire MNT1. La déplétion par siRNA de BACE1 dans les cellules MNT1, couplée à une analyse biochimique du clivage de PMEL par western blot, montre que BACE1 n'est pas impliquée dans le clivage amyloïdogénique de PMEL. Grâce à l'utilisation de l'anticorps  $\alpha$ -Pmel-C, ces expériences indiquent que la déplétion de BACE1 (siBACE1) ne perturbe pas le clivage du domaine M $\beta$  de PMEL en CTF (Figure 27). Des expériences de clivage *in vitro* montrent également qu'une forme recombinante soluble de BACE1 ne peut pas cliver PMEL, alors qu'elle est capable de cliver l'APP dans les mêmes conditions (voir les « Supporting information » de l'article sur BACE2).



Figure 27 : BACE1 n'est pas impliquée dans le clivage amyloïdogénique de PMEL.

Les lysats TX-100 (Triton X-100) solubles des cellules MNT1 traitées avec le siRNA contrôle (siCtrl) ou avec le siBACE1#1 ont été analysés par WB en utilisant des anticorps dirigés contre la portion C-ter de PMEL (aPmel-C), BACE1 et la tubuline (contrôle de dépôt). Les lysats TX-100 insolubles de ces mêmes cellules ont été analysés par WB en utilisant un anticorps dirigé contre des épitopes associés aux fibres de PMEL (HMB45).
Même si BACE1 n'est pas impliquée dans le clivage de PMEL, l'analyse par western blot du lysat TX-insoluble des cellules déplétées pour BACE1 montre une forte réduction du signal associé aux fibres de PMEL (détectées par l'anticorps HMB45) par rapport à la situation contrôle (Figure 27). De plus, l'analyse morphologique par microscopie électronique des cellules MNT1 déplétées pour BACE1 atteste d'un défaut de formation de fibres amyloïdes. Alors que dans les cellules contrôles on peut apprécier la formation de fibres organisées dans des mélanosomes bien allongés, les cellules siBACE1 présentent une accumulation de compartiments de types mélanosomes de stade I/ endosomes de tri et CMV (Figure 28A). Ces compartiments, ainsi que d'autres (lysosomes et mélanosomes de stade II, III et IV) ont été quantifiés en fonction de leur morphologie. Ces quantifications témoignent d'une augmentation significative des CMV (notés MVE sur le graphe, pour multivesicular endosome) et des mélanosomes de stades I, associée à une diminution significative des lysosomes et des mélanosomes de stade II (Figure 28B). Ces résultats semblent indiquer que la déplétion de BACE1 a un effet général sur les compartiments endosomaux en influant aussi bien sur la maturation des mélanosomes que sur la dégradation lysosomale. Parallèlement, l'immunomarquage en microscopie électronique des cellules déplétées pour BACE1 montre, grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique du domaine luminal de PMEL (Nki-beteb), que PMEL s'accumule dans la lumière de certains CMV (Figure 28C). L'ensemble de ces observations par microscopie électronique, m'a conduit à émettre l'hypothèse suivante : la déplétion de BACE1 affecte la formation des fibres de PMEL et la maturation des mélanosomes de stades I en stade II. Au lieu de maturer en stade II, les mélanosomes de stades I maturent en CMV. D'autre part ces CMV semblent incapables de fusionner avec les lysosomes, d'où l'accumulation de PMEL dans des CMV. Ces observations ont soulevé deux questions importantes : Quelles isoformes de BACE1 sont exprimées dans les mélanocytes ? Et comment ces isoformes peuvent-elle être impliquées à la fois dans l'homéostasie endosomale, la formation des fibres de PMEL et la maturation des mélanosomes ?



Figure 28 : La déplétion de BACE1 affecte la formation des fibres de PMEL.

(A) Les cellules MNT1 traitées avec le siRNA contrôle (siCtrl) ou avec le siBACE1#1 ont été observées au microscope électronique après fixation par congélation à haute pression et cryo-substitution. Les flèches noires pointent un mélanosome de stade II dans la cellule siCtrl, et des compartiments de type mélanosome de stade I/ endosome de tri ou CMV dans la cellule siBACE1#1 (voir encarts). (Barre d'échelle 500 nm). (B) Quantification de différents types de compartiments (en fonction de leur morphologie) contenus dans les cellules MNT1 traitées avec le siCtrl ou avec le siBACE1#1, exprimée en fonction du pourcentage total de compartiments. (\*\* $p \le 0,01$ ) (MVE : multivesicular endosome). (C) L'analyse par microscopie électronique de cryo-sections ultrafines de cellules MNT1 traitées avec le siCtrl ou avec le siBACE1#1, immunomarquées par un anticorps dirigé contre le domaine luminal de PMEL (Nki-beteb, PAG 10).

2.3.3. BACE1B l'isoforme majoritaire dans les MNT1, co-localise et interagit avec VAP-A dans le RE

BACE1 existe sous différentes isoformes qui ne semblent pas avoir les mêmes rôles (Figure 29). BACE1A, l'isoforme la plus longue, est impliquée dans le clivage de l'APP et de bien d'autres substrats (Hemming et al., 2009; Yan and Vassar, 2014). BACE1A est majoritairement localisée dans le TGN et les endosomes (Sannerud and Annaert, 2009). BACE1B et BACE1C sont des isoformes plus courtes, et sont dépourvues d'activité catalytique. Ces deux isoformes sont localisées dans le RE et leur fonction dans ce compartiment n'a pas encore été caratérisée (Ehehalt et al., 2002).



Figure 29 : Les différentes isoformes de BACE1.

Il existe différentes isoformes de BACE1. BACE1A est la forme entière de BACE1 (501 acides aminés). BACE1B et BACE1C sont des formes plus courtes (476 et 457 acides aminés respectivement) issues de l'épissage alternatif de Bace1. Ces deux isoformes sont tronquées au niveau du domaine catalytique de BACE1 (25 acides aminés en moins pour BACE1B, 44 en moins pour BACE1C) et ne possèdent pas d'activité enzymatique.

Pour tenter de répondre à mes interrogations, j'ai tout d'abord analysé l'expression des différentes isoformes de BACE1 dans les cellules MNT1, par RT-PCR. Mes résultats préliminaires montrent que les trois isoformes de BACE1 sont exprimées dans les MNT1, mais que BACE1B est l'isoforme majoritaire (Figure 30). J'ai donc essentiellement focalisé mon étude sur l'isoforme BACE1B.



*Figure 30 : BACE1B est l'isoforme majoritairement exprimée dans les cellules MNT1.* 

Les taux d'expression endogènes des isoformes BACE1A, B et C ont été mesurés par RT-PCR dans les cellules MNT1. (Quantification relative aux taux d'ARNm selon la formule  $2-\Delta Ct$ ).

Comment BACE1B, une protéine localisée dans le RE pourrait-elle influer sur la maturation des mélanosomes ? Des contacts étroits RE-mélanosomes existent dans les mélanocytes et sont nettement visibles grâce à l'utilisation de la tomographie électronique (Figure 31). Ces contacts sont probablement impliqués dans la maturation des mélanosomes. Une hypothèse intéressante serait que l'isoforme BACE1B puissent jouer un rôle au niveau des contacts RE-mélanosomes impliqués dans la maturation des mélanosomes.



Figure 31 : Contacts étroits entre RE et mélanosomes précoces dans les cellules MNT1.

Reconstruction 3D en tomographie électronique à partir de coupes épaisses (300-400 nm) de cellules MNT1 fixées par congélation à haute pression, et analysées par microscopie électronique à transmission. Des séries d'images ont été acquises avec un logiciel de tomographie, puis reconstruites pour établir un modèle 3D. (En jaune : fibres, en vert : ILV, en rouge : membrane du mélanosome de stade I et en jaune pâle : réticulum endoplasmique, RE) (Ilse Hurbain, non publié). (Barre d'échelle :  $0,1 \mu m$ ).

Ma première approche pour confirmer cette hypothèse a été d'exprimer ectopiquement les différentes isoformes de BACE1 dans les MNT1 afin de vérifier leur localisation. L'isoforme BACE1A est localisée dans des compartiments post-golgien dans les MNT1, et plus particulièrement dans des endosomes de recyclage (marqués par un anticorps dirigé contre le récepteur à la transferrine, Rtf) (Figure 32).



*Figure 32 : BACE1A se localise dans des compartiments de recyclage dans les cellules MNT1.* 

Les cellules transduites avec un vecteur BACE1A-GFP ont été analysées par IF en utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur à la transferrine Rtf. Les images ont été prises au microscope confocal, puis traitées avec un logiciel de déconvolution. Un agrandissement d'une région subcellulaire permet de mieux distinguer la co-localisation partielle entre la protéine BACE1A-GFP et le récepteur à la transferrine (encart).

L'isoforme BACE1B, surexprimée ectopiquement dans les cellules MNT1, se localise bien dans le RE (expression très diffuse, caractéristique du RE), tout comme BACE1C (donnée non montrée). En co-exprimant BACE1B avec une construction VAP-A, une protéine résidente du RE connue pour être impliquée dans les contacts RE-endosomes (Rocha et al., 2009), j'ai pu montrer que ces deux protéines co-localisaient dans les mêmes régions subcellulaires des cellules MNT1 (Figure 33).



Figure 33 : BACE1B co-localise dans le RE avec VAP-A dans les cellules MNT1.

Les cellules MNT1 transduites avec les vecteurs BACE1B-GFP et VAP-A-HA ont été analysées par IF. Les images ont été prises au microscope confocal, puis traitées avec un logiciel de déconvolution.

J'ai par la suite cherché à savoir si ces deux protéines pouvaient interagir en surexprimant BACE1B et VAP-A dans des cellules HeLa (qui sont plus facilement transfectables que les MNT1) afin de réaliser une expérience de co-immunoprécipitation (co-IP). Dans les cellules HeLa, BACE1B interagit (Figure 34B) et co-localise avec VAP-A au niveau du RE (Figure 34A).



Figure 34 : BACE1B interagit avec VAP-A dans les cellules HeLa.

(A) Les cellules HeLa transduites avec les vecteurs BACE1-GFP (isoformes A, B et C) et VAP-A-HA ont été analysées par IF. Les images ont été prises au microscope confocal, puis traitées avec un logiciel de déconvolution. (B) Expérience de co-IP à partir de lysats de cellules HeLa, transduites avec les vecteurs BACE1-GFP (ou un vecteur GFP seul pour contrôle) et VAPA-HA, qui ont été analysés par WB en utilisant des anticorps dirigés contre les tag HA et GFP.

#### 2.3.4. BACE1B se localise au niveau de contacts RE-endosomes tardifs dans les HeLa

Le fait que BACE1B et VAP-A co-localisent et interagissent au niveau du RE dans des cellules non spécialisées, suggère que BACE1B pourrait bien jouer un rôle dans la maturation des compartiments endosomaux en général. Pour montrer que BACE1B se localise au niveau des contacts RE-endosomes dans les cellules HeLa, j'ai tout d'abord réalisé des expériences d'immunofluorescence en utilisant une construction BACE1B et un anticorps dirigé contre LAMP1 (le marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes). Ces expériences montrent que le signal associé à BACE1B est parfois apposé au signal de LAMP1 (souvent autour du signal LAMP1) (Figure 35).



Figure 35 : BACE1B co-localise partiellement avec LAMP1 dans les cellules HeLa.

Les cellules HeLa transduites avec le vecteur BACE1B-GFP ont été analysées par IF en utilisant un anticorps dirigé contre le marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes, LAMP1. Les images ont été prises au microscope confocal, puis traitées avec un logiciel de déconvolution. Des agrandissements de régions subcellulaires permettent de mieux distinguer les appositions entre la protéine BACE1B-GFP et les endosomes tardifs/ lysosomes (encart).

Pour renforcer ces résultats et prouver que BACE1B se localise bien au niveau de contact ERendosomes tardifs dans les HeLa, j'ai utilisé une construction appelée  $\Delta$ ORD qui est une forme mutée de la protéine ORP1L (Rocha et al., 2009). ORP1L est localisée au niveau de la membrane des endosomes tardifs et est impliquée dans la formation de contacts REendosomes, grâce à son interaction avec la protéine VAP-A (Rocha et al., 2009). Le mutant  $\Delta$ ORD, est une forme tronquée de ORP1L (**Figure 36A**) qui force l'interaction entre ORP1L- $\Delta$ ORD et VAP-A, augmentant ainsi la formation de contacts REendosomes (**Figure 36B**). Ce mutant  $\Delta$ ORD se localise donc majoritairement, avec VAP-A, au niveau des contacts REendosomes (Rocha et al., 2009).



Figure 36 : Le mutant  $\triangle ORD$  de Orp11 augmente les contacts RE-endosomes.

(A) ORP1L est associée à la membrane des endosmes via son domaine PH. Avec son domaine FFAT, elle peut interagir avec la protéine du RE VAP-A. Cette interaction permet la formation de contacts étroits RE-endosomes. ORP1L possède également un domaine ORD lui permettant « sentir » le cholestérol au niveau de la membrane des endosomes. (B) Le groupe de Jacques Neefjes a synthétisé une forme tronquée de ORP1L au niveau du domaine ORD, appelée  $\Delta$ ORD. Cette protéine recombinante ne peut plus interagir avec le cholestérol membranaire et se retrouve forcée à interagir avec VAP-A, augmentant ainsi les contacts RE-endosomes (Rocha et al., 2009). (ORD : OSBP-related domain, capable de lier le cholestérol ; FFAT : two phenylalanines [FF] in an acidic tract, le domaine d'interaction avec VAP ; PH : pleckstrin homology domain, se lie aux phosphoinositides).

Les observations par microscopie à fluorescence de cellules HeLa transduites avec les constructions BACE1B et ORP1L- $\Delta$ ORD, puis marquées par l'anticorps LAMP1, montrent que BACE1B et ORP1L- $\Delta$ ORD co-localisent au niveau de compartiments LAMP1 positifs (Figure 37).



Figure 37 : BACE1B co-localise avec le mutant  $\Delta ORD$  au niveau des endosomes tardifs dans les cellules HeLa.

Les cellules HeLa transduites avec les vecteurs BACE1B-GFP et  $\Delta$ ORD ont été analysées par IF en utilisant un anticorps dirigé contre le marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes, LAMP1. Les images ont été prises au microscope confocal, puis traitées avec un logiciel de déconvolution. Un agrandissement d'une région subcellulaire permet de mieux distinguer la co-localisation entre la protéine BACE1B-GFP et le mutant  $\Delta$ ORD ainsi que les appositions entre ces deux protéines et les endosomes tardifs/ lysosomes (encart).

Ces expériences montrent que BACE1B (probablement via son interaction avec VAP-A) se localise au niveau des contacts RE-endosomes tardifs formés par l'interaction ORP1L- VAP-A, dans les HeLa. Bien que le rôle de ORP1IL n'ait pas encore été démontré dans la mélanogenèse, deux des interactants directs de ORP1L, Rab7 et RILP sont déjà connus pour être impliqués dans la mélanogenèse (Jordens et al., 2006). Les résultats obtenus dans les HeLa sont actuellement en cours d'acquisition et d'analyse dans les MNT-1.

Même si les rôles d'ORP1L, VAP-A et BACE1B doivent être confirmés dans les MNT1, l'ensemble de mes données préliminaires me permet de proposer le modèle suivant : Dans les mélanocytes, des contacts RE-mélanosomes de stade I (Figure 38) seraient induits par l'interaction de ORP1L-VAP-A (Rocha et al., 2009). BACE1B, en interagissant avec VAP-A, serait recrutée au niveau de ces contacts. Les contacts RE-mélanosomes de stade I seraient impliqués dans la maturation du mélanosome de stade I en stade II. Ces contacts pourraient notamment permettre l'échange de facteurs nécessaires à la maturation du compartiment et plus précisément à la formation des fibres de PMEL, comme par exemple certains lipides tel que le cholesterol. BACE1B de part son interaction avec VAP-A, régulerait l'échange de ces facteurs à l'interface RE-mélanosome de stade I. L'absence de BACE1B affecterait l'échange efficace de ces facteurs et ce malgré la formation de contacts. Au final, le mélanosome de stade I ne maturerait plus en mélanosome de stade II mais plutôt en CMV (Figure 38). Dans les cellules non-pigmentaires, l'absence de BACE1 affecterait également la voie endo-lysosomale classique, les endosomes précoces ne pourraient plus maturer correctement en endosomes tardifs qui eux-mêmes ne pourrait plus fusionner correctement avec les lysosomes.



Figure 38 : Modèle des contacts RE-melanosomes.

Les mélanosomes précoces se déplacent le long des microtubules grâce au moteur moléculaire la kinésine, et établissent des contacts avec le RE ; ces contacts étroits permettraient l'échange de facteurs impliqués dans la maturation du mélanosome de stade I en mélanosome de stade II. Ces contacts seraient assurés par la présence de la protéine ORP1L à la membrane du mélanosome et de VAP-A à la membrane du RE. BACE1B est localisée dans le RE comme VAP-A et il semblerait qu'elles puissent réguler les contacts RE-mélanosomes en interagissant avec VAP-A. L'absence de BACE1 compromettrait la maturation du mélanosome de stade I en mélanosome de stade II.

#### 2.4. Conclusions

Mes résultats préliminaires sur BACE1 suggèrent que l'isoforme BACE1B (via son interaction avec VAP-A) se localise au niveau des contacts RE-endosomes formés par l'interaction VAP-A-ORP1L, dans des cellules non spécialisées (HeLa). Cette localisation très particulière nous indique que BACE1B en résidant dans le RE pourrait bien jouer un rôle au niveau de ces contacts RE-endosomes, en général. Dans les cellules pigmentaires, les endosomes étant détournés de leur fonction classique pour initier notamment la pré-mélanogenèse, BACE1B pourrait jouer un rôle au niveau des contacts RE-mélanosomes. Ces contacts seraient eux-mêmes impliqués dans la maturation des mélanosomes de stade I en mélanosomes de stade II, en permettant l'échange de facteurs nécessaires à cette maturation et plus particulièrement à la formation des fibres de PMEL. Cela expliquerait pourquoi la suppression de l'expression de *Bace1 in vivo* aboutit à une altération de la formation des fibres amyloïdes de PMEL.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle des  $\beta$ -sécrétases BACE1 et BACE2 dans la formation de fibres amyloïdes physiologiques et fonctionnelles au cours de la mélanogenèse. Mes études ont montré que ces enzymes jouaient toutes deux un rôle dans la mélanogenèse mais que BACE2 était la seule à être impliquée directement dans le clivage amyloïdogénique de PMEL. BACE1, quant à elle, est impliquée dans la maturation des mélanosomes précoces en mélanosomes matures via des contacts étroits RE-mélanosomes.

# 1. La spécificité de clivage de PMEL par BACE2

BACE1 et BACE2 sont des protéases à acide aspartique et elles partagent environ 75% d'homologie au niveau de leur séquence d'acides aminés (Sun et al., 2006). Il est surprenant de voir que deux enzymes qui partagent autant d'homologie ne soient pas impliquées toutes les deux dans le clivage de PMEL. Il y a plusieurs explications à cette spécificité de clivage.

#### 1.1. La spécificité dans la localisation tissulaire

Premièrement, bien qu'elles soient ubiquitaires, la localisation de ces enzymes dans l'organisme diffère. BACE1 est fortement exprimée dans le cerveau et peu dans les tissus périphériques. A l'inverse, BACE2 est faiblement exprimée dans le système nerveux central et fortement exprimée dans des tissus tels que le colon, les reins, le pancréas, le placenta et l'estomac (Sun et al., 2006). Cette différence d'expression tissulaire ne favorise donc pas la compétition entre ces enzymes pour le même substrat, d'autant plus que les patrons d'expression des substrats est aussi tissu spécifique. Dans le contexte de ma recherche, deux études ont montré que BACE2 était plus fortement exprimée que BACE1 dans les cellules pigmentaires de la rétine (EPR, choroïde), suggérant que BACE2 soit la  $\beta$ -sécrétase majoritaire dans les cellules pigmentaires en générale (Cai et al., 2012; J. Wang et al., 2012). Il serait intéressant de comparer les taux d'expression de BACE1 et BACE2 dans l'épiderme de souris sauvages, ainsi que dans une lignée de mélanocytes humains par la technique de RT-

PCR afin de démontrer que BACE2 est bien la  $\beta$ -sécrétase majoritaire dans les mélanocytes de la peau.

1.2. La spécificité dans la localisation subcellulaire

Deuxièmement, même si BACE1 et BACE2 sont très similaires, leurs localisations subcellulaires à l'état d'équilibre sont différentes. BACE1 et BACE2 sont des protéines transmembranaires transitant par la voie de sécrétion avant d'être transportées à la membrane plasmique puis internalisées. Cependant, BACE1 est beaucoup plus stable que BACE2. BACE1 est détectable dans les endosomes, alors que BACE2 ne reste pas dans les endosomes et est vite dégradée dans les lysosomes (Yan, Munzner, et al., 2001). Si la majorité de BACE1 est localisée dans le TGN et les endosomes, la localisation de BACE2 est beaucoup plus diffuse (elle se localise dans le RE, le golgi, le TGN, la membrane plasmique et les endosomes/ lysosomes). Cette différence de compartimentalisation entre BACE1 et BACE2 contribue à leur assurer un certain niveau de spécificité. Mes expériences ont montré que BACE2 (surexpression) co-localisait partiellement avec PMEL dans les mélanosomes des cellules MNT1. Une étude plus détaillée du trafic de BACE2 dans les MNT1 grâce à la microscopie à fluorescence (en utilisant différents marqueurs de la voie endo-lysosomale) permettrait d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de régulation du clivage de PMEL par cette enzyme, dans les mélanocytes.

#### 1.3. Différence de conformation

Troisièmement, malgré leur forte homologie de séquence (les structures primaires de BACE1 et BACE2 sont très similaires), les deux protéases présentent des différences structurales (Fluhrer et al., 2002; Ostermann et al., 2006). Cette différence de conformation joue sur la manière dont ces deux enzymes sont activées. En effet, même si BACE1 et BACE2 sont toutes les deux synthétisées dans le RE sous une forme zymogène puis activées par clivage de leurs pro-domaines, le pro-domaine de BACE1 est clivé par une protéine de la famille des furines alors que celui de BACE2 est clivé par BACE2 elle-même (clivage auto-catalytique) (Sun et al., 2006). De plus, BACE1 peut être active sous forme zymogène, le clivage de son pro-domaine permettant d'augmenter son taux d'activité (Vassar et al., 2009). BACE2, quant à elle, n'est pas active sous forme zymogène et doit être clivée pour jouer son rôle d'enzyme (Hussain et al., 2001). Ensuite, comme toutes les protéases à acide aspartique, BACE1 et BACE2 sont surtout actives à pH acide (Abdul-Hay et al., 2012; Vassar et al., 1999). BACE1

clive de manière optimale à un pH d'environ 4,5 alors que BACE2 est le plus efficace à un pH bien plus acide d'environ 3,5 (Abdul-Hay et al., 2012; Vassar et al., 1999). Enfin, il a été montré que les domaines transmembranaires de ces deux enzymes étaient impliqués dans leur localisation subcellulaire - le domaine transmembranaire de BACE1 est nécessaire à sa rétention dans le TGN (Yan, Han, et al., 2001). Il existe d'autres formes de régulation. Il a été notamment montré que BACE1 était phosphorylée, palmitoylée et ubiquitinée et que ces évènements étaient importants pour sa localisation subcellulaire (Kang et al., 2012; Vassar et al., 2009). Il serait intéressant de savoir quels types de modifications post-traductionnelles BACE2 pourrait subir dans les mélanocytes, et comment ces modifications influenceraient sa localisation subcellulaire et son activité enzymatique.

#### 1.4. La spécificité du site de clivage

Le quatrième et dernier point, concerne les sites de clivage de BACE1 et BACE2. Devant la grande diversité des substrats de BACE1 (et probablement de BACE2) il n'est pas possible d'établir un site de clivage consensus pour cette enzyme. Cependant certaines associations d'acides aminés optimisent le clivage de substrats par BACE1. Dans le cas de l'APP, il a été montré que BACE1 clivait préférentiellement au niveau de séquences riches en acides aminés de type acide, alors que BACE2 clivait préférentiellement au niveau de séquences riches en acides aminés hydrophobes (apolaires) (Farzan et al., 2000). En raison de cette spécificité de clivage, il a été proposé que BACE2 soit nommée  $\theta$ -sécrétase car elle ne clive l'APP ni au  $\beta$ site ni au niveau des sites de clivage par les α-sécrétases (ADAM) (Sun et al., 2006). Parallèlement à mes travaux, une autre étude a montré le rôle direct de BACE2 (en excluant celui de BACE1) dans le clivage d'une protéine transmembranaire appelée TMEM27. En étudiant le site de clivage putatif s2p de PMEL et ceux de TMEM27 par BACE2, on constate qu'ils ont en commun avec d'autres substrats connus de BACE2 la présence d'un ou plusieurs acides aminés apolaires (notamment une leucine) (Esterhazy et al., 2011). En complément de mon étude sur BACE2, des travaux non publiés et effectués en parallèle dans le laboratoire ont montré par mutagénèse dirigée que le site de clivage putatif s2p de PMEL, décrit par Kummer (Kummer et al., 2009), s'étendait sur un dizaine d'acides aminés, suggérant l'existante de plusieurs sites de clivage localisés dans la même région de la protéine.

L'ensemble des éléments évoqués ci-dessus tend à expliquer comment deux enzymes très similaires peuvent être spécifiques d'un substrat donné.

Une étude antérieure menée dans les cellules HeLa (exprimant PMEL de manière ectopique) avait identifié les  $\alpha$ -sécrétases ADAM10 et ADAM17 comme étant deux enzymes impliquées dans le clivage amyloïdogénique (site s2p) de PMEL (Kummer et al., 2009). Mes résultats montrent que dans la lignée mélanocytaire MNT1, ADAM10 est présente à la membrane plasmique et ne co-localise pas intracellulairement avec PMEL. De plus, ni l'inhibition de l'activité des a-sécrétases ni la déplétion d'ADAM10 n'affectent le clivage amyloïdogénique de PMEL. Mes expériences montrent d'autre part que la déplétion de BACE2 dans les HeLa n'affecte pas la production du CTF de PMEL à partir du Mß comme dans les MNT1. Ces résultats, en accord avec d'autres études (Theos, Truschel, et al., 2006), soulignent le fait que les mécanismes exploités par les HeLa pour assurer la formation des fibres amyloïdes de PMEL (exprimée de façon ectopique) sont différents de ceux exploités dans les MNT1. Ils prouvent également que les cellules MNT1 sont un modèle plus physiologique que les cellules HeLa pour l'étude du clivage de PMEL. Finalement, mes études dans les MNT1 suggèrent que l'enzyme ADAM10 serait impliquée dans le « shedding » de PMEL à la membrane plasmique plutôt que dans le clivage de PMEL au niveau des mélanosomes de stade I (Hoashi et al., 2010).

# 2. L'implication de BACE2 et PMEL dans la pigmentation

# 2.1. Le rôle de Bace2 dans la pigmentation chez les vertébrés

Beaucoup de gènes impliqués dans la mélanogenèse ont été découverts parce que leurs mutations dans le cadre de pathologies conduisent à un défaut de pigmentation (Cortese et al., 2005; Costin et al., 2003; Orlow and Brilliant, 1999; Sarangarajan and Boissy, 2001). Les gènes régulant les étapes précoces de la mélanogenèse sont plus difficilement caractérisables car leurs mutations n'induisent pas toujours des défauts pigmentation (Theos, Truschel, et al., 2006). Malgré le modeste effet de la perte d'activité catalytique de BACE2 sur la pigmentation *in vivo*, mon travail de thèse m'a permis de montrer que ce gène jouait un rôle majeur dans la formation des fibres de PMEL au cours de la mélanogenèse. En accord avec mes résultats, une publication récente par un autre laboratoire a montré que la perte de BACE2 (mais pas celle de BACE1) avait également un modeste effet sur la pigmentation chez le modèle zebra fish, et qu'elle affectait la morphologie des mélanosomes (van Bebber et al., 2013). Cela suggère que le rôle de BACE2 dans la pigmentation soit très conservé chez les vertébrés. Il faudrait vérifier que PMEL soit bien clivée par BACE2 dans l'épiderme des zebra fish en utilisant des cultures primaires de mélanocytes. L'anticorps spécifique des fibres

de PMEL, HMB45, qui a déjà été utilisé pour marquer des mélanomes induits chez le zebra fish, pourrait être un bon outil (Santoriello et al., 2010).

#### 2.2. L'a-MSH, l'hormone de l'eumélanogenèse

Le déterminant majeur de la pigmentation est l'activité des mélanocytes qui se base sur la synthèse de la mélanine et le transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes. Cette synthèse et ce transfert de mélanine sont eux-mêmes dépendants de facteurs externes aux mélanocytes, notamment les UV et l'α-MSH (Melanocyte Stimulating Hormone). Sous l'effet des UV, les kératinocytes secrètent l'hormone α-MSH qui stimule la production de l'eumélanine dans les mélanocytes. Cette stimulation de la synthèse d'eumélanine est initiée par la liaison de l' α-MSH à son récepteur transmembranaire appelé MCR-1, qui est exprimé à la surface des mélanocytes. La protéine agouti ou ASP (Agouti Signaling Protein) est un antagoniste de l'a-MSH, qui agit par compétition au niveau du récepteur MCR-1 (MelanoCortin 1 Receptor). L'ASP au contraire de l'a-MSH, favorise une synthèse préférentielle de phéomélanines au détriment des eumélanines. Des études « microarray » (puce à ADN) menées dans le laboratoire de V. J. Hearing, ont montré que des traitements par l'a-MSH ou l'ASP régulaient l'expression d'un grand nombre de gènes, dans une lignée mélanocytaire. Parmi ces gènes se trouvent de nombreux gènes de la pigmentation comme attendu. De manière intéressante Bace2 fait partie (avec la tyrosinase) des gènes dont l'expression est augmentée par le traitement avec l'a-MSH, alors qu'elle est diminuée par le traitement avec la ASP (Le Pape et al., 2009), confirmant l'implication de Bace2 dans l'eumélanogenèse.

#### 2.3. MITF, le facteur transcriptionnel clé de la pigmentation

L'un des gènes majeurs de la pigmentation régulés par l'  $\alpha$ -MSH est le gène codant pour le facteur transcriptionnel MITF (microphthalmia-associated transcription factor) qui contrôle l'expression de nombreux gènes de la pigmentation tels que la tyrosinase, TYRP1, MCR-1, PMEL (Zhuang et al., 2007). Des études utilisant la technique de « microarray » visant à caractériser de nouvelles cibles du facteur transcriptionnel MITF, ont montré que l'expression d'un très grand nombre de gènes était augmentée de manière significative par la surexpression de *Mitf* dans une lignée mélanocytaire. Parmi ces gènes, se trouve le gène *Bace2*. Il se pourrait donc que *Bace2* soit l'une des cibles du facteur MITF.

Même si des expériences plus poussées doivent être menées afin de vérifier ces observations, ces études ci-dessus confortent l'idée que *Bace2* soit un gène de la pigmentation. Dans ce cas, il est intéressant de se demander si cette enzyme ne pourrait pas avoir d'autres substrats impliqués dans la mélanogenèse tels que la tyrosinase et TYRP1. La tyrosinase et TYRP1 sont en effet clivées dans leur région juxta-membranaire. Même si la fonction de ces clivages est inconnue et les enzymes responsables restent à découvrir, les CTF résultant de ces clivages sont les substrats de la  $\gamma$ -sécrétase (N. Wang and Hebert, 2006), suggérant un processus de clivage similaire à celui clivage de PMEL.

#### Comment expliquer le phénotype d'hypopigmentation des souris Bace2-/-?

Mes expériences montrent que BACE2 est impliquée dans le clivage amyloïdogénique de PMEL. Ce clivage est indispensable à la libération du domaine luminal de PMEL, responsable de la formation du réseau fibrillaire caractéristique des mélanocytes. Différentes études sur des modèles animaux où *Pmel* est muté (souris *Silver*, poulet *Dominant White*) ou non-exprimé (souris *Pmel-/-*) ont permis de souligner l'importance du rôle de PMEL et de la régulation de sa fibrillogenèse dans la mélanogenèse (Hellstrom et al., 2011; Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011).

#### 2.4. Les souris KO PMEL

Chez les souris *Pmel-/-*, qui souffrent d'un défaut de pigmentation très modeste, les mélanosomes sont ronds dû à l'absence de fibres de PMEL mais la synthèse de la mélanine per se n'est pas altérée. Ce défaut de pigmentation est présenté comme étant la conséquence de la perte de l'intégrité des membranes mélanosomales qui serait due aux intermédiaires toxiques de la mélanine. En absence de PMEL, ces intermédiaires ne seraient plus séquestrés correctement à l'intérieur du mélanosome et seraient responsables d'attaques oxydatives perturbant l'intégrité des membranes (Hellstrom et al., 2011). De plus, il a été démontré que les fibres de PMEL accéléraient la cinétique de polymérisation de la mélanine à partir des intermédiaires DHI et DHICA qu'elles séquestrent (Chakraborty et al., 1996; Fowler et al., 2006; Lee et al., 1996). La cinétique de mélanisation est donc certainement affectée chez les souris *Pmel-/-*.

#### 2.5. La souris Silver et le poulet Dominant White

Chez la souris *Silver* et le poulet *Dominant White* les mutations affectant *Pmel* ne perturbent pas non plus la synthèse de la mélanine per se. Mais alors, pourquoi les défauts de pigmentation affectant ces deux modèles animaux sont plus sévères que ceux des souris *Pmel-/-*? Les mutations affectant *Pmel* chez la souris *Silver* et le poulet *Dominant White* sont des mutations à effet dominant négatif, elles sont donc associées à une perte de fonction de PMEL (Theos, Berson, et al., 2006; Watt et al., 2011). Les défauts de pigmentation présentés par ces deux modèles animaux pourraient résulter d'une combinaison entre la toxicité des intermédiaires de la mélanine (accompagnée d'une diminution de la cinétique de synthèse de la mélanine) et celle associée à la formation d'oligomères toxiques non fonctionnels de PMEL dans les mélanosomes.

#### 2.5.1. La souris Silver

Chez la souris *Silver*, le trafic de PMEL est fortement perturbé (absence de signaux de sortie du RE et d'internalisation via AP-2) : elle se retrouve majoritairement associée à la membrane du RE et à la membrane plasmique. Seule une faible portion de PMEL arrive à atteindre les mélanosomes. Cette rétention de PMEL dans le RE et à la membrane plasmique affecte la maturation protéolytique de PMEL, la cinétique de formation des fibres, ainsi que la concentration de PMEL dans les mélanosomes (pré-oligomérisation). En conséquence, la morphologie des mélanosomes est fortement altérée (anormalement gros et ronds) (Theos, Berson, et al., 2006). Ce phénotype est associé à une réduction de la viabilité des mélanocytes. Cela suggère qu'une cinétique lente de formation de fibres amyloïdes ainsi qu'une absence de pré-oligomérisation de PMEL pourraient induire une production d'oligomères toxiques au dépend de fibres amyloïdes correctement organisées.

#### 2.5.2. Le poulet Dominant White

Chez le poulet *Dominant White*, les mutations affectant PMEL se situent au niveau de son domaine transmembranaire et perturbent sa pré-oligomérisation ainsi que son association aux membranes. Dans cette situation, ce n'est ni le trafic, ni la maturation, ni le clivage de PMEL qui sont affectés, mais sa structuration finale en fibres amyloïdes organisées (feuillets parallèles). Le défaut sévère de pigmentation est associé à la formation d'agrégats amyloïdes qui s'accumulent dans les mélanosomes, ainsi qu'à la perte de l'intégrité membranaire des mélanosomes et à la réduction de la viabilité des mélanocytes. La pré-oligomérisation de PMEL, c'est à dire le regroupement de protéines de PMEL non clivées au niveau des

mélanosomes, serait une étape indispensable à une bonne formation de fibres amyloïdes (Watt et al., 2011).

#### 2.6. Les souris Bace2-/-

Les études menées sur la souris Silver et le poulet Dominant White prouvent que des mutations affectant la fonction de PMEL aboutissent à des phénotypes plus sévères à cause de plusieurs facteurs : la toxicité potentielle associée à la nature amyloïde de cette protéine, une diminution de la cinétique de mélanisation et une mauvaise séquestration des intermédiaires toxiques de la mélanine. Il est intéressant de constater que le phénotype associé à la suppression de *Bace2* chez les souris est comparable à un phénotype à effet dominant négatif de PMEL. Les souris Bace2-/- ont un pelage gris comme les souris Silver et leur mélanosomes forment des agrégats anormaux de manière similaire à ceux du poulet Dominant White. On peut donc supposer que dans le cas des souris Bace2-/- l'hypopigmentation observée serait associé à la fois à la cytotoxicité des intermédiaires de la mélanine (comme pour la souris Pmel-/-) et à celle d'agrégats-oligomères toxiques de PMEL (comme pour la souris Silver et le poulet Dominant White). Parallèlement à leur toxicité, on peut également supposer que la formation de ces agrégats, qui affectent la morphologie des mélanosomes (ronds au lieu d'allongés), ait aussi un impact sur le transfert des mélanosomes du mélanocyte au kératinocyte. En accord avec cela, l'étude sur BACE2 menée chez le Zebra fish montre que la perte de l'activité de BACE2 affecte à fois la morphologie des mélanocytes et leur migration (van Bebber et al., 2013). Chez la souris, il a été décrit que le transfert des mélanosomes est dépendant de leur motilité (Bahadoran et al., 2003; Wilson et al., 2000). Ainsi une morphologie non conforme des mélanosomes pourrait rendre leur transfert aux kératinocytes moins efficace à cause de problèmes de motilité. Même si il est tentant de proposer que le phénotype observé chez les souris Bace2-/- n'est dû qu'à la perte du clivage de PMEL, on ne peut pas exclure que BACE2 clive d'autres protéines, notamment des protéines impliquées dans la mélanogenèse. En effet, les souris Silver, qui présentent un défaut de pigmentation bien visible, sont également affectées par la mutation hétérozygote Brown (fond génétique Tyrp1b/+) (Theos, Berson, et al., 2006). La dilution du pelage implique donc, dans une certaine mesure, le gène codant l'enzyme de la pigmentation TYRP1. Des études menées chez les souris Pmel-/- sur différents fonds génétiques montrent également que la mutation homozygote Brown (Tyrp1b/b), en association avec la perte d'expression de Pmel (Pmel-/-), affecte la pigmentation plus sévèrement (Hellstrom et al., 2011). Il est possible que BACE2 soit impliqué dans une certaine mesure dans le clivage de l'enzyme TYRP1. Il faudrait dans

un premier temps vérifier par western blot que la déplétion de BACE2 ou sa surexpression aient un effet sur la formation du CTF de TYRP1. BACE2 pourrait également cliver une protéine impliquée dans la motilité des mélanosomes. Des travaux, controversés, ont identifiée l'APP comme étant une protéine interagissant avec le moteur la Kinésine-1 (Kamal et al., 2000). En connaissant le rôle de la kinésine dans le transport antérograde des mélanosomes du centre du mélanocyte aux dendrites (Hara et al., 2000), il serait tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'APP pourrait être impliquée dans le transport des mélanosomes via son interaction avec la kinesine. Au final, BACE2 en clivant l'APP régulerait l'interaction APP-kinésine. Mes travaux préliminaires sur le rôle de l'APP suggèrent effectivement un rôle de cette protéine sur la motilité des mélanosomes matures et pourraient servir de bases à une future étude.

# 2.7. Polymorphisme de Pmel chez l'homme et pigmentation

Récemment, une étude a identifié un polymorphisme du gène de PMEL (région promotrice) associé à la pathologie du vitiligo chez un population chinoise (Tang et al., 2013). Le vitiligo est une pathologie affectant la pigmentation qui se traduit par l'apparition de taches blanches sur la peau des patients (ces zones dépigmentées sont associées à une perte de la viabilité des mélanocytes). Cette pathologie reste encore peu caractérisée et il semblerait que la mort des mélanocytes dans les zones touchées soit due à des évènements de stress oxydatif. Cette étude supporte l'idée d'un rôle de PMEL dans la protection du mélanocyte contre des attaques oxydatives provenant des intermédiaires hautement réactifs de la mélanine. En effet, PMEL pourrait servir à la capture des radicaux libres qui se formeraient sous l'action des UV à partir de ces intermédiaires de la mélanine (Kvam and Tyrrell, 1999; Wenczl et al., 1998).

# 3. BACE1, réticulum endoplasmique et pigmentation

BACE1 existe sous différentes isoformes, notamment BACE1A, BACE1B et BACE1C (Ehehalt et al., 2002; Holsinger et al., 2013). La majorité des études menées sur BACE1 porte sur l'isoforme la plus longue, BACE1A et traite du rôle de cette isoforme dans le clivage de l'APP (De Strooper et al., 2010). Les autres isoformes, BACE1B et C (provenant de l'épissage alternatif de *Bace1*) sont plus courtes que BACE1A et ont été beaucoup moins étudiées (Ehehalt et al., 2002; Holsinger et al., 2013). Même si quelques études se contredisent sur le potentiel enzymatique de ces isoformes, il semblerait qu'elles n'aient pas (ou très peu) d'activité enzymatique et qu'elle ne soient pas impliquées dans la production du

peptide Aβ dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. En effet, ces isoformes plus courtes se localisent dans un compartiment cellulaire particulier, le Réticulum Endoplasmique (Ehehalt et al., 2002; Holsinger et al., 2013). Mes études préliminaires sur BACE1 indiquent : premièrement, que la déplétion de BACE1 (siRNA) n'affecte pas le clivage de PMEL mais diminue la formation des fibres ; deuxièmement et en accord avec ces résultats, que l'absence de Bace1 *in vivo* altère la morphologie des mélanosomes au niveau de l'EPR ; troisièmement, que l'isoforme BACE1B est l'isoforme majoritaire dans les MNT1 ; et finalement, que BACE1B se localise au niveau de contacts RE-mélanosomes via son interaction avec une protéine résidente du RE nommée VAP-A. Pour compléter ces travaux, nous projetons d'utiliser des siRNA spécifiques des différentes isoformes de BACE1, pour démontrer que la déplétion spécifique de BACE1B est suffisante pour reproduire le phénotype obtenu à partir d'un siRNA non spécifique (siBACE1#1). Nous projetons également de tester le rôle de BACE1 au niveau des contacts RE-mélanosomes (notamment dans le transfert de lipides).

#### 3.1. BACE1 interagit avec des protéines du RE

Dans les HeLa, mes résultats montrent que BACE1B interagit avec la protéine VAP-A. Ce n'est pas la première fois qu'une interaction entre une isoforme de BACE1 et une protéine du RE est décrite. D'autres études par des groupes différents ont montré que BACE1A interagissait directement avec la protéine du RE RTN3 (Reticulon 3), dans les neurones. Plus précisément, c'est le domaine C-ter de BACE1A qui interagit avec le domaine C-ter de la protéine RTN3 (Deng et al., 2013; He et al., 2006; He et al., 2007). Le domaine C-ter de BACE1 est important pour les interactions protéines-protéines et est conservé entre les trois isoformes BACE1A, B et C (Ehehalt et al., 2002). Dans les neurones, RTN3 serait important pour la régulation du trafic de BACE1A et la production du peptide AB. Le simple fait de surexprimer RTN3 dans des neurones affecte le transport axonal de BACE1A (sûrement en la retenant dans le RE) ce qui a pour conséquence de diminuer la production du peptide Aß (Deng et al., 2013). Dans le cas des mélanocytes, BACE1B pourrait interagir avec VAP dans le RE, directement ou indirectement, via son domaine C-ter. En accord avec cette hypothèse, mon expérience d'immunoprécipitation (co-IP) montre que les trois isoformes de BACE1 sont capable d'intéragir avec VAP-A lorsqu'elles sont surexprimées dans les HeLa. Nous souhaitons utiliser une forme tronquée de BACE1 (dépourvue de domaine C-ter) afin de confirmer l'importance de ce domaine dans l'interaction BACE1-VAP-A. De plus, si les résultats sont positifs, nous projetons de réaliser une expérience de GST-pulldown dans le but de montrer une interaction directe entre ces deux protéines. Il est également prévu de répéter et de confirmer ces expériences d'IP faites dans les HeLa, dans les MNT1.

#### 3.2. Maturation des mélanosomes/ endosomes et lipides

Comment l'interaction BACE1B-VAP-A dans le RE pourrait réguler la maturation des mélanosomes ? Quels protéines et facteurs pourraient être impliqués ? VAP est impliquée dans la formation de contacts RE-endosomes via son interaction avec des protéines des endosomes tardifs tels que ORP1L, STARD3 et STARD3NL qui sont des transporteurs du cholestérol intracellulaire (Alpy et al., 2013; Rocha et al., 2009). Les interactions VAP-ORP1L et VAP- STARD3/ STARD3NL sont donc sûrement impliquées dans le transfert de lipides au niveau des contacts formés entre RE et endosomes. Rab7 et son effecteur RILP, qui interagissent avec ORP1L (Jordens et al., 2006), ainsi que STARD3 et STARD3NL sont exprimées dans les MNT1, et se localisent au niveau des mélanosomes (résultats préliminaires non montrés pour STARD3 et STARD3NL).

Mes résultats dans les HeLa ont montré que BACE1B co-localisait partiellement avec un mutant ORP1L (ΔORD) au niveau des endosomes tardifs. En complément de ces résultats, j'étudierai la localisation de BACE1B et VAP-A, par rapport à ORP1L et STARD3/ STARD3NL dans les MNT1. Il est tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle BACE1B dans le RE en complexe avec VAP régulerait le transfert de lipides entre RE et mélanosomes via une interaction avec les protéines ORP1L et/ou STARD3/ STARD3NL. Différentes publications ont déjà établi l'importance du rôle des lipides dans la biogenèse des mélanosomes (phosphoinositides PI3,5P2) et leur maturation (glycosphingolipides) (Chow et al., 2007; Groux-Degroote et al., 2008; Sprong et al., 2001). De plus, des études en cours dans notre laboratoire mettent en évidence le rôle du cholestérol dans la formation des fibres amyloïdes de PMEL au cours de la prémélanogenèse. De manière intéressante, des études ont montré que la déplétion de BACE1 dans une lignée humaine de cellules de l'EPR (ARPE19) augmentait le pH lysosomal et diminuait l'activité de l'enzyme cathepsine D (Cai et al., 2012). Cette étude ainsi que mes données préliminaires sont en faveur d'un rôle de BACE1 dans la maturation et l'homéostasie des compartiments endo-lysosomaux. Pour confirmer l'hypothèse du rôle de BACE1B au niveau des contacts RE-mélanosomes/endosomes, nous projetons d'étudier la localisation et le transfert du cholestérol entre ces compartiments en utilisant des marqueurs spécifiques, lorsque BACE1B est soit surexprimée soit déplétée (siRNA). A plus long, terme il sera important de caractériser les possibles interactants de BACE1B qui pourrait être impliqués dans l'homéostasie de lipides au niveau du RE et des endosomes, par des études en spectrométrie de masse.

# 4. BACE2 et PMEL, un modèle d'étude pour le clivage de l'APP par BACE1

Mes études renforcent les analogies déjà établies entre la formation des fibres amyloïdes physiologiques de PMEL et celles formées à partir de la protéine APP au cours de la pathologie d'Alzheimer (Figure 39). A long terme, l'analogie de clivage entre PMEL et APP pourrait servir de modèle pour l'étude de la pathologie d'Alzheimer. La caractérisation de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la régulation de la fibrillogenèse de PMEL permettrait de mieux comprendre les évènements qui aboutissent à la formation des oligomères toxiques d'Aß dans les neurones. En effet, divers systèmes sont mis en place dans le mélanocyte pour réguler la fibrillogenèse de PMEL afin d'éviter toute cytotoxicité liée à la nature amyloïde de cette protéine. Il est possible que dans le cas de la pathologie d'Alzheimer la formation des fibres à partir des peptides Aβ ne soit pas aussi rapide et aussi bien régulée que celle des fibres de PMEL, et que ces différences aboutissent à l'accumulation d'oligomères toxiques. Les études menées sur PMEL, ont mis en évidence des systèmes de contrôle de la fibrillogenèse de PMEL, tels que la cinétique rapide de formation des fibres ou la nucléation de ces fibres sur les ILV des mélanosomes de stade I, qui permettraient d'éviter la formation et l'accumulation d'agrégats toxiques de PMEL (Fowler et al., 2006; Hurbain et al., 2008; Watt et al., 2009). Autre point intéressant, les mélanocytes ont déjà été proposés comme étant un bon système d'étude alternatif aux neurones. En effet, comme les neurones, les mélanocytes dérivent des crêtes neurales et ces deux types cellulaires partagent de nombreux points communs (protéines, récepteurs, voie de signalisation, etc) (Yaar and Park, 2012). Par exemple, l'APP est fortement exprimée dans les mélanocytes et une étude a montré que le fragment APPsa était produit par les mélanocytes (Quast et al., 2003). Une autre étude a montré que le peptide A\beta1-40 était également produit dans les mélanocytes et que l'ajout d'oligomères d'A<sup>β1-40</sup> dans le milieu extracellulaire affectait la viabilité des mélanocytes en culture (Papageorgiou et al., 2008). Les mélanocytes pourraient donc servir de système d'étude alternatif pour les maladies neurodégénératives.

# 5. Les drogues pour traiter la Maladie d'Alzheimer

Mes études sur BACE1 et BACE2 pourraient à long terme avoir un impact sur deux pathologies qui représentent aujourd'hui des enjeux majeurs de santé publique : la maladie d'Alzheimer et les cancers de la peau. Aujourd'hui le développement de drogues inhibitrices dirigées contre BACE1, l'enzyme impliquée dans le clivage amyloïdogénique de l'APP, représente un grand espoir pour le traitement de la pathologie d'Alzheimer. Cependant, des études menées par différents laboratoires ainsi que les miennes, confirment que le développement de ces drogues représente un véritable challenge. En effet, de plus en plus de substrats et de fonction physiologiques sont attribués à BACE2 et BACE1 (Cai et al., 2012; Esterhazy et al., 2011; Stutzer et al., 2013; Yan and Vassar, 2014). La question d'éventuels effets secondaires se pose alors. BACE2 est impliquée dans le clivage de PMEL et mes études préliminaires sont également en faveur d'un rôle de BACE1 dans la mélanogenèse. On peut donc supposer qu'un traitement avec une drogue inhibitrice des β-sécrétases pourrait avoir un impacte sur la pigmentation et à long terme pourrait aboutir à une susceptibilité accrue au développement de mélanomes. Les doses thérapeutiques et le mode d'administration de ces drogues inhibitrices dans le traitement la maladie d'Alzheimer seront des éléments déterminants dans le contrôle de possibles effets secondaires liés à la perte d'activité de BACE1 et BACE2.



Figure 39 : Modèle comparatif PMEL/APP.

(1) Après sa synthèse dans le RE, la protéine APP transite dans l'appareil de Golgi pour être adressée à la membrane plasmique. A partir de la membrane plasmique elle est endocytée et se retrouve dans la lumière des endosomes de tri, à partir desquels elle peut être ré-adressée à la membrane plasmique (voie de recyclage) ou au TGN (voie rétrograde). Dans les endosomes de tri, APP serait clivée par BACE1 pour libérer le fragment CTF $\beta$ , qui serait lui-même clivé par la  $\gamma$ -sécrétase au cours de la maturation de l'endosome de tri en CMV. Ce dernier clivage permettrait aussi de libérer le peptide Aß dans la lumière du CMV, qui se retrouverait dans le milieu extracellulaire (par un mécanisme encore inconnu) pour former les fibres amyloïdes retrouvées dans la maladie d'Alzheimer. (2) De manière très similaire la protéine PMEL est synthétisée dans le RE et transite par le TGN et la membrane plasmique avant d'être endocytée. Dans le mélanosome de stade I (correspondant à un endosome de tri), PMEL est clivée par BACE2, l'homologue de BACE1, pour libérer la domaine amyloïdogénique de PMEL. Ce domaine s'associe ensuite en fibres (qui s'organisent ensuite en feuillets) à partir d'ILV pour permettre la maturation du mélanosome de stade I en stade II. Le clivage par BACE2 libère un fragment CTF qui est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase dans des CMV conventionnels. La maturation correcte du mélanosome de stade I en stade II serait dépendante de la formation de contacts étroits entre le RE et le mélanosome de stade I. ces contacts seraient eux-mêmes régulés par l'isoforme BACE1B, résidente du RE.

# 6. Conclusions

Les mélanosomes représentent un bon système d'étude de la voie endosomale. La caractérisation de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la biogénèse des mélanosomes ouvre de nombreuses perspectives pour une meilleure compréhension de l'organisation et l'adaptation de la voie d'endocytose dans les cellules spécialisées. J'ai pu au cours de ma thèse caractériser deux événements importants impliqués dans la maturation des mélanosomes et la formation des fibres dérivées de la protéine PMEL. Mon travail de thèse a permis de caractériser le rôle des ß-sécrétases dans la prémélanogenèse en identifiant Bace2 comme étant un gène de la pigmentation et Bace1B comme étant impliqué dans l'homéostasie des endosomes. Ce travail a donc permis d'attribuer de nouveaux rôles physiologiques à BACE1 et BACE2. En montrant que BACE2 était impliquée dans le clivage de PMEL, mon travail a également mis l'accent sur le concept émergeant des fibres amyloïdes physiologiques, et a renforcé les analogies déjà établies entre la formation de ces fibres fonctionnelles et celle des fibres pathologiques. BACE2 représente maintenant un nouvel outil d'étude de la formation des fibres de PMEL qui elles-mêmes pourront servir de modèle physiologique pour une meilleure compréhension de la formation des fibres amyloïdes d'Aß associées à la maladie d'Alzheimer. Mon travail sur BACE1 dans le contexte de la mélanogenèse a pu mettre en lumière un possible rôle de l'isoforme BACE1B dans l'échange de lipides au niveau de contacts RE-endosomes. A long terme mon travail sur BACE1 permettra de mieux caractériser certains mécanismes ubiquitaires impliqués à la fois dans la maturation des endosomes et des mélanosomes.

# **REFERENCES**

# REFERENCES

Abdul-Hay, S. O., Sahara, T., McBride, M., Kang, D., & Leissring, M. A. (2012). Identification of BACE2 as an avid ss-amyloid-degrading protease. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Molecular neurodegeneration*, *7*, 46.

Alfandari, D., McCusker, C., & Cousin, H. (2009). ADAM function in embryogenesis. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Seminars in cell & developmental biology, 20*(2), 153-163.

Almeida, C. G., Takahashi, R. H., & Gouras, G. K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. J *Neurosci, 26*(16), 4277-4288.

Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., et al. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J Cell Sci*, *126*(Pt 23), 5500-5512.

Anderson, R. G., Falck, J. R., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1984). Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(15), 4838-4842.

Anikster, Y., Huizing, M., Anderson, P. D., Fitzpatrick, D. L., Klar, A., Gross-Kieselstein, E., et al. (2002). Evidence that Griscelli syndrome with neurological involvement is caused by mutations in RAB27A, not MYO5A. *Am J Hum Genet*, *71*(2), 407-414.

Bahadoran, P., Busca, R., Chiaverini, C., Westbroek, W., Lambert, J., Bille, K., et al. (2003). Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J Biol Chem*, *278*(13), 11386-11392.

Basi, G., Frigon, N., Barbour, R., Doan, T., Gordon, G., McConlogue, L., et al. (2003). Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem*, *278*(34), 31512-31520.

Basrur, V., Yang, F., Kushimoto, T., Higashimoto, Y., Yasumoto, K., Valencia, J., et al. (2003). Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res*, *2*(1), 69-79.

Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M., et al. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry*, *275*(27), 20647-20651.

Bennett, D. C., & Lamoreux, M. L. (2003). The color loci of mice--a genetic century. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society, 16(4), 333-344.
Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., & Marks, M. S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell*, *12*(11), 3451-3464.

Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., & Marks, M. S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol, 161*(3), 521-533.

Blagoveshchenskaya, A. D., Hewitt, E. W., & Cutler, D. F. (1999). Di-leucine signals mediate targeting of tyrosinase and synaptotagmin to synaptic-like microvesicles within PC12 cells. *Mol Biol Cell*, *10*(11), 3979-3990.

Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., & Chapman, M. R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol*, 20(2), 66-73.

Boissy, R. E., Moellmann, G. E., & Halaban, R. (1987). Tyrosinase and acid phosphatase activities in melanocytes from avian albinos. *J Invest Dermatol*, 88(3), 292-300.

Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2008). Retromer. Curr Opin Cell Biol, 20(4), 427-436.

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

Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84(3), 539-549.

Brilliant, M., & Gardner, J. (2001). Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J Invest Dermatol*, 117(2), 386-387.

Brunberg, E., Andersson, L., Cothran, G., Sandberg, K., Mikko, S., & Lindgren, G. (2006). A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet*, *7*, 46.

Cai, J., Qi, X., Kociok, N., Skosyrski, S., Emilio, A., Ruan, Q., et al. (2012). beta-Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *EMBO molecular medicine*, *4*(9), 980-991.

Calvo, P. A., Frank, D. W., Bieler, B. M., Berson, J. F., & Marks, M. S. (1999). A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J Biol Chem*, 274(18), 12780-12789.

Carey, R. M., Balcz, B. A., Lopez-Coviella, I., & Slack, B. E. (2005). Inhibition of dynamindependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol*, *6*, 30.

Chakraborty, A. K., Platt, J. T., Kim, K. K., Kwon, B. S., Bennett, D. C., & Pawelek, J. M. (1996). Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the pmel 17/silver locus protein. *Eur J Biochem*, 236(1), 180-188.

Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., et al. (2002). Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, *295*(5556), 851-855.

Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P. E., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J*, 420(2), 133-154.

Cheon, M. S., Dierssen, M., Kim, S. H., & Lubec, G. (2008). Protein expression of BACE1, BACE2 and APP in Down syndrome brains. *Amino Acids*, *35*(2), 339-343.

Chi, A., Valencia, J. C., Hu, Z. Z., Watabe, H., Yamaguchi, H., Mangini, N. J., et al. (2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res*, *5*(11), 3135-3144.

Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 75, 333-366.

Chow, C. Y., Zhang, Y., Dowling, J. J., Jin, N., Adamska, M., Shiga, K., et al. (2007). Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Nature, 448*(7149), 68-72.

Clark, L. A., Wahl, J. M., Rees, C. A., & Murphy, K. E. (2006). Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(5), 1376-1381.

Cortese, K., Giordano, F., Surace, E. M., Venturi, C., Ballabio, A., Tacchetti, C., et al. (2005). The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(12), 4358-4364.

Costin, G. E., Valencia, J. C., Vieira, W. D., Lamoreux, M. L., & Hearing, V. J. (2003). Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci, 116*(Pt 15), 3203-3212.

Daniele, T., Hurbain, I., Vago, R., Casari, G., Raposo, G., Tacchetti, C., et al. (2014). Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Curr Biol*, 24(4), 393-403.

De Strooper, B., Vassar, R., & Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nature reviews. Neurology, 6*(2), 99-107.

Delevoye, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J. B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., et al. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol*, *187*(2), 247-264.

Delevoye, C., Miserey-Lenkei, S., Montagnac, G., Gilles-Marsens, F., Paul-Gilloteaux, P., Giordano, F., et al. (2014). Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin motor KIF13A. *Cell Rep, 6*(3), 445-454.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., Caplan, S., & Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB J*, 14(10), 1265-1278.

Deng, M., He, W., Tan, Y., Han, H., Hu, X., Xia, K., et al. (2013). Increased expression of reticulon 3 in neurons leads to reduced axonal transport of beta site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of biological chemistry, 288*(42), 30236-30245.

Devi, C. C., Tripathi, R. K., & Ramaiah, A. (1987). pH-dependent interconvertible allosteric forms of murine melanoma tyrosinase. Physiological implications. *Eur J Biochem*, *166*(3), 705-711.

Diment, S., Eidelman, M., Rodriguez, G. M., & Orlow, S. J. (1995). Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem*, 270(9), 4213-4215.

Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., et al. (2005). Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem*, *280*(35), 30797-30806.

Donatien, P. D., & Orlow, S. J. (1995). Interaction of melanosomal proteins with melanin. *Eur J Biochem, 232*(1), 159-164.

Ehehalt, R., Michel, B., De Pietri Tonelli, D., Zacchetti, D., Simons, K., & Keller, P. (2002). Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(1), 30-37.

Esclamado, R. M., Gown, A. M., & Vogel, A. M. (1986). Unique proteins defined by monoclonal antibodies specific for human melanoma. Some potential clinical applications. *Am J Surg*, *152*(4), 376-385.

Esterhazy, D., Stutzer, I., Wang, H., Rechsteiner, M. P., Beauchamp, J., Dobeli, H., et al. (2011). Bace2 is a beta cell-enriched protease that regulates pancreatic beta cell function and mass. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell metabolism*, *14*(3), 365-377.

Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., & Choe, H. (2000). BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9712-9717.

Fitzpatrick, T. B. (1986). Ultraviolet-induced pigmentary changes: benefits and hazards. *Curr Probl Dermatol*, *15*, 25-38.

Fitzpatrick, T. B., & Breathnach, A. S. (1963). [the Epidermal Melanin Unit System]. *Dermatol Wochenschr, 147*, 481-489.

Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., et al. (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci*, *32*(4), 1467-1480.

Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M. M., et al. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of neurochemistry*, *81*(5), 1011-1020.

Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol*, *4*(1), e6.

Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*, *32*(5), 217-224.

Friedman, J. R., Dibenedetto, J. R., West, M., Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2013). Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol Biol Cell*, *24*(7), 1030-1040.

Fukuda, M., Kuroda, T. S., & Mikoshiba, K. (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem*, *277*(14), 12432-12436.

Furumura, M., Sakai, C., Potterf, S. B., Vieira, W. D., Barsh, G. S., & Hearing, V. J. (1998). Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(13), 7374-7378.

Futter, C. E. (2006). The molecular regulation of organelle transport in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Res, 19*(2), 104-111.

Futter, C. E., Ramalho, J. S., Jaissle, G. B., Seeliger, M. W., & Seabra, M. C. (2004). The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells. *Mol Biol Cell*, *15*(5), 2264-2275.

Giordano, F., Bonetti, C., Surace, E. M., Marigo, V., & Raposo, G. (2009). The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum Mol Genet, 18*(23), 4530-4545.

Giordano, F., Simoes, S., & Raposo, G. (2011). The ocular albinism type 1 (OA1) GPCR is ubiquitinated and its traffic requires endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) function. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(29), 11906-11911.

Gould, G. W., & Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(4), 287-292.

Gouras, G. K., Willen, K., & Faideau, M. (2014). The inside-out amyloid hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases, 13(2-3),* 142-146.

Gown, A. M., Vogel, A. M., Hoak, D., Gough, F., & McNutt, M. A. (1986). Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol, 123*(2), 195-203.

Grateau, G., Verine, J., Delpech, M., & Ries, M. (2005). [Amyloidosis: a model of misfolded protein disorder]. *Med Sci (Paris)*, 21(6-7), 627-633.

Greenwald, J., & Riek, R. (2010). Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, *18*(10), 1244-1260.

Groux-Degroote, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., Neumann, S., Theos, A. C., De Maziere, A. M., et al. (2008). Glycolipid-dependent sorting of melanosomal from lysosomal membrane proteins by lumenal determinants. *Traffic*, *9*(6), 951-963.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(10), 721-730.

Hammer, N. D., Wang, X., McGuffie, B. A., & Chapman, M. R. (2008). Amyloids: friend or foe? *J Alzheimers Dis*, 13(4), 407-419.

Hara, M., Yaar, M., Byers, H. R., Goukassian, D., Fine, R. E., Gonsalves, J., et al. (2000). Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol*, 114(3), 438-443.

Harper, D. C., Theos, A. C., Herman, K. E., Tenza, D., Raposo, G., & Marks, M. S. (2008). Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only golgi-processed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. *J Biol Chem*, *283*(4), 2307-2322.

He, W., Hu, X., Shi, Q., Zhou, X., Lu, Y., Fisher, C., et al. (2006). Mapping of interaction domains mediating binding between BACE1 and RTN/Nogo proteins. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Journal of molecular biology, 363*(3), 625-634.

He, W., Shi, Q., Hu, X., & Yan, R. (2007). The membrane topology of RTN3 and its effect on binding of RTN3 to BACE1. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of biological chemistry, 282*(40), 29144-29151.

He, X., Li, F., Chang, W. P., & Tang, J. (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem, 280*(12), 11696-11703.

Hearing, V. J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci*, *37*(1), 3-14.

Hellstrom, A. R., Watt, B., Fard, S. S., Tenza, D., Mannstrom, P., Narfstrom, K., et al. (2011). Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS genetics*, 7(9), e1002285.

Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., & Selkoe, D. J. (2009). Identification of betasecretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One*, 4(12), e8477.

Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., et al. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(21), 11872-11877.

Hirosaki, K., Yamashita, T., Wada, I., Jin, H. Y., & Jimbow, K. (2002). Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. *J Invest Dermatol*, *119*(2), 475-480.

Hoashi, T., Muller, J., Vieira, W. D., Rouzaud, F., Kikuchi, K., Tamaki, K., et al. (2006). The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *J Biol Chem*, *281*(30), 21198-21208.

Hoashi, T., Tamaki, K., & Hearing, V. J. (2010). The secreted form of a melanocyte membrane-bound glycoprotein (Pmel17/gp100) is released by ectodomain shedding. [Research Support, N.I.H., Intramural]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(3), 916-930.

Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W. D., & Hearing, V. J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem*, 280(14), 14006-14016.

Holsinger, R. M., Goense, N., Bohorquez, J., & Strappe, P. (2013). Splice variants of the Alzheimer's disease beta-secretase, BACE1. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Neurogenetics, 14*(1), 1-9.

Honing, S., Sandoval, I. V., & von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J*, 17(5), 1304-1314.

Huizing, M., Helip-Wooley, A., Westbroek, W., Gunay-Aygun, M., & Gahl, W. A. (2008). Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *9*, 359-386.

Hurbain, I., Geerts, W. J., Boudier, T., Marco, S., Verkleij, A. J., Marks, M. S., et al. (2008). Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(50), 19726-19731.

Hurley, J. H., & Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nature reviews. Molecular cell biology, 11*(8), 556-566.

Hussain, I., Christie, G., Schneider, K., Moore, S., & Dingwall, C. (2001). Prodomain processing of Asp1 (BACE2) is autocatalytic. *The Journal of biological chemistry*, 276(26), 23322-23328.

Hussain, I., Hawkins, J., Shikotra, A., Riddell, D. R., Faller, A., & Dingwall, C. (2003). Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor proteincleaving enzyme 1 (BACE1). *J Biol Chem*, 278(38), 36264-36268.

Hussain, I., Powell, D. J., Howlett, D. R., Chapman, G. A., Gilmour, L., Murdock, P. R., et al. (2000). ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Molecular and cellular neurosciences*, *16*(5), 609-619.

Iconomidou, V. A., Vriend, G., & Hamodrakas, S. J. (2000). Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. *FEBS Lett, 479*(3), 141-145.

Innamorati, G., Piccirillo, R., Bagnato, P., Palmisano, I., & Schiaffino, M. V. (2006). The melanosomal/lysosomal protein OA1 has properties of a G protein-coupled receptor. Pigment Cell Res, 19(2), 125-135.

Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. Photochem Photobiol, 84(3), 582-592.

Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. Ann N Y Acad Sci, 695, 144-148.

Johannes, L., & Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. Cell, 135(7), 1175-1187.

Jordens, I., Westbroek, W., Marsman, M., Rocha, N., Mommaas, M., Huizing, M., et al. (2006). Rab7 and Rab27a control two motor protein activities involved in melanosomal transport. Pigment Cell Res, 19(5), 412-423.

Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol*, 25(1), 99-112.

Kadekaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., & Abdel-Malek, Z. A. (2003). Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? Pigment Cell Res, 16(5), 434-447.

Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., & Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. Neuron, 28(2), 449-459.

Kang, E. L., Biscaro, B., Piazza, F., & Tesco, G. (2012). BACE1 protein endocytosis and trafficking are differentially regulated by ubiquitination at lysine 501 and the Di-leucine motif in the carboxyl terminus. [Research Support, N.I.H., Extramural]. The Journal of biological chemistry, 287(51), 42867-42880.

Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., et al. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science, 300(5618), 486-489.

Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., et al. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J Biol Chem, 279(45), 46363-46366.

Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2003). Amyloid as a natural product. J Cell Biol, 161(3), 461-462.

Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J., & Vollrath, F. (2002). Amyloidogenic nature of spider silk. Eur J Biochem, 269(16), 4159-4163.

Kerje, S., Sharma, P., Gunnarsson, U., Kim, H., Bagchi, S., Fredriksson, R., et al. (2004). The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene. Genetics, 168(3), 1507-1518.

Klein, W. L., Krafft, G. A., & Finch, C. E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*, 24(4), 219-224.

Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., et al. (1994). Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *Embo J*, *13*(24), 5818-5825.

Koh, Y. H., von Arnim, C. A., Hyman, B. T., Tanzi, R. E., & Tesco, G. (2005). BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem*, 280(37), 32499-32504.

Koo, E. H., & Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid betaprotein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, *269*(26), 17386-17389.

Korner, A., & Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217(4565), 1163-1165.

Korytowski, W., Kalyanaraman, B., Menon, I. A., Sarna, T., & Sealy, R. C. (1986). Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim Biophys Acta*, 882(2), 145-153.

Kummer, M. P., Maruyama, H., Huelsmann, C., Baches, S., Weggen, S., & Koo, E. H. (2009). Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase. *J Biol Chem*, 284(4), 2296-2306.

Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W. D., Ferrans, V. J., et al. (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(19), 10698-10703.

Kvam, E., & Tyrrell, R. M. (1997). Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*, *18*(12), 2379-2384.

Kvam, E., & Tyrrell, R. M. (1999). The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol*, *113*(2), 209-213.

Le Pape, E., Passeron, T., Giubellino, A., Valencia, J. C., Wolber, R., & Hearing, V. J. (2009). Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the Mc1r. [Research Support, N.I.H., Intramural]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1802-1807.

Lee, Z. H., Hou, L., Moellmann, G., Kuklinska, E., Antol, K., Fraser, M., et al. (1996). Characterization and subcellular localization of human Pmel 17/silver, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6,-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J Invest Dermatol, 106*(4), 605-610.

Leonhardt, R. M., Vigneron, N., Hee, J. S., Graham, M., & Cresswell, P. (2013). Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils. *Molecular biology of the cell*.

Leonhardt, R. M., Vigneron, N., Rahner, C., & Cresswell, P. (2011). Proprotein convertases process Pmel17 during secretion. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. The Journal of biological chemistry, 286(11), 9321-9337.

Leonhardt, R. M., Vigneron, N., Rahner, C., Van den Eynde, B. J., & Cresswell, P. (2010). Endoplasmic reticulum export, subcellular distribution, and fibril formation by Pmel17 require an intact N-terminal domain junction. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of biological chemistry*, *285*(21), 16166-16183.

Lerner, A. B. (1949). On the metabolism of phenylalanine and tyrosine. *J Biol Chem, 181*(1), 281-294.

Lopes, V. S., Ramalho, J. S., Owen, D. M., Karl, M. O., Strauss, O., Futter, C. E., et al. (2007). The ternary Rab27a-Myrip-Myosin VIIa complex regulates melanosome motility in the retinal pigment epithelium. *Traffic*, *8*(5), 486-499.

Lopes, V. S., Wasmeier, C., Seabra, M. C., & Futter, C. E. (2007). Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. *Mol Biol Cell*, *18*(10), 3914-3927.

Lopez, V. M., Decatur, C. L., Stamer, W. D., Lynch, R. M., & McKay, B. S. (2008). L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol*, *6*(9), e236.

Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y., & Dmitriev, O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev*, 87(3), 1011-1046.

Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., et al. (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*, *325*(5938), 328-332.

Manga, P., Boissy, R. E., Pifko-Hirst, S., Zhou, B. K., & Orlow, S. J. (2001). Mislocalization of melanosomal proteins in melanocytes from mice with oculocutaneous albinism type 2. *Exp Eye Res*, 72(6), 695-710.

Maresh, G. A., Marken, J. S., Neubauer, M., Aruffo, A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., et al. (1994). Cloning and expression of the gene for the melanoma-associated ME20 antigen. *DNA Cell Biol*, *13*(2), 87-95.

Marks, M. S., & Seabra, M. C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(10), 738-748.

Marmorstein, A. D., Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., & Rodriguez-Boulan, E. (1998). Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 857, 1-12.

Martens, S., & McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 543-556.

Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., et al. (2003). A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(15), 9011-9016.

Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Bennett, D. C., Lozano, J. A., Solano, F., & Garcia-Borron, J. C. (1999). The mouse silver locus encodes a single transcript truncated by the silver mutation. *Mamm Genome*, *10*(12), 1168-1171.

Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 121-132.

McGlinchey, R. P., Shewmaker, F., Hu, K. N., McPhie, P., Tycko, R., & Wickner, R. B. (2011). Repeat domains of melanosome matrix protein Pmel17 orthologs form amyloid fibrils at the acidic melanosomal pH. [Research Support, N.I.H., Intramural]. *The Journal of biological chemistry*, 286(10), 8385-8393.

McGlinchey, R. P., Shewmaker, F., McPhie, P., Monterroso, B., Thurber, K., & Wickner, R. B. (2009). The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(33), 13731-13736.

Nagase, H., Koh, C. S., & Nakayama, K. (2011). gamma-Secretase-regulated signaling pathways, such as notch signaling, mediate the differentiation of hematopoietic stem cells, development of the immune system, and peripheral immune responses. *Curr Stem Cell Res Ther*, 6(2), 131-141.

Ohbayashi, N., Maruta, Y., Ishida, M., & Fukuda, M. (2012). Melanoregulin regulates retrograde melanosome transport through interaction with the RILP-p150Glued complex in melanocytes. *J Cell Sci, 125*(Pt 6), 1508-1518.

Orlow, S. J. (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*, 105(1), 3-7.

Orlow, S. J., & Brilliant, M. H. (1999). The pink-eyed dilution locus controls the biogenesis of melanosomes and levels of melanosomal proteins in the eye. *Exp Eye Res*, 68(2), 147-154.

Orlow, S. J., Zhou, B. K., Boissy, R. E., & Pifko-Hirst, S. (1993). Identification of a mammalian melanosomal matrix glycoprotein. *J Invest Dermatol*, 101(2), 141-144.

Ostermann, N., Eder, J., Eidhoff, U., Zink, F., Hassiepen, U., Worpenberg, S., et al. (2006). Crystal structure of human BACE2 in complex with a hydroxyethylamine transition-state inhibitor. *Journal of molecular biology*, *355*(2), 249-261.

Papageorgiou, N., Carpenter, E., Scally, A. J., & Tobin, D. J. (2008). Adult human epidermal melanocytes for neurodegeneration research. *Neuroreport*, 19(18), 1787-1791.

Pathak, M. A. (1991). Ultraviolet radiation and the development of non-melanoma and melanoma skin cancer: clinical and experimental evidence. *Skin Pharmacol, 4 Suppl 1*, 85-94.

Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol, 23*, 519-547.

Prota, G., Hu, D. N., Vincensi, M. R., McCormick, S. A., & Napolitano, A. (1998). Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp Eye Res,* 67(3), 293-299.

Puri, N., Gardner, J. M., & Brilliant, M. H. (2000). Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol*, *115*(4), 607-613.

Quast, T., Wehner, S., Kirfel, G., Jaeger, K., De Luca, M., & Herzog, V. (2003). sAPP as a regulator of dendrite motility and melanin release in epidermal melanocytes and melanoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(12), 1739-1741.

Raiborg, C., & Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237), 445-452.

Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., et al. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(30), 11172-11177.

Raposo, G., & Marks, M. S. (2002). The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic*, *3*(4), 237-248.

Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol, 8*(10), 786-797.

Raposo, G., Marks, M. S., & Cutler, D. F. (2007). Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Curr Opin Cell Biol*, 19(4), 394-401.

Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D. M., Berson, J. F., & Marks, M. S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol*, *152*(4), 809-824.

Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., et al. (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet*, *10*(12), 1317-1324.

Robila, V., Ostankovitch, M., Altrich-Vanlith, M. L., Theos, A. C., Drover, S., Marks, M. S., et al. (2008). MHC class II presentation of gp100 epitopes in melanoma cells requires the function of conventional endosomes and is influenced by melanosomes. *J Immunol*, *181*(11), 7843-7852.

Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., et al. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*, *185*(7), 1209-1225.

Rozanowska, M., Sarna, T., Land, E. J., & Truscott, T. G. (1999). Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med*, *26*(5-6), 518-525.

Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G. J., & Klumperman, J. (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell*, *13*(4), 1313-1328.

Saeki, H., & Oikawa, A. (1978). Effects of pH and type of sugar in the medium on tyrosinase activity in cultured melanoma cells. *J Cell Physiol*, *94*(2), 139-145.

Sannerud, R., & Annaert, W. (2009). Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), 183-190.

Santoriello, C., Gennaro, E., Anelli, V., Distel, M., Kelly, A., Koster, R. W., et al. (2010). Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PloS one*, *5*(12), e15170.

Sarangarajan, R., & Boissy, R. E. (2001). Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res*, 14(6), 437-444.

Schiaffino, M. V., Baschirotto, C., Pellegrini, G., Montalti, S., Tacchetti, C., De Luca, M., et al. (1996). The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(17), 9055-9060.

Schraermeyer, U., Dohms, M., & Rack, M. (1996). Heterogeneous ultrastructure of melanosome formation in the goldfish induced by osmotic stress. *Histol Histopathol*, 11(2), 313-321.

Schraermeyer, U., & Heimann, K. (1999). Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res, 12*(4), 219-236.

Schraermeyer, U., Peters, S., Thumann, G., Kociok, N., & Heimann, K. (1999). Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp Eye Res*, *68*(2), 237-245.

Seabra, M. C., & Coudrier, E. (2004). Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic, 5*(6), 393-399.

Seiji, M., Fitzpatrick, T. B., & Birbeck, M. S. (1961). The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol*, *36*, 243-252.

Seiji, M., Fitzpatrick, T. B., Simpson, R. T., & Birbeck, M. S. (1963). Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature*, *197*, 1082-1084.

Seiji, M., & Kikuchi, A. (1969). Acid phosphatase activity in melanosomes. J Invest Dermatol, 52(2), 212-216.

Setty, S. R., Tenza, D., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Raposo, G., & Marks, M. S. (2008). Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature*, 454(7208), 1142-1146.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., & Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, *89*(4), 629-639.

Simmen, T., Schmidt, A., Hunziker, W., & Beermann, F. (1999). The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J Cell Sci, 112 (Pt 1)*, 45-53.

Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K., & Ito, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22(5), 563-579.

Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), 575-581.

Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., et al. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, *394*(6692), 494-498.

Sitaram, A., Piccirillo, R., Palmisano, I., Harper, D. C., Dell'Angelica, E. C., Schiaffino, M. V., et al. (2009). Localization to mature melanosomes by virtue of cytoplasmic dileucine motifs is required for human OCA2 function. *Mol Biol Cell*, 20(5), 1464-1477.

Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev, 84*(4), 1155-1228.

Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P. M., Schallreuter, K. U., Paus, R., & Tobin, D. J. (2005). Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol*, *124*(1), 13-21.

Spiegel-Adolf, M. (1937). Studies on melanins: Photosynthetic melanins. *Biochem J, 31*(8), 1303-1310.

Spritz, R. A. (1999). Multi-organellar disorders of pigmentation: intracellular traffic jams in mammals, flies and yeast. *Trends Genet*, 15(9), 337-340.

Sprong, H., Degroote, S., Claessens, T., van Drunen, J., Oorschot, V., Westerink, B. H., et al. (2001). Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol*, *155*(3), 369-380.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 10(8), 513-525.

Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E., & Seabra, M. C. (2002). A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J Biol Chem*, *277*(28), 25423-25430.

Stutzer, I., Selevsek, N., Esterhazy, D., Schmidt, A., Aebersold, R., & Stoffel, M. (2013). Systematic proteomic analysis identifies beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic beta-cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of biological chemistry*, 288(15), 10536-10547.

Sun, X. L., He, G. Q., & Song, W. H. (2006). BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Faseb Journal*, 20(9), 1369-1376.

Swank, R. T., Novak, E. K., McGarry, M. P., Rusiniak, M. E., & Feng, L. (1998). Mouse models of Hermansky Pudlak syndrome: a review. *Pigment Cell Res*, 11(2), 60-80.

Tang, X. F., Zhang, Z., Hu, D. Y., Xu, A. E., Zhou, H. S., Sun, L. D., et al. (2013). Association analyses identify three susceptibility Loci for vitiligo in the Chinese Han

population. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of investigative dermatology,* 133(2), 403-410.

Theos, A. C., Berson, J. F., Theos, S. C., Herman, K. E., Harper, D. C., Tenza, D., et al. (2006). Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell*, *17*(8), 3598-3612.

Theos, A. C., Tenza, D., Martina, J. A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., et al. (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell*, *16*(11), 5356-5372.

Theos, A. C., Truschel, S. T., Raposo, G., & Marks, M. S. (2005). The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res*, *18*(5), 322-336.

Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., et al. (2006). A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. Developmental cell, 10(3), 343-354.

Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283(44), 29615-29619.

Thong, H. Y., Jee, S. H., Sun, C. C., & Boissy, R. E. (2003). The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *Br J Dermatol*, 149(3), 498-505.

Turner, W. A., Taylor, J. D., & Tchen, T. T. (1975). Melanosome formation in the goldfish: the role of multivesicular bodies. *J Ultrastruct Res, 51*(1), 16-31.

Uptain, S. M., & Lindquist, S. (2002). Prions as protein-based genetic elements. Annu Rev Microbiol, 56, 703-741.

Valencia, J. C., Rouzaud, F., Julien, S., Chen, K. G., Passeron, T., Yamaguchi, Y., et al. (2007). Sialylated core 1 O-glycans influence the sorting of Pmel17/gp100 and determine its capacity to form fibrils. [Research Support, N.I.H., Intramural]. *The Journal of biological chemistry*, 282(15), 11266-11280.

van Bebber, F., Hruscha, A., Willem, M., Schmid, B., & Haass, C. (2013). Loss of Bace2 in zebrafish affects melanocyte migration and is distinct from Bace1 knock out phenotypes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of neurochemistry*, *127*(4), 471-481.

Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M., & Lambert, J. (2006). The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic*, 7(7), 769-778.

van der Kant, R., & Neefjes, J. (2014). Small regulators, major consequences - Ca(2)(+) and cholesterol at the endosome-ER interface. *J Cell Sci, 127*(Pt 5), 929-938.

van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., et al. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. Developmental cell, 21(4), 708-721.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, *286*(5440), 735-741.

Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. [Review]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 29*(41), 12787-12794.

Vennegoor, C., Hageman, P., Van Nouhuijs, H., Ruiter, D. J., Calafat, J., Ringens, P. J., et al. (1988). A monoclonal antibody specific for cells of the melanocyte lineage. *Am J Pathol, 130*(1), 179-192.

Vijayasaradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B., & Houghton, A. N. (1995). Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J Cell Biol*, *130*(4), 807-820.

Vogel, A. M., & Esclamado, R. M. (1988). Identification of a secreted Mr 95,000 glycoprotein in human melanocytes and melanomas by a melanocyte specific monoclonal antibody. *Cancer Res, 48*(5), 1286-1294.

Wade, N., Bryant, N. J., Connolly, L. M., Simpson, R. J., Luzio, J. P., Piper, R. C., et al. (2001). Syntaxin 7 complexes with mouse Vps10p tail interactor 1b, syntaxin 6, vesicle-associated membrane protein (VAMP)8, and VAMP7 in b16 melanoma cells. *J Biol Chem*, *276*(23), 19820-19827.

Wahle, T., Prager, K., Raffler, N., Haass, C., Famulok, M., & Walter, J. (2005). GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Cell Neurosci, 29*(3), 453-461.

Wakamatsu, K., & Ito, S. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res, 15*(3), 174-183.

Wang, J., Ohno-Matsui, K., & Morita, I. (2012). Elevated amyloid beta production in senescent retinal pigment epithelium, a possible mechanism of subretinal deposition of amyloid beta in age-related macular degeneration. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(1), 73-78.

Wang, N., & Hebert, D. N. (2006). Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res*, 19(1), 3-18.

Wang, R., Tang, P., Wang, P., Boissy, R. E., & Zheng, H. (2006). Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 353-358.

Wasmeier, C., Romao, M., Plowright, L., Bennett, D. C., Raposo, G., & Seabra, M. C. (2006). Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol*, *175*(2), 271-281.

Watt B, R. G. a. M. M. (2010). Pmel17: an amyloid determinant of organelle structure. . In e. R. S. S. Rigacci and M. Bucciantini (Ed.), *Functional amyloid aggregation* (pp. 89-113.). Trivandrum, Kerala, India

Watt, B., Tenza, D., Lemmon, M. A., Kerje, S., Raposo, G., Andersson, L., et al. (2011). Mutations in or near the transmembrane domain alter PMEL amyloid formation from functional to pathogenic. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS genetics*, 7(9), e1002286.

Watt, B., van Niel, G., Fowler, D. M., Hurbain, I., Luk, K. C., Stayrook, S. E., et al. (2009). N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils. *J Biol Chem*, 284(51), 35543-35555.

Watt, B., van Niel, G., Raposo, G., & Marks, M. S. (2013). PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 26(3), 300-315.

Wei, M. L. (2006). Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res, 19*(1), 19-42.

Wenczl, E., Van der Schans, G. P., Roza, L., Kolb, R. M., Timmerman, A. J., Smit, N. P., et al. (1998). (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol*, *111*(4), 678-682.

Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Shewmaker, F., Baxa, U., et al. (2004). Prions of yeast are genes made of protein: amyloids and enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *69*, 489-496.

Wielgus, A. R., & Sarna, T. (2005). Melanin in human irides of different color and age of donors. *Pigment Cell Res*, 18(6), 454-464.

Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Zhang, Y., Novak, E. K., et al. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(14), 7933-7938.

Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., et al. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol*, 4(4), 271-278.

Yaar, M., & Park, H. Y. (2012). Melanocytes: a window into the nervous system. [Review]. *The Journal of investigative dermatology*, *132*(3 Pt 2), 835-845.

Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., & Xu, H. (2001). The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem*, *276*(39), 36788-36796.

Yan, R., Munzner, J. B., Shuck, M. E., & Bienkowski, M. J. (2001). BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 34019-34027.

Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Lancet neurology*, *13*(3), 319-329.

Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 107-117.

Zhang, Q., Zhen, L., Li, W., Novak, E. K., Collinson, L. M., Jang, E. K., et al. (2002). Cell-specific abnormal prenylation of Rab proteins in platelets and melanocytes of the gunmetal mouse. *Br J Haematol*, *117*(2), 414-423.

Zhang, X., Erb, C., Flammer, J., & Nau, W. M. (2000). Absolute rate constants for the quenching of reactive excited states by melanin and related 5,6-dihydroxyindole metabolites: implications for their antioxidant activity. *Photochem Photobiol*, *71*(5), 524-533.

Zhou, B. K., Boissy, R. E., Pifko-Hirst, S., Moran, D. J., & Orlow, S. J. (1993). Lysosomeassociated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II. *J Invest Dermatol*, *100*(2), 110-114.

Zhou, B. K., Kobayashi, T., Donatien, P. D., Bennett, D. C., Hearing, V. J., & Orlow, S. J. (1994). Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using "organelle scanning". *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(15), 7076-7080.

# **ANNEXES**

# ANNEXES

1. Sources des photos de la Figure 17

http://homepage.usask.ca/~schmutz/SheltieColor.html,

http://jaxmice.jax.org/strain/100410.html,

http://whyfiles.org/265animal\_breeding/images/5red\_junglefowl.jpg,

http://www.downthelane.net/chicken-breeds/leghorn-chicken-breed.php).

Note : Ces photos ont été prises sur Internet (le 13 Juin 2014) pour illustrer les défauts de pigmentation liés aux mutations de PMEL.

2. Article 2 : The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis

# The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis

Guillaume van Niel,<sup>1,2,\*</sup> Stéphanie Charrin,<sup>4,7</sup> Sabrina Simoes,<sup>1,2,7</sup> Maryse Romao,<sup>1,2,3</sup> Leila Rochin,<sup>1,2</sup> Paul Saftig,<sup>5</sup> Michael S. Marks,<sup>6</sup> Eric Rubinstein,<sup>4</sup> and Graça Raposo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, F-75248 Paris, France

<sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche 144, Centre National de la Recherche Scientifique, F-75248 Paris, France

<sup>3</sup>Cell and Tissue Imaging Facility (IBiSA), Institut Curie, F-75248 Paris, France

<sup>4</sup>Inserm, U1004, Institut André Lwoff, Université Paris 11, Villejuif 94800, France

<sup>5</sup>Biochemisches Institut, Christian Albrechts Universität Kiel, 24118 Kiel, Germany

<sup>6</sup>Departments of Pathology and Laboratory Medicine and Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: guillaume.van-niel@curie.fr

DOI 10.1016/j.devcel.2011.08.019

#### SUMMARY

Cargo sorting to intraluminal vesicles (ILVs) of multivesicular endosomes is required for lysosomerelated organelle (LRO) biogenesis. PMEL-a component of melanocyte LROs (melanosomes)-is sorted to ILVs in an ESCRT-independent manner, where it is proteolytically processed and assembled into functional amyloid fibrils during melanosome maturation. Here we show that the tetraspanin CD63 directly participates in ESCRT-independent sorting of the PMEL luminal domain, but not of traditional ESCRT-dependent cargoes, to ILVs. Inactivating CD63 in cell culture or in mice impairs amyloidogenesis and downstream melanosome morphogenesis. Whereas CD63 is required for normal PMEL luminal domain sorting, the disposal of the remaining PMEL transmembrane fragment requires functional ESCRTs but not CD63. In the absence of CD63, the PMEL luminal domain follows this fragment and is targeted for ESCRT-dependent degradation. Our data thus reveal a tight interplay regulated by CD63 between two distinct endosomal ILV sorting processes for a single cargo during LRO biogenesis.

#### INTRODUCTION

Sorting of integral membrane protein cargoes to the intraluminal vesicles (ILVs) of multivesicular endosomes (MVEs) is a key step in many physiological processes including cessation of growth factor signaling, lysosomal degradation, exosome secretion, lysosome related organelle (LRO) biogenesis, and perhaps even amyloid formation (Raiborg and Stenmark, 2009; Raposo et al., 2007; Simons and Raposo, 2009; van Niel et al., 2006). Lysosomal degradation generally requires the recognition of ubiquitinated protein cargoes by components of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery

(Gruenberg and Stenmark, 2004; Hurley, 2008), in which the ESCRT-0, -I and -II complexes recognize and sequester ubiquitinated proteins in the endosomal membrane and the ESCRT-III complex effects membrane budding and scission. However, sorting of some proteins within MVEs, including physiologically critical cargoes of exosomes and LRO biogenesis intermediates, occurs independently of ubiquitination or ESCRT components (Buschow et al., 2009; Simons and Raposo, 2009; Theos et al., 2006b; Trajkovic et al., 2008). The mechanisms underlying ESCRT-independent ILV sorting and their temporal and spatial relationship with ESCRT-dependent sorting processes remain poorly understood.

ESCRT-independent ILV sorting is important to generate precursors for melanosomes. Melanosomes are LROs of melanocytes and other pigment cells that are specialized for melanin pigment synthesis. Melanosomes coexist with lysosomes and form through four morphologically distinct stages (Seiji et al., 1963), the earliest of which (stage I and II premelanosomes) lack pigment but harbor fibrils that assemble into fibrillar sheets upon which newly synthesized melanins polymerize during melanosome maturation. The fibrils underlie the elongated shape of melanosomes and are composed largely of proteolytic lumenal fragments of the amyloidogenic pigment cell-specific type I integral membrane protein, PMEL. The fibrils, which are thought to concentrate melanins and to prevent the accumulation of toxic intermediates generated during pigment synthesis (reviewed in (Raposo et al., 2007; Theos et al., 2005; Watt et al., 2009), form in association with the ILVs of stage I premelanosomes (Hurbain et al., 2008) upon which PMEL accumulates (Raposo et al., 2001). Stage I premelanosomes are vacuolar MVE intermediates that are accessed by endocytic tracers after 15 min, contain few (n = 2-6) ILV profiles, and harbor abundant clathrin-containing bilayered coats at their limiting membrane (Raposo et al., 2001) that are enriched in the ESCRT-0 component Hrs (Theos et al., 2006b). Paradoxically, PMEL is sorted to ILVs by an ESCRT-independent mechanism (Theos et al., 2006b; Truschel et al., 2009). The molecular basis for this sorting event is not known, but it requires a lumenal subdomain of PMEL and does not require any cytoplasmic domain determinant or ubiquitination (Theos et al., 2006b). Sorting to ILVs correlates with



#### Figure 1. CD63 Colocalizes with PMEL on ILVs of MVEs from Human Melanocytic Cells

(A) MNT-1 cells were analyzed by IFM after labeling for CD63 and for PMEL using antibody HMB50 (detects the luminal domain). Individual labels, a merged image, and a 3-fold magnification of the merged image are shown. Note that labeling for CD63 and PMEL luminal domain partially overlap. Scale bar represents 10 μm.

(B–D) MNT-1 cells were processed for ultrathin cryosectioning and double immunogold labeled for PMEL luminal domain (HMB50; PAG 15) and CD63 (PAG 10). (B) PMEL and CD63 are both present in MVEs (annotated MVE on the micrograph) whereas only CD63 is observed on maturing melanosomes (annotated IV on the micrograph). Scale bar represents 200 nm.

(C) Quantification of immunogold labeling for PMEL (using HMB50 antibody) and CD63. An equivalent number of gold particles representing labeling for PMEL and for CD63 in the EM analysis was counted and assigned to the indicated compartments, which were identified by morphology. Data are presented as the mean percentage of total gold particles in each compartment ± standard deviation (SD).

(D) Quantification of immunogold labeling on ILVs versus the limiting membrane on coated MVEs. Results are expressed as the mean percentage of gold particles (±SD) on ILVs (see B for an example) relative to total gold particles counted in MVEs.

proteolytic processing steps that release the fibrillogenic luminal domain from the transmembrane form of PMEL to initiate amyloid formation (Berson et al., 2001, 2003; Fowler et al., 2006; Kummer et al., 2009). These processing events also generate transmembrane fragments of PMEL that are destined for  $\gamma$ -secretase-dependent degradation by as yet incompletely defined mechanisms (Kummer et al., 2009).

In other cell systems, ESCRT-independent formation of ILVs in MVEs requires lipid rafts and ceramide (de Gassart et al., 2003; Trajkovic et al., 2008) and/or protein aggregation (Fang et al., 2007; Vidal et al., 1997). Other proposed regulators of ILV formation are proteins of the tetraspanin family (TSPAN) (Charrin et al., 2009), which are selectively enriched in the ILVs of MVEs and in exosomes derived from them (Simons and Raposo, 2009; van Niel et al., 2006). Among TSPAN, CD63 is particularly enriched intracellularly; in most cells it localizes predominantly to late endosomes and lysosomes (Pols and Klumperman, 2009), whereas in specialized cells CD63 is also present in LROs such as endothelial cell Weibel-Palade bodies, platelet dense granules, and neutrophil myeloperoxidase granules (Pols and Klumperman, 2009; Raposo and Marks, 2007). Here, we investigated the role of CD63 in PMEL sorting to ILVs and its ability to generate amyloid fibrils in vitro and in vivo. We show that CD63 functions in ESCRT-independent ILV formation, and that it thereby modulates the fate of two distinct domains of PMEL that are destined for amyloidogenesis and degradation. Importantly our data reveal a tightly regulated interplay between ESCRT-independent and dependent sorting of distinct functional domains of the same proteolytically cleaved cargo protein to regulate organelle biogenesis.

#### RESULTS

# CD63 Localizes to Melanosomes and to PMEL-Positive MVEs

We first tested whether CD63 localizes to melanosomal compartments in pigmented MNT-1 melanoma cells, a faithful model for eumelanogenesis (Raposo et al., 2001). Immunofluorescence microscopy (IFM) analysis revealed that CD63 (Figure 1A), but not the related tetraspanin CD81 (see Figure S1A available online), localizes to a subset of premelanosomes as shown by its partial colocalization with PMEL labeled by antibody HMB50. By immunoelectron microscopy (IEM) using immunogold labeling on ultrathin cryosections, CD63 localizes broadly to multiple intracellular compartments, including predominantly mature melanosomes (stages I–IV; Figure 1B, left, and Figure 1C), but only 5%–10% localized to lysosomes (Figure 1C) as supported by the low degree of overlap with LAMP-1 by IFM (Figure S1B). Consistent with the degree of overlap by IFM, quantification of the immunogold labeling shows that 20%–25% of CD63 is detected on PMEL-positive MVEs (Figures 1B and 1C). Within MVEs, more than 75% of the labeling for both CD63 and PMEL is detected on ILVs rather than the limiting membrane (Figures 1B and 1D). This indicates that CD63, like PMEL, is preferentially sorted to ILVs within melanocyte MVEs.

Our previous studies revealed that PMEL sorting to ILVs does not require ubiquitination or functional ESCRT components (Theos et al., 2006b; Truschel et al., 2009). Consistently, both CD63 and PMEL were detected in MVEs in ultrathin cryosections of MNT-1 cells in which the ESCRT-I subunit, Tsg101, was depleted by siRNA treatment (Figures S1C and S1D). These observations agree with previous findings that CD63-positive MVEs continue to form despite concomitant inactivation of subunits from four different ESCRT complexes (Stuffers et al., 2009), and suggest that both CD63 and PMEL undergo ESCRT-independent sorting into the ILVs of MVEs. The only reported "effector" of ESCRT-independent ILV sorting is ceramide in sorting the proteolipid PLP (Trajkovic et al., 2008). We could not obtain evidence for a ceramide requirement in PMEL and CD63 localization or amyloid formation using sphingomyelinase inhibitors or siRNA-mediated inactivation of acidic type II sphingomyelinase (Figures S1E and S1F).

#### CD63 Is Required for Intraluminal Vesicle Formation and PMEL Distribution

We next explored the potential requirement for CD63 in ESCRTindependent sorting of PMEL in MVEs by analyzing MNT-1 cells in which CD63 was depleted by siRNA treatment. By western blot analysis, treatment with either of two CD63-specific siRNAs decreased the expression of CD63 by more than 80% (Figure 2A). As in untreated cells, (Hurbain et al., 2008; Raposo et al., 2001), MNT-1 cells treated with control siRNA and analyzed by conventional electron microscopy (EM) harborcoated MVEs containing an average of 5 ILV profiles (Figure 2B, left, and Figure 2D). By IEM, the ILVs are enriched in PMEL (Figure 2C, left, and Figure 2E). In CD63-inactivated cells, whereas vacuolar endosomes with characteristic bilayered coats (Figure 2B, arrows) are unusually abundant (see Figures 3D and 3F), they are largely depleted of ILVs, with an average of less than 2 ILV profiles per endosome (Figure 2B, right, and Figure 2D). Concomitantly, whereas labeling for PMEL was still detected in coated endosomes in CD63-inactivated cells, it was mostly localized to the limiting membrane (Figure 2C, right), resulting in more than a 2-fold reduction in the fraction of PMEL present on ILVs (Figure 2E). On those ILVs that were detectable in CD63-depleted cells, the level of labeling for PMEL was similar to that observed on ILVs in control cells (Figure 2F) suggesting that the main effect of CD63 depletion was on ILV formation at the coated endosome rather than on Pmel17 sorting to the ILVs.

#### CD63 Is Required for the Generation of PMEL-Driven Fibrils and Premelanosomes In Vitro and In Vivo

PMEL amyloid fibrils have been proposed to nucleate on ILVs in the MVE lumen (Berson et al., 2001; Hurbain et al., 2008; Theos et al., 2006b). We therefore evaluated the requirement for CD63 in the formation of PMEL amyloid fibrils. The antibody HMB45 detects an epitope on Golgi-modified PMEL that is most enriched on proteolytic fragments that accumulate on fibrils (Harper et al., 2008; Hoashi et al., 2006; Kushimoto et al., 2001). Inactivation of CD63, but not of CD81 (Figures S2A and S2B), resulted in a consistent and specific reduction (93%  $\pm$ 7% compared to control) in HMB45 labeling by both immunoblotting of fibril-enriched detergent-insoluble cell fractions (Figure 3A) and by IFM (Figure 3B). Nevertheless, CD63-depleted MNT-1 cells retained punctate labeling by IFM for PMEL using antibody HMB50, which recognizes a wider panel of PMEL forms (Harper et al., 2008) (Figure 3C). These data suggest that CD63 is not required for PMEL expression or trafficking to post-Golgi structures but is required for downstream fibril formation.

To further investigate the requirement for CD63 in melanogenesis, we analyzed the morphology of melanosomal compartments in CD63-inactivated cells by EM. MNT-1 cells treated with control siRNA display numerous stage II premelanosomes harboring organized fibrils (Figure 3D, left, arrowheads, and Figure 3E1). CD63 depletion is accompanied by a dramatic and quantitative reduction in the number of stage II premelanosomes containing fully formed amyloid sheets (Figure 3D, right, and Figure 3F). As a potential consequence of inhibiting fibrillogenesis after 3 days of CD63 depletion, the number of stage III pigmented melanosomes also decreased, while pigmented round melanosomal structures with unstructured melanin deposits accumulated (Figure 3D, right, arrowheads, and Figure 3F). Consistent with this accumulation and with the lack of effect of reduced PMEL expression on melanogenesis (Theos et al., 2006a), melanin content slightly increased and melanin synthesizing enzymes localized appropriately to the aberrant melanosomes in CD63-depleted cells (Figures S2C and S2D). Moreover, relative to controls, CD63-depleted cells harbored 4-fold the number of compartments with lysosomal morphology (round compartments of 500 nm diameter containing few internal vesicles, dense material and lamellar structures) and additional unique organelles with clearly visible dense aggregates (Figures 3E2 and 3E3), similar to those observed in cells with impaired fibril formation due to a loss of PMEL processing (Berson et al., 2003). This suggested that as a consequence of impaired delivery of PMEL to ILVs of coated MVES in the absence of CD63, amyloidogenesis and consequent melanosome maturation are disrupted.

To investigate whether CD63 depletion affects melanogenesis in a physiological setting, we analyzed pigment cells in CD63<sup>-/-</sup> mice (Schröder et al., 2009). Compared to CD63<sup>+/+</sup> mice, CD63<sup>-/-</sup> mice display variable graying of coat color (data not shown). Because of potential compensatory effects observed in skin melanocytes of mice with melanogenesis defects (Lopes et al., 2007), we analyzed melanosome morphology in retinal pigment epithelium (RPE) in which the compensatory effect is less apparent. By EM, RPE of CD63<sup>-/-</sup> mice have a dramatic reduction in melanosome number (Figure 3G). Compared to the characteristic ellipsoidal shaped melanosomes in the RPE



#### Figure 2. Depletion of CD63 Inhibits Sorting of PMEL onto ILVs

(A) Western blot analysis of lysates of MNT-1 cells treated with control or two different CD63 siRNA using anti-CD63 antibody and anti-β-tubulin antibody as a loading control.

(B) MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA #1 were analyzed by conventional EM. Black arrows indicate the ILVs; white arrows indicate the cytosolic bilayered coats. Scale bar represents 200 nm.

(C) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with control (left) or CD63#1 siRNA (right) were immunogold labeled for PMEL luminal domain with HMB50 and PAG10. Examples of MVEs from each sample are shown. Whereas in control cells labeling for PMEL luminal domain is associated with the ILVs, in CD63 depleted cells the labeling is observed at the limiting membrane of the endosome close or within the clathrin coat (arrows). Scale bar represents 200 nm.

(D) The average number of ILVs (±SD) per coated MVE in 50 conventional EM profiles of each sample was quantified. \*p < 0.05.

(E) Quantification of immunogold labeling for PMEL with HMB50 on ILVs of 100 MVEs is expressed as the mean percentage of gold particles ( $\pm$ SD) on ILVs relative to total gold particles in MVEs. \*p < 0.05.

(F) Same as (E) but results are expressed as the mean number of gold particles (±SD) per ILV within MVEs.

of control mice (Figure 3G, top), the remaining melanized melanosomes in CD63<sup>-/-</sup> RPE are round (Figure 3G, bottom). The round shape is consistent with a defect in the formation of the structural scaffold formed by PMEL-derived amyloid fibers in PMEL mutant *silver* mice (Theos et al., 2006a). These observations indicate that amyloidogenesis and consequent melanosome maturation are impaired in the absence of CD63 in vivo.

#### CD63 Is Required for Amyloidogenic Processing of PMEL

PMEL sorting to ILVs correlates with proteolytic processing steps that are required for PMEL to transition to the amyloid form (Berson et al., 2003; Theos et al., 2006b). These steps include: (1) cleavage of full-length PMEL by a prohormone convertase into an amyloidogenic lumenal M $\alpha$  fragment and a disulfide-linked transmembrane domain-containing M $\beta$  fragment

(Berson et al., 2001); (2) further processing of M $\beta$  by a site 2 protease (S2P) to release  $M\alpha$  from the membrane and to produce a C-terminal fragment (CTF) that is degraded by γ-secretase (Kummer et al., 2009); and (3) further processing of Ma by unknown proteases to smaller fragments found in mature fibers (Kushimoto et al., 2001; Watt et al., 2009) (Figure 4A). To test whether CD63 depletion affects PMEL processing, we assayed siRNA-treated MNT-1 cells by western blotting using an antibody to the PMEL cytosolic domain (aPmel-C). In control cells, this antibody detects the immature core-glycosylated PMEL P1 form (90 kDa), the MB (28 kDa) product of PC cleavage, and CTF (10 kD) (Figures 4A and 4B). In CD63depleted cells (Figure 2A), Mß and CTF bands are detectable but modestly decreased in intensity (Figure 4B). To distinguish whether this reflects decreased production or accelerated degradation of M $\beta$  and CTF, we blocked degradation of CTF (but of not M $\beta$  or P1) by treating cells with the  $\gamma\text{-secretase}$ 



#### Figure 3. Depletion of CD63 Inhibits Formation of PMEL Fibrils In Vitro and In Vivo

(A) Triton X-100-insoluble fraction from MNT-1 cells treated with control or two different CD63 siRNA (CD63#1 and CD63#2) were analyzed by western blot using HMB45 or  $\beta$ -tubulin antibody as a loading control. The percentage of signal intensity relative to the control is noted below each band.

(B and C) MNT-1 cells treated with the CD63#1 siRNA were analyzed by IFM after labeling for CD63 and HMB45 (B) or HMB50 (C). CD63-inactivated cells are indicated by white stars; the micrographs were chosen to better emphasize the differences between CD63-inactivated cells and CD63-expressing cells. Scale bar represents 10  $\mu$ m.

(D) MNT-1 cells treated with control or CD63#1 siRNA were analyzed by conventional EM. Arrows, bilayered coats on MVEs; arrowheads, maturing melanosomes (stage II and III). Scale bar represents 200 nm.

(E) Representative images of (1) stage II pre-melanosomes in control cells, and (2) dense unstructured aggregates or (3) lysosomes in CD63-depleted cells. Scale bar represents 200 nm.

(F) Quantification of the number of different endosomal/melanosomal compartments, as indicated on the x axis and defined by morphology, observed by conventional EM in MNT-1 cells treated with control and CD63 siRNA. Values represent the percentage of each compartment (±SD) relative to all of the

inhibitor, DAPT (Figure S3). Treatment of either control or CD63-depleted cells with DAPT induced a similar level of accumulated CTF (Figure 4C). This suggested CD63 depletion accelerates CTF degradation but does not affect upstream PMEL cleavages.

To further dissect how CD63 depletion affects PMEL processing and fibril maturation, we probed immunoblots of cell fractions with antibodies to additional PMEL epitopes. Ma fragments that are released from the membrane anchor by PC and S2P cleavage assemble into Triton X-100 insoluble fibrils (Berson et al., 2003), detected by antibody aPmel-N to the PMEL N-terminus, and then matured by further processing to smaller digestion products detected by antibodies HMB45 and I51 (Harper et al., 2008; Hoashi et al., 2006; Watt et al., 2009). In TX-100-insoluble fractions of CD63 siRNA-treated cells, aPmel-N reactive Ma (but not aPmel-C-reactive cytoplasmic fragments of PMEL) accumulated at normal or higher levels relative to control cells (Figures 4D and 4E), but smaller HMB45- and I51-reactive fragments were depleted (Figures 3A and 4F). These data confirm that CD63 is not required for PC and S2P processing and release of the PMEL fibrillogenic lumenal domain, but indicate that CD63 is required either for further processing subsequent to ILV sorting or for stabilization of the resultant fragments.

#### **CD63 Interacts with the PMEL CTF**

To test whether CD63 might influence PMEL ILV partitioning and processing directly, we assayed for physical interactions between CD63 and PMEL. To this end we first expressed PMEL in HeLa cells by transfection and used coimmunoprecipitation from cell lysates prepared in mild detergent (Brij 97) to preserve tetraspanin-partner interactions. At steady state, PMEL CTF was coimmunoprecipitated with anti-CD63 but not with anti-CD81 (Figure 5A, upper right; note the signal above the background bands, detected in untransfected HeLa cells, upper left). Similar coimmunoprecipitation assays with endogenous PMEL in MNT-1 cells failed to detect an interaction (data not shown). However, consistent with the shorter half-life of PMEL and its CTF in melanocytic cells compared with transfected HeLa cells (Berson et al., 2001), CTF was coimmunoprecipitated with CD63-but not with the related tetraspanins CD81 or CD9-after treatment of MNT-1 cells with DAPT (Figure 5B, top panels). Conversely, CD63 but not CD81 could be coimmunoprecipitated with aPmel-C from DAPT-treated MNT-1 cell lysates (Figure 5B, bottom panels). MART-1, a known partner of PMEL (Hoashi et al., 2005), also interacted with both PMEL CTF and CD63 (Figure 5B), but was not necessary for the interaction between PMEL and CD63 as indicated by coimmunoprecipitation assays from HeLa cells that lack MART-1 (Figure 5A). Together, these data indicate that CD63 interacts with the CTF, likely reflecting a transient CTF-dependent interaction with PMEL prior to cleavage by S2P.

# The C-Terminal Fragment of PMEL Is Degraded in an ESCRT-I-Dependent Manner

Unlike the PMEL-lumenal domain that is clearly associated with ILVs of stage I melanosomes (e.g., Figure 2C), the cytoplasmic domain is mainly detected on the limiting membrane at steady state (Berson et al., 2003; Raposo et al., 2001), suggesting a distinct fate for the CTF after release from the lumenal domain. Given that aPmel-C labeling is localized within clathrin and Hrs-positive regions (Raposo et al., 2001; Theos et al., 2006b) and that accelerated degradation (Figure 4B) in absence of CD63 is correlated to an increased number of lysosomal structures (Figure 3F), we tested whether CTF disposal requires ESCRT-dependent endosomal sorting by following the fate of the CTF in MNT-1 cells depleted for Tsg101 (Figure 6A). Like the ubiquitinated substrate MART-1 (Truschel et al., 2009), the CTF, but not other PMEL isoforms, accumulated in lysates from Tsg101-depleted cells relative to controls (Figure 6A). By IFM, labeling for the Pmel C terminus in control cells yields largely diffuse tubular or small punctate labeling representing the ER, and perinuclear labeling representing largely the Golgi (Figure 6B, upper panels, and Figure 6E, left panels; see also Harper et al., 2008). By contrast, labeling for CTF in Tsg101depleted cells was detected in enlarged vacuoles that surrounded structures labeled for the luminal domain of PMEL (Figure 6B, lower panels). IEM analysis revealed that the PMEL lumenal domain was largely associated with small ILVs whereas the PMEL cytoplasmic domain accumulated mostly at the limiting membrane (Figures 6C and 6D). These observations suggest that although sorting of the PMEL luminal domain occurs in an ESCRT-independent manner, the CTF degradation requires ESCRT-I function and is initiated from MVEs.

To infer the intracellular site of CTF degradation in MNT-1 cells, we allowed CTF to accumulate by inhibiting  $\gamma$ -secretase with DAPT. By IFM analysis, the largely tubulovesicular ER labeling for the PMEL C terminus observed in control cells was replaced in DAPT-treated cells by vesicular structures that remained distinct from those harboring the PMEL luminal domain (Figure 6C, right panels). Most of these structures colocalized with LAMP1 in DAPT-treated control cells (and to some extent in DAPT-treated CD63-depleted cells; Figure S4A), and IEM analysis of these cells revealed an accumulation of the PMEL cytoplasmic domain in small vesicles, conventional MVEs and lysosomes that were distinct from stage II premelanosomes (labeled for the PMEL luminal domain; Figure 6F). These observations suggest that if not degraded, the CTF accumulates in lysosomes. Consistent with this conclusion, CTF also accumulated in cells treated with lysosomal protease inhibitors (Figure S4B). Targeting to lysosomes required ESCRT-I, because in Tsg101-depleted cells the CTF accumulated in endosomal structures together with the luminal domain (Figures 6B-6D) and did not localize to LAMP1-positive compartments (Figure S4A). These data indicate that the CTF is degraded within

endosomal/melanosomal compartments identified in 50 cell profiles per condition. Note that "total MVEs" refers to all compartments with internal vesicles within their lumen, whereas "coated MVEs" refers only to early endosomes/stage I melanosomes with a coat on the cytosolic side whatever the number of internal vesicles within their lumen.

<sup>(</sup>G) Eyes sections from CD63<sup>+/+</sup> (top) and CD63<sup>-/-</sup> mice (bottom) were analyzed by conventional EM. Shown are regions of the RPE and photoreceptor outer segments (OS). Note the ellipsoidal melanosomes in RPE of CD63<sup>+/+</sup> mice, and the electron dense rounder structures (arrows) in the RPE of CD63<sup>-/-</sup> mice. Scale bars are indicated on each micrograph.

### Developmental Cell Regulation of Endosomal Sorting by CD63



#### Figure 4. Depletion of CD63 Affects the Processing of PMEL

(A) Schematic representation of PMEL maturation and the epitopes recognized by the antibodies used in this study. The maturation process is described in the text. Black triangles, mature N- and O-linked glycosylation; black bar, a disulfide bond that links Ma and Mb; PC, proprotein convertase; ?, unknown proteases that cleave M $\alpha$  to M $\alpha$ C; ICD, intracellular domain of CTF. The names of the anti-PMEL antibodies used in this study and the isoforms they recognize are indicated. (B) Whole cell lysates of MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA #1 or #2 were analyzed by western blot using  $\alpha$ Pmel-C antibody. The percentage of signal intensity relative to the control is noted above each band.

(C) Whole cell lysates of MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA#1 and with 1  $\mu$ M DAPT for 4 hr were analyzed by western blot using  $\alpha$ Pmel-C antibody. (D–F) Triton X-100-soluble (Tx sol) and -insoluble (Tx insol) lysates of MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA#1 were analyzed by western blot using  $\alpha$ Pmel-C (D),  $\alpha$ Pmel-N (E), or I51 antibody (F).

the lysosomal pathway and requires ESCRT-I for proper targeting to this pathway.

Endosomal bilayered clathrin- and Hrs-containing coats function in other cell types in ESCRT-dependent sorting of ubiquitinated substrates to ILVs of MVBs for lysosomal degradation (Raiborg et al., 2006, 2008; Raposo et al., 2001; Sachse et al., 2002; Theos et al., 2006b). Consistent with such a fate for the CTF, EM of DAPT-treated cells indicates an expansion of bilayered clathrin coats on the cytosolic face of MVEs (Figure 6G). IEM revealed that the labeling for the CTF was highly enriched in these coated regions (Figure 6H). Because Hrs binds avidly to ubiquitinated cytosolic domains of transmembrane proteins, we tested whether the CTF was associated with ubiquitylation by immunoprecipitating CTF and other PMEL isoforms from control and DAPT-treated cell lysates and assaying for ubiquitin by immunoblotting. Relative to control cells, in which very little

714 Developmental Cell 21, 708–721, October 18, 2011 ©2011 Elsevier Inc.





#### Figure 5. CD63 Interacts with PMEL CTF

(A) HeLa cells that were mock transfected (left) or transfected with PMEL expression vector (right) were lysed in buffer containing 1% Brij97, and lysates were immunoprecipitated with antibodies to CD63, CD81, or PMEL (with  $\alpha$ Pmel-C) as indicated. Immunoprecipitates or untreated lysate (Ext) were analyzed by western blot with  $\alpha$ Pmel-C (top panels) or anti-CD63 antibody (bottom panels).

(B) Lysates of MNT-1 cells that were treated for 24 hr with 1  $\mu$ M DAPT and lysed with 1% Brij97 were immunoprecipitated with antibodies to TSPANs CD9, CD81, CD63 or CD55, to MART-1, or to PMEL using  $\alpha$ Pmel-C, HMB45, or HMB50. Immunoprecipitates or untreated lysate (Ext) were fractionated by reducing (top 2 panels) or nonreducing (bottom two panels) SDS-PAGE and analyzed by immunoblot with  $\alpha$ Pmel-C, anti-MART-1, anti-CD63, or anti-CD81.

ubiquitin signal was detected in any of the PMEL immunoprecipitates, DAPT treatment resulted in a substantial enrichment of high molecular weight ubiquitin conjugates in immunoprecipitates obtained with  $\alpha$ Pmel-C but not with antibodies to the PMEL lumenal domain (Figure 6I). As a control, ubiquitin was associated with MART-1, a known constitutive substrate for ubiquitination (Lévy et al., 2005), regardless of DAPT treatment (Figure 6l). This indicated that either CTF was itself polyubiquitylated or associated with polyubiquitylated proteins. The association of CTF with ubiquitin was only observed in MNT-1 cell lysates prepared with mild detergent (Brij97). When lysates were prepared with Triton X-100, ubiquitylated proteins did not coprecipitate with CTF. This suggest either that the CTF associates with an ubiquitinated partner in a Triton X-100-sensitive manner or that ubiquinated CTF is only solubilized in mild detergent (data not shown).

#### In the Absence of CD63, both PMEL Luminal Domain and CTF Are Sorted and Degraded in an ESCRT-Dependent Manner

Because PMEL delivery onto ILVs of coated endosomes is reduced upon CD63 depletion, it was surprising that full-length PMEL did not accumulate either at the limiting membrane of coated endosomes (Figure 2C) or in cell lysates (Figure 4B). To determine the fate of PMEL in CD63-depleted MNT-1 cells we first quantified the distribution of its luminal domain by IEM. Relative to control cells, PMEL-luminal domain in CD63-depleted cells was detected in the Golgi apparatus, vesicular profiles, and in electron dense membranous organelles with hallmarks of lysosomes (Figure 7A; illustrated in Figure S5A) that accumulate in these cells (Figures 3E and 3F). Interestingly, the PMELluminal domain was detected at similar levels on MVEs of control and CD63-depleted cells (Figure 7A). As compared to conventional EM (Figures 2B and 2C) IEM does not always allow to clearly discriminate between coated and noncoated MVEs. To define MVEs in which PMEL was sorted in absence of CD63 ultrathin cryosections we double immunogold labeled with HMB50 and an anti-Hrs antibody. In agreement with the conventional EM data showing the presence of ILVs only in noncoated MVEs (Figure 7B, left), PMEL labeling was observed in MVEs but not in Hrs-positive endosomes, (Figure 7B, right). In these MVEs, both PMEL-luminal domain and CTF were associated to a large degree with the ILVs that are still generated upon CD63 inactivation (Figures 7C and 7D; see also Figure 3F). We interpret this observation as evidence that full-length PMEL is delivered to ESCRT-dependent ILVs that continue to form upon CD63 depletion. Consistent with this interpretation, CD63 was not required for ESCRT-dependent ILV sorting and degradation, because steady state levels of the melanocyte transmembrane protein, MART-1-which is known to be ubiquitinated and sorted to ILVs of MVEs (De Mazière et al., 2002; Lévy et al., 2005)-was not altered by CD63 depletion (Figure 8E). The lack of effect of CD63 depletion on ESCRT-dependent ILV formation was not limited to melanocytic cells, because inactivation of CD63 in HeLa cells did not affect the ESCRT-dependent sorting and degradation of the epidermal growth factor receptor (Figures S5C and S5D).

Our interpretation of these results predicts that CD63 regulates a tight balance between ESCRT-independent and dependent sorting within contiguous membranes of MVEs. Consistent with this prediction, the bilayered coats on the cytosolic face of the MVE limiting membrane were unusually expanded in CD63depleted cells (Figures 8A and 8B), much like our observations in DAPT-treated cells (Figure 6G). The increase in coated areas



#### Figure 6. The PMEL CTF Is Excluded from Melanosomes and Degraded in an ESCRT-I-Dependent Manner

(A) MNT-1 cells treated with control or Tsg101 siRNA were analyzed by western blot using antibodies to  $\beta$ -tubulin, Tsg101, MART-1, or the anti-PMEL antibodies HMB45 and  $\alpha$ Pmel-C. Only relevant bands are shown.

(B) MNT-1 cells treated with control or Tsg101 siRNA were analyzed by IFM after labeling for HMB45 (red) and  $\alpha$ Pmel-C (green). White arrows indicate accumulation of  $\alpha$ Pmel-C labeling around HMB45 positive spots. Individual labels, a merged image, and a 3× magnification of the merged images are shown. Scale bar represents 10  $\mu$ m.

(C) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with Tsg101 siRNA were immunogold labeled for PMEL cytoplasmic domain with  $\alpha$ Pmel-C and PAG 15. Scale bar represents 200 nm.

(D) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with Tsg101 siRNA were immunogold labeled for PMEL luminal domain with HMB50 and PAG15 and for PMEL cytoplasmic domain with αPmel-C and PAG 10, Scale bar represents 200 nm. Examples of MVEs are shown. Whereas the bulk of PMEL luminal domain (black arrows) is associated with the ILVs (D), the PMEL cytoplasmic domain (empty arrows) is detected at the limiting membrane of the endosome close to, or associated with the clathrin coat (C) and occasionally associated with the ILVs (D). Scale bar represents 200 nm.

(E–I) MNT-1 cells were treated with DMSO or 1  $\mu$ M DAPT for 4 hr.

(E) Cells were analyzed by IFM after labeling with HMB50 (red) and  $\alpha$ Pmel-C (green). Scale bar represents 10  $\mu$ m.

(F) Ultrathin cryosections were immunogold labeled with HMB50 (PAG 15, arrows) and  $\alpha$ Pmel-C (PAG10, arrowheads) and analyzed by IEM. After treatment with DAPT, note the  $\alpha$ Pmel-C labeling on endo-lysosomal structures and vesicles rather than at the limiting membrane of the PMEL luminal domain-positive compartment. Scale bar represents 200 nm.

(G) Cells were analyzed by conventional EM. Note the presence of the clathrin coats (black arrowheads) and MVEs (white arrow). Scale bar represents 200 nm.
(H) Ultrathin cryosections were immunogoid labeled for αPmel-C (PAG10 indicated by arrowheads). Note the presence of αPmel-C labeling at the limiting membrane of a clathrin coated MVE. Scale bar represents 200 nm.

(I) MNT-1 cells were treated for 24 hr with DMSO or 1 μM DAPT, and then lysed in buffer containing 1% Brij97. Lysates were immunoprecipitated with anti-MART-1 or anti-PMEL antibodies αPmel-C, HMB45, or HMB50, and immunoprecipitates or untreated lysate (Ext) were analyzed by immunoblot with an antiubiquitin antibody. Note the enrichment of ubiquitin signal in eluates from αPmel-C antibody immunoprecipitation after DAPT treatment.

correlated with an increased recruitment of Hrs (Figures 8C and 8D) and accumulation of the PMEL luminal domain in coated regions (Figure 2C). Together, these data suggest that both PMEL luminal domain and CTF are confined within Hrs enriched coats for ESCRT-dependent targeting to the endosomal degradative pathway in the absence of CD63.

To test whether PMEL was degraded in an ESCRT-dependent fashion upon CD63 depletion, we assessed the behavior of PMEL in cells depleted concomitantly for CD63 and the ESCRT-I subunit Tsg101. Whereas levels of detergent-soluble  $M\alpha$ ,  $M\beta$ ,

and CTF and of total or detergent-insoluble M $\alpha$ C were decreased in lysates of cells treated with CD63 siRNA alone (Figures 4B and 8E), they were partially or completely restored to control levels upon concomitant treatment with both siRNAs (Figure 8E). IEM analyses of cells treated with both siRNAs showed that most of the "rescued" PMEL lumenal and CTF domains accumulated at the limiting membrane of enlarged vacuolar compartments (Figure 8F). These data support the interpretation that in the absence of CD63, full-length PMEL becomes a substrate for ESCRT-dependent sorting and ultimate degradation.





#### Figure 7. PMEL Luminal Domain Is Targeted to Uncoated MVE in CD63-Depleted Cells

(A) Quantification of immunogold labeling for PMEL luminal domain (HMB50) in different compartments on ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated control or CD63#1 siRNA. Results are expressed as percentage (%  $\pm$  SD) of total immunogold labeling in each compartments.

(B) Left: MNT-1 cells treated with CD63#1 siRNA were analyzed by conventional EM. note the presence of MVEs (arrows) devoid of coats in the vicinity of coated vacuoles (arrowhead). Scale bar represents 200 nm. Right: ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with CD63#1 siRNA were immunogold labeled with HMB50 (PAG 10, arrows) and Hrs (PAG5, arrowheads) and analyzed by IEM. Note the HMB50 labeling on endo-lysosomal structures rather than in Hrs positive compartment. Scale bar represents 200 nm.

(C and D) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with CD63#1 siRNA were immunogold labeled for PMEL with  $\alpha$ Pmel-C (PAG 10) and HMB50 (PAG 5) antibodies (C) or with  $\alpha$ Pmel-C (PAG 10) and Hrs (PAG 5) antibodies (D) and analyzed by IEM. The labeling for both PMEL domains (arrows for  $\alpha$ Pmel-C and small arrowheads for HMB50) is detected in degradative MVEs. Scale bar represents 200 nm.

multiple MVE subpopulations fated for degradation, exosome secretion, or LRO biogenesis (Buschow et al., 2009; Hurley et al., 2010; Simons and Raposo, 2009).

CD63, unlike other TSPANs such as CD9 or CD81, localizes largely to late endosomes and lysosomes in different cell types (Pols and Klumperman, 2009). Our data and other published data (Källquist et al., 2008; Michaux and Cutler, 2004) show that CD63 in specialized cells is predominantly associated with LROs and their endosomal precursors, suggesting

a specific role in LRO formation and/or function as proposed (Pols and Klumperman, 2009). Consistently, whereas lysosomal defects are not detected in CD63 knockout mice (Schröder et al., 2009), these mice do harbor altered LROs, as shown here for melanosomes. Although our data indicate that CD63 functions in melanosomal cargo partitioning in MVEs, given its association also with mature melanosomes, we cannot exclude that it may also be involved at later stages of melanogenesis or melanosome transfer. Furthermore, among TSPANs, CD63 specifically interacts with LRO cargo partners, such as PMEL (shown here) and the neutrophil elastase in neutrophils (Källquist et al., 2008). Our data predict that other LRO cargoes will be similarly reliant on CD63 for their partitioning.

Although our previous studies showed that effective PMEL sorting to ILVs required the luminal domain (Theos et al., 2006b) and that within MVEs, the luminal domain and CTF were differentially enriched in ILVs and at the limiting membrane, respectively (Raposo et al., 2001), we only detected a physical interaction between CD63 and the PMEL CTF. We propose that this steady state interaction reflects a transient interaction between CD63 and full-length PMEL, or with M $\alpha$ -M $\beta$ 

#### DISCUSSION

In this study we show that the TSPAN CD63 is an essential effector of an ESCRT-independent MVE-generating mechanism that is ultimately required to initiate polymerization of PMEL lumenal domains into functional amyloid fibrils. This process reflects a balance between two sorting events operating on contiguous endosomal membranes—ESCRT-independent sorting to ILVs and ESCRT-dependent exclusion from these ILVs of distinct functional domains derived from the single cargo protein PMEL.

Our data highlight the requirement for the TSPAN CD63 but not for ceramide in ESCRT-independent ILV generation of MVEs and for the consequent sorting of PMEL by showing that (1) PMEL (luminal domain) localizes to CD63-containing ILVs even in ESCRT-I-depleted cells and that (2) ILV formation, PMEL sequestration, and downstream melanosome biogenesis are severely reduced in the absence of CD63 expression but not of sphingomyelinase expression or activity. This suggests that distinct ESCRT-independent mechanisms might coexist with the ESCRT machinery on MVEs in different cells, reflecting



Figure 8. PMEL Luminal Domain Is Degraded in an ESCRT-Dependent Manner in CD63-Depleted Cells

(A) Representative micrographs of coated endosomes. Arrows indicate the characteristic bilayered coats that are expanded upon CD63 inactivation. Scale bar represents 200 nm.

(B) Shown are the percentage (%  $\pm$  SD) of coated endosomes relative to the total number of MVEs (left) and the mean length of the coat (right) measured on 50 profiles from each condition. \*p < 0.01, p < 0.05.

(C) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with control (left) or CD63#1 siRNA (right) were double immunogold labeled for PMEL with  $\alpha$ Pmel-C (PAG 10) and for Hrs (PAG 5) and analyzed by IEM.

(D) For each condition described in c., the number of gold particles associated with  $\alpha$ Pmel-C and Hrs in coated areas on MVEs was quantified from 50 profiles. Data are presented as the mean  $\pm$  SD.

(E) Whole cell lysates of MNT-1 cells treated with control siRNA or CD63#1 siRNA alone or together with siRNA to Tsg101 were analyzed by western blot using antibodies to CD63, Tsg101, MART-1, β-tubulin, or anti-PMEL antibodies αPmel-C, HMB45, or αPmel-N. Relevant bands are indicated.

(F) Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with CD63 and Tsg101 siRNA were immunogold labeled with αPmel-C (PAG 10, arrowheads) and HMB50 (PAG5, arrows) and analyzed by IEM. Note that both labeling are broadly localized to the limiting membrane. Scale bar represents 200 nm.

complexes, on the limiting membrane of vacuolar endosomes. These data, together with the impact of CD63 depletion on PMEL sorting and downstream amyloidogenic processing, support a model in which the interaction of CD63 with the PMEL CTF stabilizes PMEL within endosomal domains that are rapidly targeted for ESCRT-independent ILV formation. This interaction is likely to be short-lived, with rapid proteolytic release of CTF from Ma and incorporation of Ma onto forming ILVs. This interpretation is consistent with the rapid proteolytic maturation of PMEL in post-Golgi compartments (Berson et al., 2003) and the steady-state enrichment of PMEL lumenal domains within endosomes on ILVs (Berson et al., 2001, 2003; Raposo et al., 2001). Alternatively, the CTF region and luminal domain of PMEL might independently contribute to ESCRTindependent/CD63-dependent ILV sorting. This model would be consistent with the concomitant detection of CD63 and both the lumenal and cytoplasmic domains of PMEL in ILVs in HeLa cells (Berson et al., 2001, 2003), and with the smaller ILV size and incomplete amyloidogenesis associated with a chimeric construct lacking the PMEL cytoplasmic domain (Theos et al., 2006b).

Remarkably, although the CTF appears to facilitate ESCRTindependent sorting by diverting PMEL from the ESCRT machinery, its own fate is to be degraded in an ESCRT-dependent manner. The association of the CTF with ubiguitylated proteins suggests that the CTF might be a passive passenger of the ESCRT pathway. Exactly how the CTF is sorted for degradation is not clear. It is possible that CTF accompanies PMEL luminal domains during invagination onto ILVs, and then becomes reexposed on the endosomal limiting membrane upon back fusion of the ILVs; a similar process has been proposed in other cell systems (Falguières et al., 2008; van Nispen tot Pannerden et al., 2010), and would be consistent with our electron tomography analyses of early melanosomes/MVEs (Hurbain et al., 2008). Alternatively, the CTF could be retained on the MVE membrane after PMEL cleavage and segregation from the luminal domain, which-perhaps by virtue of an affinity for ILV-enriched components-would associate with CD63dependent ILVs. Either mechanism would expose the isolated CTF, either directly or indirectly in association with an ubiquitylated partner, to ESCRT-containing clathrin coats on the MVE limiting membrane (Raposo et al., 2001; Theos et al., 2006b; Truschel et al., 2009). ESCRT-dependent sorting is likely to be tightly linked to cleavage of the CTF by the  $\gamma$ -secretase, which is required for CTF disposal (this study and Kummer et al., 2009). The reported localization and activity of  $\gamma$ -secretase to the limiting membrane of lysosomes (Pasternak et al., 2003) could reconcile both events. Confirmation of this hypothesis requires further investigations.

Our data have important implications for distinct fates of ILVs that are formed by different mechanisms. We show that whereas the CD63-dependent ILVs bearing PMEL luminal domains are ultimately destined for melanosomes, the CD63-independent, ESCRT-dependent vesicles bearing CTF are destined for degradation. The formation of ESCRT-independent ILVs and the sequestration of PMEL CTF in ESCRT-dependent clathrin coats on the cytosolic side of the same endosomal membrane suggest that distinct but concomitant sorting mechanisms are integrated within a single compartment (Buschow et al., 2009; Simons and

Raposo, 2009). We propose that a key role for the CD63dependent pathway is to protect cargoes from ESCRTdependent degradation. This is supported by the lack of effect of CD63 inactivation on ESCRT-dependent cargoes (EGFR) and by the confinement of ESCRT-independent cargoes (PMEL luminal domain) to clathrin and Hrs-positive coats for subsequent ESCRT-dependent degradation in absence of CD63 (Figure 2C and Figure 8). Whether degradative MVEs mature from clathrin-coated subdomains or are distinct compartments will require further study.

Finally, we show that the loss of ESCRT-independent PMEL sorting in CD63-depleted cells is accompanied by a decrease of PMEL amyloid formation. This is consistent with a model in which MVEs provide an environment conducive for the proteolytic processing and unfolding of amyloidogenic precursors, supported by our previous observations by high resolution by electron tomography (Hurbain et al., 2008) and studies by others (Kovács et al., 2007). The link between ILV formation, the TSPAN CD63 and the generation of physiological PMEL amyloid opens a new avenue for further understanding the mechanisms underlying the formation of amyloid in pathological models.

#### **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

# Cell Culture, Drug and EGF Treatment, Transfection, and siRNA Depletion

Human melanocytic MNT-1 cells and HeLa cells were maintained as previously described (Berson et al., 2001; Raposo et al., 2001). Cells were treated for 24 hr with 1  $\mu$ M DAPT (Sigma), 2.5  $\mu$ M GW4869 (Sigma), or a cocktail of lysosomal proteases inhibitors Leupeptin, Ca-074Me, and pepstatin A (10  $\mu$ g/ml) (Sigma). For EGF pulse chase, cells were starved for 4 hr in serum free cell culture medium and pulsed with EGF-biotin at 50 ng/ml (Invitrogen) for 30 min at 37°C. Cells were then washed and chased at 37°C with serum free cell culture medium. HeLa cells were transfected with plasmid constructs using Lipofect-amine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations and cells were collected and analyzed 48 hr after transfection. MNT-1 cells were transduced with siRNA duplex oligonucleotides (listed in the Supplemental Experimental Procedures) as reported (Theos et al., 2006b). Cells were subjected to one round of siRNA transduction and processed at day 3.

#### Western Blot

MNT-1 cells at 80% confluency were washed in cold PBS and lysed on ice in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, pH 7.2, 10 mM N-ethylmaleimide [Sigma]), 5 mM oxidized glutathione (Calbiochem), and protease inhibitor cocktail (Roche). Triton X-100 insoluble material was obtained as previously described (Berson et al., 2001). Lysates were incubated in sample buffer with or without 350 mM 2-mercapthethanol (Sigma), boiled for 5 min, and fractionated by SDS-PAGE using Nupage (3%-8%) Tris-acetate gels (Invitrogen) or Nupage (4%–12%) Bis-Tris gels (Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore). The membranes were blocked in PBS/0.1%Tween-20 (PBS/T) with 5% nonfat dried milk, incubated with indicated primary antibody (listed in the Supplemental Experimental Procedures) diluted in PBS/T, washed four times in blocking solution, and finally incubated with HRP-conjugated secondary antibody followed by washing in PBS/T. Blots were developed using the ECL Plus western blotting detection system (GE Healthcare) according to the manufacturer's instruction. Signal intensities were quantified with Image J software.

For immunoprecipitation and corresponding western blot, cells were lysed directly in lysis buffer (30 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.02% NaN<sub>3</sub>) containing 1% (w/v) Brij97 (Sigma) and proteases inhibitors. After 30 min at 4°C, insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 × g and cell lysate was precleared for 2 hr by addition of 1/1000 volume heat inactivated goat serum and 20  $\mu$ l protein G-Sepharose beads (Amersham Bioscience). Proteins were then immunoprecipitated by

adding 2  $\mu$ g specific antibody and 10  $\mu$ l protein G-Sepharose beads to 200– 400  $\mu$ l lysate. After 2 hr incubation at 4°C under constant agitation, beads were washed five times in lysis buffer containing 1% Brij97. The immunoprecipitates were fractionated by 5%–15% SDS-PAGE under nonreducing or reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience). Membranes were probed as described above, except for Biotinlabeled primary antibodies (anti-CD63; anti-CD81) where AlexaFluor 680streptavidin conjugates or Alexa Fluor 800-streptavidin conjugates (Invitrogen) were used for detection and blots were developed using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

#### Immunofluorescence Microscopy

Untreated, drug-treated, or transfected MNT-1 cells on coverslips were rinsed in PBS and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde/PBS at room temperature (RT). Fixed cells were washed in PBS and guenched 10 min in PBS/50 mM glycine, saturated in PBS containing 1 mg/ml BSA (blocking buffer), and permeabilized in PBS/0.05% saponin/1 mg/ml BSA (incubation buffer, IB). Cells were incubated 1 hr with the primary antibody (listed in the Supplemental Experimental Procedures) diluted in IB, washed three times in IB, and incubated with the corresponding secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies conjugated to Alexa 488 or Alexa 568 (Molecular Probes/ Invitrogen) diluted in IB for 45 min. Coverslips were washed three times with IB and then mounted in DABCO medium and examined on a Leica Microsystem (Nanterre, France) DM-RXA2 3D deconvolution microscope equipped with a piezo z-drive (Physik Instrument, Pantin, France) and a 100× 1.4 NA PL-APO objective lens. Images are maximum-intensity z projections of 3D image stacks (except Figure 6B, which shows a single deconvolved layer) acquired every 0.2 µm using Metamorph software (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA) and a Coolsnap HQ (Photometrics Coolsnap HQ) cooled CCD-camera.

#### **Electron Microscopy**

For conventional EM of MNT-1 cells, cells grown on coverslips were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 24 hr and processed for Epon embedding as described (Raposo et al., 2001). For EM analysis of RPE sections, tissues from two CD63<sup>-/-</sup> mice (aged 2 months) and two age-matched wild-type mice were fixed by perfusion of the mice with glutaral-dehyde (6% in PBS). Tissue blocks from the eyes were processed for Epon embedding and ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate as described (Lopes et al., 2007). For ultrathin cryosectioning and immunogold labeling, cells were fixed with 2% PFA or with a mixture of 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Cells were processed for ultracryomicrotomy and single or double immunogold labeled using PAG10 or PAG15 as reported (Raposo et al., 2001). All samples were analyzed using a FEI CM120 electron microscope (FEI Company), and digital acquisitions were made with a numeric camera (Keen View; Soft Imaging System, SIS, Germany).

#### **Image Analysis and Quantification**

Quantification of immunogold labeling on ultrathin cryosections was performed as described previously (Delevoye et al., 2009). Melanin content was performed as described (Wasmeier et al., 2006). The relative distribution of PMEL luminal and CD63 in MNT-1 cells was evaluated by direct EM analysis of randomly selected cell profiles from two distinct grids. More than 1500 gold particles for each condition were counted and assigned to the compartment over which they were located. For quantification of distinct compartments in siRNA-treated cells and controls, each of the compartments was defined by its morphology and by correlation with immunogold labeling for different organelle-markers (EEA1 and Hrs for early endosomes, TGN46 for the TGN, LAMP-1 for late endosomes/lysosomes) and internalized endocytic tracers (BSA-gold and Tf-FITC for endosomes of different maturation stage) as previously described (Raposo et al., 2001). MVBs or MVEs were defined as compartments delimited by a membrane with numerous internal vesicles; coated MVEs have few internal vesicles and an electron dense coat on at least one face of the limiting membrane. Electron-dense compartments with no or few internal membranes were classified as lysosomes. Melanosome stages were defined by morphology (Raposo et al., 2001; Seiji et al., 1963). Quantification of PMEL luminal domain distribution in MVEs of MNT-1 cells was performed on single immunogold labeled cryosections by counting the number of gold particles on the limiting membrane and on ILVs. Labeling was considered to be associated with the limiting membrane when the gold particle was within 20 nm of the limiting membrane and with no cross-sectioned ILVs in the direct vicinity. Results are presented as a percentage of the total number of gold particles on ILVs in each compartment and represent a mean and standard deviation of three independent experiments. Quantification of average diameter of MVEs and the length of clathrin coat was determined using the iTEM software (Soft Imaging System).

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at doi:10.1016/ j.devcel.2011.08.019.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D. Tenza, I. Hurbain, C. Delevoye, S. Held, B. Watt, and R. Lüllmann-Rauch for technical help, insightful discussions during the course of this work, and critical reading of the manuscript. We are grateful to V. Fraisier and L. Sengmanivong (Nikon Imaging Center, PITC-IBISA Imaging Facility, Institut Curie) for assistance with deconvolution microscopy. This work was supported by Institut Curie, CNRS, Agence National de la Recherche, Fondation pour la Recherche Medicale, and Association pour la Recherche sur le Cancer (to G.R.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft GRK1459 (to P.S.), and NIH grant R01 AR048155 (to M.S.M.).

Received: December 21, 2010 Revised: June 10, 2011 Accepted: August 23, 2011 Published online: September 29, 2011

#### REFERENCES

Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. Mol. Biol. Cell *12*, 3451–3464.

Berson, J.F., Theos, A.C., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. J. Cell Biol. *161*, 521–533.

Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J., Raposo, G., Wubbolts, R., et al. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. Traffic *10*, 1528–1542.

Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. Biochem. J. *420*, 133–154.

de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. Blood *102*, 4336–4344.

De Mazière, A.M., Muehlethaler, K., van Donselaar, E., Salvi, S., Davoust, J., Cerottini, J.C., Lévy, F., Slot, J.W., and Rimoldi, D. (2002). The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. Traffic 3, 678–693.

Delevoye, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J.B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W.J., Verkleij, A.J., Salamero, J., Marks, M.S., and Raposo, G. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. J. Cell Biol. *187*, 247–264.

Falguières, T., Luyet, P.P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.C., and Gruenberg, J. (2008). In vitro budding of intralumenal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. Mol. Biol. Cell *19*, 4942–4955.

Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2007). Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. PLoS Biol. 5, e158. Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. PLoS Biol. *4*, e6.

Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 317–323.

Harper, D.C., Theos, A.C., Herman, K.E., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2008). Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only golgiprocessed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. J. Biol. Chem. 283, 2307–2322.

Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. J. Biol. Chem. *280*, 14006–14016.

Hoashi, T., Muller, J., Vieira, W.D., Rouzaud, F., Kikuchi, K., Tamaki, K., and Hearing, V.J. (2006). The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. J. Biol. Chem. *281*, 21198–21208.

Hurbain, I., Geerts, W.J., Boudier, T., Marco, S., Verkleij, A.J., Marks, M.S., and Raposo, G. (2008). Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 19726–19731.

Hurley, J.H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 4–11.

Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A., and Różycki, B. (2010). Membrane budding. Cell 143, 875–887.

Källquist, L., Hansson, M., Persson, A.M., Janssen, H., Calafat, J., Tapper, H., and Olsson, I. (2008). The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. Blood *112*, 3444–3454.

Kovács, G.G., Gelpi, E., Ströbel, T., Ricken, G., Nyengaard, J.R., Bernheimer, H., and Budka, H. (2007). Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *66*, 628–636.

Kummer, M.P., Maruyama, H., Huelsmann, C., Baches, S., Weggen, S., and Koo, E.H. (2009). Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase. J. Biol. Chem. *284*, 2296–2306.

Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W.D., Ferrans, V.J., Muller, J., Appella, E., and Hearing, V.J. (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*, 10698–10703.

Lévy, F., Muehlethaler, K., Salvi, S., Peitrequin, A.L., Lindholm, C.K., Cerottini, J.C., and Rimoldi, D. (2005). Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. Mol. Biol. Cell *16*, 1777–1787.

Lopes, V.S., Wasmeier, C., Seabra, M.C., and Futter, C.E. (2007). Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. Mol. Biol. Cell *18*, 3914–3927.

Michaux, G., and Cutler, D.F. (2004). How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. Traffic 5, 69–78.

Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lyso-somal membrane. J. Biol. Chem. *278*, 26687–26694.

Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. Exp. Cell Res. *315*, 1584–1592.

Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. Nature *458*, 445–452.

Raiborg, C., Wesche, J., Malerød, L., and Stenmark, H. (2006). Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. J. Cell Sci. *119*, 2414–2424.

Raiborg, C., Malerød, L., Pedersen, N.M., and Stenmark, H. (2008). Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. Exp. Cell Res. *314*, 801–813.

Raposo, G., and Marks, M.S. (2007). Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 786-797.

Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. J. Cell Biol. *152*, 809–824.

Raposo, G., Marks, M.S., and Cutler, D.F. (2007). Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 394–401.

Sachse, M., Urbé, S., Oorschot, V., Strous, G.J., and Klumperman, J. (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. Mol. Biol. Cell *13*, 1313–1328.

Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schröder, B., Bleich, M., and Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. Mol. Cell. Biol. *29*, 1083–1094.

Seiji, M., Shimao, K., Birbeck, M.S., and Fitzpatrick, T.B. (1963). Subcellular localization of melanin biosynthesis. Ann. N Y Acad. Sci. *100*, 497–533.

Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 575–581.

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. Traffic 10, 925–937.

Theos, A.C., Truschel, S.T., Raposo, G., and Marks, M.S. (2005). The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. Pigment Cell Res. *18*, 322–336.

Theos, A.C., Berson, J.F., Theos, S.C., Herman, K.E., Harper, D.C., Tenza, D., Sviderskaya, E.V., Lamoreux, M.L., Bennett, D.C., Raposo, G., and Marks, M.S. (2006a). Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. Mol. Biol. Cell *17*, 3598– 3612.

Theos, A.C., Truschel, S.T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D.C., Berson, J.F., Thomas, P.C., Raposo, G., and Marks, M.S. (2006b). A lumenal domaindependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. Dev. Cell *10*, 343–354.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. Science *319*, 1244–1247.

Truschel, S.T., Simoes, S., Setty, S.R., Harper, D.C., Tenza, D., Thomas, P.C., Herman, K.E., Sackett, S.D., Cowan, D.C., Theos, A.C., et al. (2009). ESCRT-I function is required for Tyrp1 transport from early endosomes to the melanosome limiting membrane. Traffic *10*, 1318–1336.

van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. J. Biochem. *140*, 13–21.

van Nispen tot Pannerden, H.E., Geerts, W.J., Kleijmeer, M.J., and Heijnen, H.F. (2010). Spatial organization of the transforming MHC class II compartment. Biol. Cell *102*, 581–591.

Vidal, M., Mangeat, P., and Hoekstra, D. (1997). Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. J. Cell Sci. *110*, 1867–1877.

Wasmeier, C., Romao, M., Plowright, L., Bennett, D.C., Raposo, G., and Seabra, M.C. (2006). Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. J. Cell Biol. *175*, 271–281.

Watt, B., van Niel, G., Fowler, D.M., Hurbain, I., Luk, K.C., Stayrook, S.E., Lemmon, M.A., Raposo, G., Shorter, J., Kelly, J.W., and Marks, M.S. (2009). N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils. J. Biol. Chem. 284, 35543–35555.

### Developmental Cell, Volume 21

# **Supplemental Information**

# The Tetraspanin CD63 Regulates

## **ESCRT-Independent and -Dependent**

# **Endosomal Sorting during Melanogenesis**

Guillaume van Niel, Stéphanie Charrin, Sabrina Simoes, Maryse Romao, Leila Rochin, Paul Saftig, Michael S. Marks, Eric Rubinstein, and Graça Raposo

### Inventory of Supplemental Information

Supplemental Figures and associated Legends

Figure S1: related to Figure 1

Figure S2: related to Figure 3

Figure S3: related to Figure 5

Figure S4: related to Figure 6

Figure S5: related to Figures 7 and 8

Supplemental Experimental Procedures

Antibodies list

siRNA sequence


## Figure S1, related to Figure 1. Localization of CD63 and association with ESCRT-independent ILVs in MNT-1 cells and role of ceramides in early melanogenesis.

**A-B.** MNT-1 cells were analyzed by IFM using antibodies to either the TSPAN CD81 (red) and PMEL (HMB50, green; A) or to the TSPAN CD63 (red) and LAMP-1 (green) **B**). Shown are the individual labels, a merged image, and a 3X magnification of the merged image. Note the lack of overlap for these proteins in melanocytic cells. C-D. Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with Tsg101 siRNA (C) were double immunogold labeled for PMEL luminal domain (HMB45, PAG 10) and CD63 (PAG 5). Note that MVEs (asterisk) are still formed (C) and that PMEL (arrowheads) and CD63 (arrows) are both present in internal membranes of these MVEs (D). Scale bar, 200 nm. E. Left panel: MNT-1 cells were treated with DMSO (-) or the sphingomyelinase inhibitor GW4869 (+) for 24 hrs, and whole cell lysates were analyzed by western blot using anti-MART-1, the anti-PMEL antibodies  $\alpha$ Pmel-C or HMB45, or anti- $\beta$ -tubulin antibody as a loading control. Relevant bands are indicated. **Right panel**: MNT-1 cells treated with GW4869 as above were analyzed by conventional EM. MVEs with ILVs and premelanosomes with characteristic fibrils (arrows) are apparent. Scale bar, 1 µm. **F. Left panel**: MNT-1 cells were treated with control siRNA or siRNA to neutral sphingomyelinase (si Nsmase), and whole cell lysates were analyzed by western blot using anti-MART-1, anti-Nsmase,  $\alpha$ Pmel-C, HMB45 or anti-β-tubulin antibody as a loading control. **Right panel**: MNT-1 cells treated with si Nsmase were analyzed by conventional EM. MVEs and characteristic Stage II premelanosomes with intraluminal fibrils (arrows) are apparent. Scale bar, 1 μm.

See Figure 6 for corresponding western blot of Tsg101 depletion.



Figure S2, related to Figure 3. Depletion of the TSPAN CD81 has no effect on PMEL maturation and Depletion of CD63 does not affect the distribution of melanosomal enzymes and melanin synthesis.

**A.** Whole cell lysates of MNT-1 cells that were treated with control siRNA or CD81 siRNA were analyzed by western blot with anti-CD81 antibody. **B.** MNT-1 cells treated with the CD81 siRNA were analyzed by IFM after labeling for CD81 and PMEL (HMB45). Whereas depletion of CD63 results in a loss of HMB45 labeling (**Figure 3**), depletion of CD81 does not affect the labeling of PMEL with the HMB45 antibody, suggesting that processing of PMEL and accumulation of fibrils are not affected by the loss of CD81. **C.** MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA were analyzed by IFM using antibodies to the TSPAN CD63 (red) and TYRP1

(green). Shown are the individual labels, bright field, a merged immunofluorescence image, and a 3X magnification of the merged image. **D**. Melanin content (+/- SD) of MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA was quantified as described (Wasmeier et al., 2006).



# Figure S3, related to Figure 5. Accumulation of CTF upon inhibition of $\gamma$ -secretase activity.

MNT-1 cells were treated with increasing concentrations of the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT for 24h, and then whole cell lysates were analyzed by western blot using  $\alpha$ Pmel-C or anti- $\beta$ -tubulin antibody as a loading control. Relevant bands and positions of molecular weight markers are indicated. Note that at high DAPT concentrations, a second band appears with a Mr ~18 kDa, corresponding either to an alternatively processed form of M $\beta$  or to an intermediate in the processing of M $\beta$ .



Figure S4, related to Figure 6. Lysosomal fate of the CTF of PMEL.

**A**. MNT-1 cells treated with control, CD63, Tsg101 or CD63 and Tsg101 siRNA were analyzed by IFM after DAPT treatment using antibodies to either the cytoplasmic domain of PMEL (red) and LAMP-1 (green). Shown are a merged image, the individual labels, and a 3X magnification of the merged image. Note the lack of overlap for these proteins in cells depleted for Tsg101 and for both Tsg101 and CD63. **B**. Whole cell lysates of MNT-1 cells treated with control or CD63 siRNA#1 and with or without a cocktail of lysosomal proteases inhibitors (PIs: Leupeptin, Ca-

074Me and pepstatin A) for 24h, were analyzed by western blot using  $\alpha$ Pmel-C antibody. Relevant bands and positions of molecular weight markers are indicated. Note that CTF accumulates after drug treatment in control and CD63 depleted cells.



Figure S5, related to Figure 7 and 8. Fate of PMEL and EGFR in cells depleted of CD63.

**A.**Ultrathin cryosections of MNT-1 cells treated with CD63#1 siRNA were immunogold labeled for PMEL with HMB50 (PAG 15) antibodies and analyzed by IEM. The labeling for the PMEL luminal domain is detected in enlarged lysosomal structures (arrows). Scale bar, 200 nm. **B.** MNT-1 cells treated with control or CD63#1 siRNA were analyzed by conventional EM. For each condition the coated area on MVEs was measured on 50 profiles. Data are presented as mean +/- SD. **C. Top panel**: Whole cell lysates of HeLa cells that were treated with control siRNA or

CD63 siRNA were analyzed by western blot with anti-CD63 antibody. **Bottom panel**: HeLa cells that were treated with control siRNA or CD63 siRNA were pulsed for 30 min with 50 ng/ml of EGF and chased for the indicated time. Whole cell lysates were analyzed by western blot with anti-EGFR antibody (note two different exposures of the same gel to emphasize the content of EGFR at different time periods) or with anti- $\beta$ -tubulin antibody as a control. **D.** HeLa cells treated with control or CD63 siRNA, pulsed with EGF and chased for 30 min were analyzed by IEM after labeling for EGF. Note that EGF is present on ILVs of MVEs in both controls and CD63-depleted cells.

#### Supplemental Experimental Procedures

#### Antibodies

Monoclonal antibodies and their sources were as follows. Mouse monoclonal antibodies TA99 to TYRP1 (ab3312; used for IFM), HMB45 to PMEL (ab787), M2-7C10 to MART-1 (ab3168), and anti-neutral sphingomyelinase (ab55711), rabbit polyclonal anti-β-tubulin (ab6046), and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat polyclonal antibodies to rabbit IgG (ab6721) and to mouse IgG (ab6789) were from Abcam. Mouse anti-CD63 used for IEM was from Zymed/Invitrogen. Mouse monoclonal antibody P4D1 to ubiquitin (sc-8017) and rabbit polyclonal anti-Tyrp1 (sc-25543; used for western blotting) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Mouse monoclonal antibodies H4A3 to human LAMP-1 from BD Biosciences, HMB50 to PMEL from Neomarkers (Fremont, Ca), and 4A10 to Tsg101 from GeneTex were used as described. Polyclonal sheep anti-EGF receptor was from Interchim. Affinitypurified anti-peptide antibodies recognizing the PMEL N-terminus (aPmel-N) (Berson et al 2003), C-terminus (aPmel-C) (Raposo et al., 2001) and PKD domain (I51 - a kind gift of P. Cresswell, N. Vigneron, and R. M. Leonhardt, Yale Univ., New Haven, CT) (Watt et al., 2009) were described previously. Mouse monoclonal antibodies to CD81, CD55, CD9 and CD63 used for immunoblotting, immunoprecipitation and IFM were described previously (Abache et al., 2007). Antibody to Hrs was a kind gift of Dr S. Urbe (Univ. of Liverpool). Secondary goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to Alexa Fluor-488- or 555- or 647 were from Invitrogen. Protein A conjugated to 10 or 15 nm gold particles (PAG10, PAG15) were from Cell Microscopy Center (AZU, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands).

#### siRNA sequences

The sense strands for the indicated double stranded siRNAs (21-mers) were synthesized with the following sequences or derived from the following references. siRNA CD63 #1: 5'- GTT CTT GCT CTA CGT CCT C -3'; siRNA CD63 #2: 5'- CAG ATG GAG AAT TAC CCG AAA -3' (Hs\_CD63\_6\_HP siRNA from QIAGEN); siRNA CD81: 5'- GCA CCA AGT GCA TCA AGT A -3'; siRNA neutral sphingomyelinase: 5'- CCG CAT TGA CTA CGT GCT TTA -3' (Hs\_SMPD2\_5\_HP from QIAGEN); siRNA non-targeting control: 5'- AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT -3'. (from QIAGEN) siRNA Tsg101: 5'- GGA GGU CAG AAG AGA GCA G -3' (from Garrus et al Cell 2001). Full length PMEL WT cDNA has been described in (Theos et al., 2006b).

### RESUME

Dans l'épiderme, les mélanocytes participent à la protection de la peau contre les rayons ionisants du soleil en synthétisant un pigment, la mélanine, dans des compartiments apparentés aux lysosomes appelés melanosomes. La mélanogenèse est un processus séquentiel initié par la production de fibres amyloïdes dont la composante principale est la protéine PMEL. Ces fibres séquestrent la mélanine et permettent l'élimination d'intermédiaires toxiques produits lors de sa synthèse. La mélanogenèse et le phénotype pigmenté sont affectés lorsque le processus de formation des fibres est altéré. Les fibres résultent du clivage de PMEL dans les endosomes précurseurs des mélanosomes mais les protéases impliquées dans ce processus restent peu ou pas caractérisées. Afin de mieux comprendre les mécanismes de formation des fibres amyloïdes dérivées de PMEL, j'ai étudié le rôle de deux protéases : les bêta-sécrétases BACE1 et BACE2. En combinant des techniques de biochimie, d'immunocytochimie et d'imagerie photonique et électronique, j'ai montré que la perte de l'expression de Bace2 in vivo (souris KO BACE2) ou sa déplétion (siRNA) dans une lignée de mélanocytes inhibent le clivage amyloïdogénique de PMEL et affectent à la fois la formation de fibres de PMEL dans les mélanosomes et la pigmentation. J'ai pu notamment reproduire in vitro le clivage spécifique de PMEL en utilisant une forme recombinante de BACE2. En parallèle, j'ai également étudié le rôle de BACE1 dans la mélanogenèse. Mes résultats indiquent que BACE1, bien que n'étant pas impliquée dans le clivage de PMEL, régulerait la maturation des mélanosomes précoces in vivo et in cellulo, en modulant les contacts entre mélanosomes et réticulum endoplasmique (RE). Dans les mélanocytes, BACE1 est présente dans le RE et interagit avec des protéines impliquées dans les contacts RE-endosomes. Ces contacts seraient cruciaux pour le transfert de molécules nécessaires à la maturation des mélanosomes. L'ensemble de ces résultats démontre un rôle pour chacune des bêta-sécrétases dans le processus de mélanogenèse, levant le voile sur des processus clés liés à la biogenèse des mélanosomes. Par ailleurs, les fibres de PMEL constituant le modèle le plus abouti de l'amyloïdogenèse physiologique chez les mammifères, ces études pourraient à plus long terme aider à la compréhension de la formation des fibres amyloïdes pathologiques; notamment dans la maladie d'Alzheimer où l'amyloïdogenèse d'APP est très similaire à celle de PMEL.