



*Université de Montréal*

**La petite GTPase Rab11 et ses interacteurs orchestrent la  
migration cellulaire collective et la cytokinèse chez la Drosophile**

*par*

*Carl Laflamme*

*Programme de biologie moléculaire*

*Faculté de médecine*

*Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Docteur*

*en biologie moléculaire*

*option biologie des systèmes*

*15 Mai 2015*

*© Carl Laflamme, 2015*

## Résumé

Le trafic vésiculaire permet un échange coordonné de molécules entre les différents organites de la cellule et dépend largement des petites GTPases de la famille des Rabs dont le nombre varie entre 27 chez la Drosophile et 70 chez l'Homme. Un des prochains défis consiste donc à élucider les mécanismes cellulaires qui coordonnent l'activité de ces Rabs, laquelle garantit un transport vésiculaire ordonné au sein de la cellule. Les Rabs agissent comme des interrupteurs moléculaires grâce à leur capacité à cycler entre un état actif et inactif. L'activité des Rabs est contrôlée par des protéines régulatrices puis des effecteurs en aval coordonnent leurs différentes fonctions. La petite GTPase Rab11 est essentielle au développement de plusieurs organismes incluant la Drosophile, *C. elegans* et la souris puisqu'elle se retrouve au cœur de différentes voies de transport. D'ailleurs, le trafic de molécules dépendant de Rab11 est perturbé dans plusieurs pathologies. Malgré son rôle central dans le trafic vésiculaire, la régulation de Rab11 reste peu comprise *in vivo*. Cette thèse se penche sur les mécanismes moléculaires contrôlant les fonctions de Rab11 et de ses effecteurs lors de la migration cellulaire collective et lors de la cytokinèse.

Nous avons identifié Evi5 comme un nouvel acteur clé de la migration cellulaire collective, et nous montrons qu'elle possède une activité Rab11-GAP essentielle pour maintenir les récepteurs de guidance actifs de façon polarisée au front de migration. Nous avons ensuite déterminé que Rab11 régule la communication cellulaire lors de la migration collective par l'entremise de son interaction avec la Moésine. Une question reste toutefois en suspens : sachant que Rab11 compte plus de 13 effecteurs, quels sont les mécanismes assurant la spécificité de l'interaction entre cette GTPase et un effecteur particulier? Une partie de la réponse provient peut-être de nos observations que les membres des Rab11-FIPs de classe I, une famille d'effecteurs de Rab11, interagissent avec les protéines d'échafaudage 14-3-3. Chez la Drosophile, Rip11 est le seul représentant des Rab11-FIPs de classe I et nous montrons que Rip11 aurait des fonctions inattendues durant la cytokinèse qui seraient coordonnées par 14-3-3. Nos recherches permettent de dresser un portrait plus authentique des mécanismes moléculaires régulant les différentes fonctions de Rab11 et de ses effecteurs *in vivo*.

**Mots-clés** : Trafic vésiculaire, Petites GTPases, Rab, Migration cellulaire, Cytocinèse, Rab11, 14-3-3, Rip11, Evi5

## Abstract

Vesicle trafficking allows coordinated exchange of molecules between the cell organelles and depends largely on small GTPases of the Rab family which contains 27 members in *Drosophila* and 70 in Human. One challenge is to identify the cellular mechanisms which coordinate Rab activity to ensure ordered vesicle transport within the cell. Rab proteins act like molecular switch by cycling between an active and an inactive state. Rab activity is regulated by helper proteins, whereas downstream effector proteins coordinate the Rab functions. The small GTPase Rab11 is crucial for *Drosophila*, *C. elegans* and mouse development since Rab11 is at the heart of different transport routes. Thus, Rab11-dependent trafficking of molecules is perturbed in different pathologies. Despite its central role during vesicle trafficking, the regulation of Rab11 *in vivo* is poorly characterized. This thesis focus on the molecular mechanisms controlling the function of Rab11 and its effectors during collective cell migration and cytokinesis.

We identify Evi5 as a novel key regulator of collective cell migration and we show that Evi5 has Rab11-GAP activity essential for maintaining active guidance receptors at the leading edge. We then show that Rab11 regulates cell communication during collective cell movement through its interaction with Moesin. A question still remained unanswered: knowing that Rab11 has more than 13 effectors, which mechanisms assure the specificity of interaction between this small GTPase and a particular effector? Part of the answer might come from our observation that class I Rab11-FIPs, known Rab11 effectors, are able to bind to the 14-3-3 scaffolding proteins. In *Drosophila*, Rip11 is the sole member of the class I Rab11-FIPs and we show that Rip11 has unexpected functions during cytokinesis which are coordinated by 14-3-3. Our research allows us to better understand the molecular mechanisms regulating Rab11 and its effectors *in vivo*.

**Keywords** : Vesicular trafficking, Small GTPases, Rab, Cell migration, Cytokinesis, Rab11, 14-3-3, Rip11, Evi5

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux ( <i>table</i> ).....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xix
But et plan de la thèse.....	xx
CHAPITRE 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1. Trafic vésiculaire intracellulaire.....	3
1.1.1. Endocytose et exocytose.....	3
1.1.2. Les petites GTPases servent d'interrupteur moléculaire lors du trafic vésiculaire	5
1.1.2.1. Les régulateurs de l'activité des Rabs.....	6
Cascade des Rabs.....	8
1.1.2.2. Présentation de différentes techniques expérimentales pour étudier les petites GTPases et le trafic vésiculaire.....	9
1.1.3. De l'assemblage des vésicules jusqu'à leur fusion.....	11
1.1.3.1. Manteau protéique des vésicules.....	11
1.1.3.2. La famille des Arfs contrôle l'assemblage du manteau protéique.....	11

1.1.3.3.	Les phosphatidylinositols identifient certains organites et certains domaines membranaires.....	12
1.1.3.4.	La dynamine régule le bourgeonnement des vésicules.....	12
1.1.3.5.	Implication des Rabs depuis le bourgeonnement des vésicules jusqu'à leur fusion à la membrane cible du compartiment receveur .....	12
1.1.3.6.	Le complexe SNARE promeut la fusion membranaire .....	15
1.2.	Présentation de la petite GTPase Rab11 .....	16
1.2.1.	Régulation de Rab11 par les GAPs.....	17
1.2.2.	Régulation de Rab11 par la Rab-GEF Crag.....	18
1.2.3.	Effecteurs de Rab11 .....	18
1.2.3.1.	Famille des interacteurs protéiques de Rab11 ou Rab11-FIPs .....	18
1.2.3.2.	Protéines ERM .....	20
1.2.3.3.	PI4KIII $\beta$ /Fwd.....	20
1.2.3.4.	GOLPH3 .....	21
1.2.3.5.	Sec15.....	21
1.2.3.6.	Protrudine.....	21
1.2.3.7.	Myosine V.....	22
1.2.3.8.	Rabin8 .....	22
1.2.3.9.	Rab11BP/Rabphilin-11 .....	22
1.2.4.	Maladies reliées à des défauts d'expression de Rab11 .....	23
1.3.	Processus cellulaires impliquant Rab11.....	23
1.3.1.	La migration collective : la Drosophile montre la voie .....	24
1.3.1.1.	Résumé.....	25
1.3.1.2.	Introduction.....	26

La migration collective .....	26
1.3.1.3. Le modèle des cellules de bordure.....	27
1.3.1.4. La régulation .....	28
Les RTK.....	28
Rac et le cytosquelette .....	29
L'endocytose.....	31
1.3.1.5. Conclusion .....	33
1.3.1.6. Remerciements.....	34
1.3.1.7. Légendes des figures:.....	35
1.3.2. Rôle des endosomes lors de la cytokinèse tardive .....	39
1.3.2.1. Premières évidences de l'importance du trafic vésiculaire lors de la cytokinèse.....	39
1.3.2.2. Endosome de recyclage, Rab11 et les Rab11-FIPs.....	40
Endosome de recyclage.....	40
Rôle de Rab11 et de Nuf lors de la cellularisation de l'embryon de Drosophile.....	41
Rab11 et FIP3 lors de la cytokinèse de cellules en culture .....	42
Le complexe du centralspindlin serait impliqué lors du trafic vésiculaire .....	43
Relation entre Rab11 et le PtdIns4P lors de la cytokinèse des spermatocytes.....	43
FIPs de classe I.....	44
1.3.2.3. Rab35 et le PtdIns(4,5) $P_2$ .....	45
1.3.3. Division asymétrique des SOPs .....	48
1.3.4. Trafic de la E-cadhérine lors de la polarité épithéliale .....	48
1.3.4.1. Rôle de FIP2 indépendant de Rab11 lors de l'établissement de la polarité dans les cellules MDCK.....	49



La phosphorylation de FIP2 et FIP5 est essentielle à leur fonction.....	49
1.3.4.2. Rab11 lors de la polarité épithéliale chez la Drosophile.....	49
1.4. Présentation des protéines 14-3-3 .....	50
1.4.1. Structure des protéines 14-3-3 .....	50
1.4.2. Mode de reconnaissance des cibles protéiques par 14-3-3 .....	51
1.4.2.1. Mécanismes d'action des protéines 14-3-3.....	51
1.4.3. Rôles de 14-3-3 dans la cytokinèse.....	51
1.4.4. Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans le trafic vésiculaire .....	52
1.5. Questions et objectifs de recherche.....	53
CHAPITRE 2.....	55
2. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements.....	56
2.1. Contribution des coauteurs .....	57
2.2. Abstract.....	58
2.3. Introduction.....	59
2.4. Results.....	60
2.5. Discussion.....	66
2.6. Materials and methods .....	68
2.7. Acknowledgements.....	72
2.8. Contributions.....	73
2.9. Figure legends.....	74
CHAPITRE 3 .....	91
3. Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity .....	92
3.1. Contribution des coauteurs .....	93

3.2.	Abstract.....	94
3.3.	Introduction.....	95
3.4.	Results.....	97
	Analysis of potential Rab-GAP proteins during BC migration .....	97
	Evi5 is recruited to the recycling endosome by the active form of Rab11 .....	98
	Evi5 interacts with- and inactivates Rab11.....	98
	<i>Evi5</i> genetically interacts with <i>Rab11</i> during BC migration .....	99
	Evi5 acts as a Rab11-GAP during BC migration.....	100
	Orthologs of other Rab11-GAPs do not regulate Rab11 during BC migration.....	101
	Evi5 is essential to restrict locally the RTKs activity at the leading edge of BCs.....	102
3.6.	Materials and methods .....	103
3.7.	Acknowledgements.....	106
3.8.	Abbreviation list.....	107
3.9.	Figure legends.....	108
CHAPITRE 4.....		123
4.	<i>Drosophila</i> and mammalian proteomic analysis of the 14-3-3 interactome reveals a functional interplay with Rip11/Rab11-FIP5 during cytokinesis.....	124
4.1.	Contribution des coauteurs .....	125
4.2.	Abstract.....	126
4.3.	Introduction.....	127
4.4.	Results.....	130
	A Proteomic Strategy for Characterizing the Phospho-Dependent 14-3-3 interactome. 130	
	Rip11 and Rab11-FIP5 are conserved 14-3-3 binding proteins.....	131
	Rip11 residues T391 and S405 within the RBD are required for 14-3-3 binding .....	131

Rip11 polarized distribution during <i>Drosophila</i> S2 cells cytokinesis is dependent on T391 and S405 residues .....	133
Rip11 is essential for late cytokinesis.....	135
Rip11 function during cytokinesis requires 14-3-3 binding .....	135
Rab35 and Pavarotti distribution during late telophase are dependent on Rip11 trafficking .....	136
4.5. Discussion.....	139
4.6. Material and methods.....	142
4.7. Figure legends.....	149
CHAPITRE 5 .....	167
5. Discussion.....	168
5.1. Identification de nouveaux interacteurs (régulateurs) de Rab11 .....	168
5.1.1. Identification des partenaires protéiques de Rab11 par spectrométrie de masse	
168	
5.1.1.1. Rab11 et la Moésine.....	169
5.1.1.2. La phosphorylation des effecteurs de Rab11 permettrait de coordonner le trafic vésiculaire.....	170
Par-1 pourrait phosphoryler Rip11 .....	171
5.1.2. Identification d'Evi5 comme la GAP de Rab11 par crible ARNi <i>in vivo</i> .....	171
5.1.2.1. Choix des BCs pour effectuer un crible <i>in vivo</i> des Rab-GAPs .....	172
5.1.2.2. Mesurer l'activité <i>in vivo</i> d'une GAP .....	172
Application de l'algorithme de segmentation des vésicules .....	173
5.1.2.3. Identification d'Evi5 comme interagissant avec Rab11, Rab6 et Rab14 par Gillingham et al.....	173
5.1.2.4. Régulation post-traductionnelle d'Evi5 .....	174

5.2.	Importance de Rab11 lors de la migration collective .....	174
5.3.	Rôle d'Evi5 lors de la migration chez les vertébrés .....	175
5.4.	Rip11 et 14-3-3 lors de la cytokinèse.....	176
5.4.1.	14-3-3 interagit spécifiquement avec les FIPs de classe I .....	176
5.4.2.	L'interaction entre Rip11 et 14-3-3 serait une liaison stable .....	177
5.4.3.	Mécanismes d'action de 14-3-3 .....	177
5.4.4.	Rip11 régulerait la distribution du PtdIns(4,5) $P_2$ .....	178
5.4.5.	La protéine Rip11 serait présente sur des vésicules distinctes des vésicules Rab11/FIP3(Nuf) .....	179
5.4.6.	Modèle de travail proposé.....	180
5.4.7.	Difficultés rencontrées lors de la caractérisation de Rip11 <i>in vivo</i> .....	181
5.5.	Conclusion, Impact et Perspective .....	183
	Bibliographie.....	184
	Annexe I.....	i
6.	In Vitro and In Vivo Characterization of the Rab11-GAP Activity of Drosophila Evi5 ...	ii
	Abstract.....	iii
	Introduction.....	iv
	Material.....	vi
	Methods.....	vii
	Notes .....	x
	Acknowledgements.....	xi
	Figure legends.....	xii
	Annexe II .....	xvii
7.	Figures supplémentaires du chapitre 4.....	xviii

7.1. Légendes des figures : ..... xix

## Liste des tableaux (*table*)

Table 1.I : Protéines FIPs humaines et leurs orthologues chez la Drosophile .....	18
Table 1.II : Glossaire de la cytocinèse.....	39
Table 1.III : Sommaire des protéines régulant la distribution de Rab11 et leur localisation subcellulaire, leur fonction cellulaire et le taux de bi ou multinucléation associé à leur perte de fonction sont indiqués. ....	45
Table 2.I : Table showing proteins related to vesicular trafficking or cytoskeleton regulation, identified by GST-pull down followed by mass spectrometry as interacting specifically with GTP-loaded (Rab11::GTP) or with GDP-loaded Rab11 (Rab11::GDP).....	90
Table 3.I : M.I. and C.I. resulting from knockdown of every potential Rab-GAP protein during BC migration.....	112
Table 5.I : Protéines identifiées par spectrométrie de masse suivant l'exécution de deux <i>GST pull down</i> de Rab11 indépendants. L'affinité d'un partenaire protéique pour Rab11::GDP ou Rab11::GTP est indiquée. Si l'interacteur a été identifié dans chacune des deux colonnes, ce partenaire n'est donc pas spécifique pour un état de Rab11 particulier et se retrouve dans le groupe « aucune préférence ». Le nombre de chiffres dans la colonne « #peptide » indique si cette protéine a été retrouvée lors d'une ou lors des deux expériences.....	169
Table 5.II : Description des deux lignées de Drosophile arborant un allèle de <i>Rip11</i> .....	181
Table 7.I : Identified Rip11-interacting-protein by immunoprecipitation. Numbers indicate the number of ms/ms spectrum observed for each identified proteins. ....	xxiv

*Note : Le mot « table » au lieu de « tableau » a été utilisé afin d'automatiser la numérotation.*

## Liste des figures

Figure 1.1 : Illustration des voies d'endocytose et d'exocytose et du cheminement de divers cargos.....	4
Figure 1.2 : Représentation schématique du cycle des Rabs.....	8
Figure 1.3 : Illustration du rôle de certaines Rabs lors du trafic vésiculaire. Rab11, qui fait l'objet de cette thèse, est illustré en rouge.....	14
Figure 1.4 Différents exemples de migration collective dans la Drosophile.....	36
Figure 1.5 : Polarité de l'activité de Rac et des RTK actifs dans les BC.....	37
Figure 1.6 : Rôle et régulation de l'endocytose dans la migration des BC.....	38
Figure 1.7 : Synthèse et représentation schématique du rôle des endosomes Rab11/FIP3(+) et Rab35(+) chez les cellules humaines et de Drosophile. Les vésicules Rab11(+) enrichies en PtdIns(4)P quittent le Golgi et délivrent leur contenu au sillon de clivage. Le PtdIns(4)P est utilisé pour synthétiser du PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> par une PtdIns4P5-kinase. Le PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> est un acteur majeur de la cytokinèse. En fin de cytokinèse, les vésicules FIP3(+) acheminent p50RhoGAP et Scamp, deux protéines essentielles pour la dépolymérisation des filaments d'actine au pont intercellulaire. Les vésicules Rab35(+) sont essentielles pour acheminer OCRL, une PtdIns5P-phosphatase, aussi au pont intercellulaire. OCRL est nécessaire pour hydrolyser le PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> en fin de cytokinèse. L'hydrolyse du PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> et la dépolymérisation des filaments d'actine sont nécessaires pour les étapes d'abscission subséquentes.....	48
Figure 2.1: Rab proteins regulate actin dynamics and Rac activity and polarization.....	80
Figure 2.2: Local activation of Rac does not rescue Rab11 loss-of-function phenotype .....	81
Figure 2.3: Local inactivation of Rac reveals a role in cell-cell communication for Rab11 ....	82
Figure 2.4: Rab11 interacts with and controls Moesin activity .....	83
Figure 2.5: Moesin regulates protrusion distribution, polarization of Rac activity and cell-cell communication.....	84

Figure 2.6 (Supp.1): Rab5SN expression alters pTyr polarity but not epithelial polarity .....	85
Figure 2.7 (Supp.2): Evaluation of protrusions distribution .....	86
Figure 2.8 (Supp.3): Determination of Front and Back area for FRET measurements .....	87
Figure 2.9 (Supp.4): <i>Moesin</i> acts downstream of Rab11 .....	88
Figure 2.10 (supp.5): Moesin-TD rescues dispersion of protrusions induced by Rab11SN expression .....	89
Figure 3.1 : Rescue experiments demonstrate that CG11727 requires its GAP activity <i>in vivo</i> .....	115
Figure 3.2 : Evi5 acts as a Rab11-GAP <i>in vitro</i> .....	116
Figure 3.3 : <i>Evi5</i> genetically interacts with <i>Rab11</i> .....	117
Figure 3.4 : Evi5 regulates Rab11 during BC migration .....	118
Figure 3.5 : Evi5 is necessary to properly localize active RTKs at the leading edge of BCs.	119
Figure 3.6 (Supp.1) : Analysis of GFP-Sec15 compartments volume.....	120
Figure 3.7 (Supp.2) : Analysis of the distribution of GFP-Rip11 after modulating Rab11 activity.....	121
Figure 3.8 (Supp.3) : GapcenA and Tbc1d15-17 are not involved in BC migration.....	122
Figure 4.1 : A Proteomic Strategy to Characterize the Phospho-14-3-3 interactome .....	155
Figure 4.2 : Rip11 and FIP5 are conserved class1 14-3-3 binding proteins.....	156
Figure 4.3 : Residues T391 and S405 in the RBD of Rip11 are required for 14-3-3 interaction but not for Rab11 binding.....	157
Figure 4.4 : Rip11 display a polarized distribution toward the cleavage furrow during cytokinesis that depends on T391 and S405 residues.....	159
Figure 4.5 : Rip11 is required for late cytokinesis in S2 cells .....	161
Figure 4.6 : Rip11 binding to both Rab11 and 14-3-3 is required for completion of cytokinesis .....	162



Figure 4.7 : Rab35 and Pavarotti are distributed through Rip11 trafficking .....	164
Figure 4.8 (Supp.1) : Cytokinetic regulators which are distributed in a non Rip11-dependent manner during <i>Drosophila</i> S2 cells cytokinesis .....	166
Figure 5.1 : Alignement de séquence entre les RBD de Rip11 et Nuf chez la Drosophile. Les résidus T <sup>391</sup> et S <sup>405</sup> impliqués dans la liaison entre Rip11 et 14-3-3 sont indiqués d'un carré rouge, alors que le résidu Y <sup>380</sup> impliqué dans la liaison à Rab11 est indiqué d'un carré vert. Un site potentiel de liaison à la Chc est surligné en rouge. ....	177
Figure 5.2 : Rôles proposés du complexe Rip11/14-3-3 lors de la cytokinèse .....	180
Figure 6.1 : Scheme of the Rab regulatory cycle.....	xiv
Figure 6.2 : Schematic representation and examples of results of the effector pull down assay .....	xv
Figure 6.3 : Schematic representation and examples of results of the <i>in vivo</i> Rab11 assay ....	xvi
Figure 7.1 : 14-3-3 does not modulate the RBD aptitude to dimerize.....	xxi
Figure 7.2 : Rip11 binds Rab35 and the Rab35/Rip11 interaction is modulated by 14-3-3 binding .....	xxii
Figure 7.3 : Transmembrane protein Scamp is distributed at the <i>midbody</i> through Rip11 trafficking and could restrict PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> domain during cytokinesis .....	xxiii

## Liste des abréviations

Arf	<i>ADP-ribosylation factors</i>
ARL	<i>Arf-like</i>
ARNi	ARN interférent
BCR	Récepteur des cellules B
Bru	Brunelleschi
CA	Constitutif actif
CCN	Cellules de la crête neuronales
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Chc	Chaîne lourde de la Clathrine
COPI	<i>Cytosolic coatomer complex I</i>
COPII	<i>Cytosolic coatomer complex II</i>
DENN	<i>Differentially expressed normal versus neoplastic</i>
DN	Dominant-négatif
E-cad	E-cadhérine
EE	Endosome précoce
ER	Réticulum endoplasmique
ERM	Ezrine, Radixine et Moesine
GAP	Protéine activatrice de GTPase
GDF	Facteur de déplacement de la GDI
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GEF	Protéine d'échange GDP-GTP
GLUT4	Transporteur de glucose 4
GOLPH3	<i>Golgi phosphoprotein 3</i>
GSV	Vésicules d'entreposage intracellulaire
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
FERM	4.1, Ezrine, Radixine, Moesine
FIP	<i>Family interacting protein</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
Fwd	<i>Four wheel drive</i>
KIF	Famille des kinésines

LE	Endosome tardif
MyoBv	Protéine moteur d'actine myosine Vb
NB	Neuroblastomes
Nuf	Nuclear fall out
PIP	Phospho-inositides
PtdIn	Phosphatidylinositol
RBD	Domaine de liaison à Rab11
RE	Endosome de recyclage
Rip11	<i>Rab11-interacting protein</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SNARE	<i>Soluble NSF[N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein receptors</i>
SOP	Cellule précurseur des organes sensoriels
SP	Sclérose en plaque
Sqh	<i>Spaghetti squash</i>
TBC	Tre2-Bub2-Cdc16
TfR	Récepteur de la transferrine
TGN	Réseau <i>trans</i> -golgien
t-SNARE	SNARES associés à la membrane cible
v-SNARE	SNARES associés aux vésicules

*À mes amoureuses*

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de thèse Gregory de m'avoir fait confiance et de m'avoir épaulé selon un équilibre idéal entre liberté et encadrement. Cet équilibre m'a permis de me développer sur le plan scientifique. Tu sais que j'aime collaborer et tu m'as laissé le faire sur chacun de mes projets. J'ai adoré mes années passées au lab, les projets sont stimulants et excitants et je garde une soif insatiable de faire de la science. Tu as été un mentor exceptionnel pendant toutes ces années. Merci!

Merci à tous mes collègues de laboratoire, Susanne, Sarah, Catherine, Carole, Carlos, Arturo, Xavier, Cédric, Desmond, Damien... J'aimerais remercier spécialement Gloria et Khaled avec qui j'ai développé une belle amitié tout au long de ces années. J'aimerais remercier Jonas Dorn, Jacob Galan, Philippe Roux, Sébastien Carreno et Khaled Ben El Kadhi avec qui j'ai collaboré ces dernières années et qui ont partagé leurs expertises avec moi. J'aimerais aussi remercier les chercheurs qui ont siégé à un moment ou à un autre sur mon comité de thèse: Jean-Claude Labbé, Patrick Laprise, Peter McPherson, Audrey Claing et Gilles Hickson.

Merci à Christian Charbonneau pour ta patience et ton aide précieuse.

Merci aux Fonds de Recherche en Santé du Québec et aux Instituts de Recherche en Santé du Canada pour votre soutien financier.

L'IRIC est un endroit unique formé de chercheurs passionnés où la science est toujours poussée à ses limites. Je me considère chanceux d'avoir fait mon doctorat dans un tel milieu foisonnant d'idées et talents.

Mes derniers remerciements vont à Alexia qui enrichit ma vie depuis que l'on s'est rencontré au baccalauréat en biochimie. Tu me pousses constamment à me surpasser, à réaliser des projets et à relever toutes sortes de défis. Tu m'as entre autres appris qu'une vie éclatée et épanouie passe par l'action. Maintenant que nos thèses sont terminées, j'ai hâte de voir les nouveaux projets que tu me proposeras!

## But et plan de la thèse

La petite GTPase Rab11, par sa participation au ciblage d'une multitude de cargos à la membrane plasmique, est un acteur majeur de la signalisation cellulaire. Le but de cette thèse est d'identifier et de comprendre comment les interacteurs directs de Rab11 coordonnent le trafic de cargos *in vivo* dans des processus biologiques très variés.

Le chapitre d'**introduction** présente d'abord le concept du trafic vésiculaire et ses principaux régulateurs avec un intérêt particulier pour la petite GTPase Rab11 et ses effecteurs. Les divers rôles du trafic vésiculaire et les fonctions de Rab11 lors de la migration cellulaire collective et lors de la cytokinèse seront présentés. La migration cellulaire collective est présentée par l'entremise d'une revue dont je suis coauteur parue en 2012 dans le journal *Médecine Sciences Amériques* (Ramel, Laflamme et al. 2012). Le **chapitre 2** présente l'identification de Rab11 comme régulateur de la communication cellulaire lors de la migration cellulaire collective et dévoile une nouvelle interaction entre Rab11 et la Moésine. Cet article, dont je suis le troisième auteur, a été publié dans le journal *Nature Cell Biology* en 2013 (Ramel, Wang et al. 2013). Le **chapitre 3** expose l'identification de la protéine activatrice de l'activité GTPase de Rab11, Evi5, lors de la migration cellulaire collective. Cette étude, dont je suis le premier auteur, a été publiée en 2012 dans le *Journal of Cell Biology* (Laflamme, Assaker et al. 2012). Le **chapitre 4** se concentre sur une nouvelle interaction entre un effecteur de Rab11, soit Rip11, et 14-3-3 lors de la cytokinèse. Cette étude, en préparation, sera soumise pour publication dans un avenir rapproché. Le **chapitre 5** propose une discussion sur nos résultats et présente une conclusion générale. L'**Annexe I** (chapitre 6) présente un chapitre du livre *Methods in Molecular Biology* dont le sujet de cette édition portait sur l'étude des Rabs. Ce chapitre décrit précisément les techniques que nous avons développées pour étudier Evi5 (Laflamme and Emery 2015). L'**Annexe II** (chapitre 7) expose trois figures et un tableau présentant des données préliminaires qui concernent le projet du chapitre 4.

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

# **1. Introduction**

Le chapitre 1 débute avec la présentation des concepts de base du trafic vésiculaire et se poursuit avec un regard particulier sur les GTPases de la famille des Rabs, régulateurs indispensables du trafic vésiculaire. L'introduction se concentre ensuite sur les fonctions de Rab11 et sur l'identité de ses régulateurs et de ses effecteurs. L'introduction se poursuit avec le rôle de Rab11 et de ses effecteurs lors de différents processus biologiques, dont la migration cellulaire et la cytokinèse, mais aussi lors de la polarité épithéliale et lors de la division cellulaire asymétrique. Ce chapitre termine avec la présentation des protéines 14-3-3.



## **1.1. Trafic vésiculaire intracellulaire**

Le cytoplasme des cellules eucaryotes est sous-divisé en plusieurs compartiments intracellulaires distincts, appelés organites, dont chacun possède leurs propres séries d'enzymes nécessaires à leur fonction spécialisée. Une différence notable avec les procaryotes est la présence de membranes lipidiques intracellulaires qui entourent ces organites. Ces membranes assurent l'intégrité de ces organites et en font des compartiments isolés. Le trafic vésiculaire (aussi appelé trafic membranaire) permet l'échange coordonné de lipides, de protéines et d'autres molécules entre ces différents organites par l'entremise de vésicules de transport. Les protéines et autres molécules solubles se retrouvent dans la lumière (à l'intérieur) de ces vésicules, alors que les protéines transmembranaires se situent dans la membrane qui entoure ces vésicules. Les molécules transportées par les vésicules de transport sont appelées cargos.

### **1.1.1. Endocytose et exocytose**

Le processus d'endocytose débute à la membrane plasmique avec l'internalisation, dans des vésicules de transport, de protéines transmembranaires ou des molécules solubles situées à l'extérieur de la cellule. Ces vésicules nouvellement créées vont être dirigées vers les endosomes précoces (EEs) (Gorvel, Chavrier et al. 1991) qui sont souvent comparés à des stations de tri. L'endosome tardif (LE) dérivé de la maturation des EEs (Dunn and Maxfield 1992) fusionne avec les lysosomes menant à la dégradation subséquente des cargos (Ward, Hackenjos et al. 1990). Depuis les EEs, les cargos peuvent suivre différentes voies de trafic vésiculaire afin d'être recyclés sans intermédiaire vers la membrane plasmique (van der Sluijs, Hull et al. 1992), ou plutôt d'être acheminés vers les endosomes de recyclage (RE) pour être lentement recyclés vers la membrane plasmique (Ullrich, Reinsch et al. 1996) (Figure 1.1).

La voie d'exocytose achemine généralement les protéines solubles et les protéines transmembranaires empaquetées dans des vésicules de transport depuis le réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi, puis du réseau *trans*-Golgien vers la membrane plasmique. Les protéines solubles seront ainsi sécrétées dans le milieu extracellulaire, alors que les protéines transmembranaires seront insérées à la membrane plasmique (Almers 1990).

Certaines vésicules fusionneront plutôt avec le RE (Lock and Stow 2005) ou le EE (Wood, Park et al. 1991) (Figure 1.1).

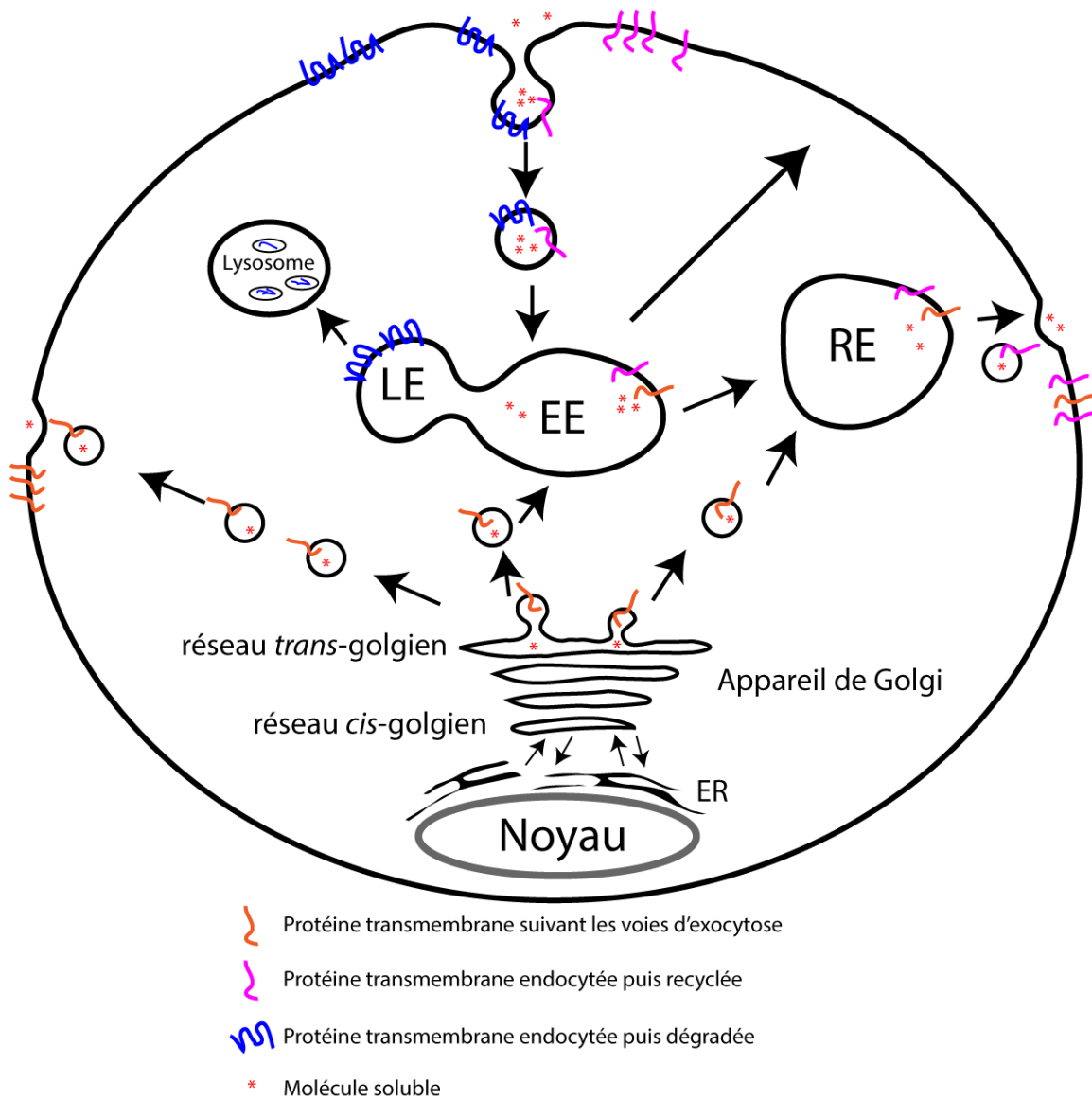


Figure 1.1 : Illustration des voies d'endocytose et d'exocytose et du cheminement de divers cargos.

### 1.1.2. Les petites GTPases servent d'interrupteur moléculaire lors du trafic vésiculaire

Les petites GTPases sont une large famille d'enzyme qui lient et hydrolysent la guanosine-5'-triphosphate (GTP) résultant en une guanosine-5'-diphosphate (GDP) et un phosphate (Gibbs, Sigal et al. 1984). Les GTPases ont deux domaines particuliers appelés *switch I* et *switch II* localisés près de la région de liaison aux nucléotides qui subissent des changements conformationnels dramatiques selon leur liaison au GDP ou GTP (Novick and Zerial 1997). Les petites GTPases alternent donc entre une forme liée au GDP, considérée comme inactive, et une forme liée au GTP, qui recrute des effecteurs et engendre ainsi une réponse cellulaire (Hughes 1983).

Puisque le GDP est généralement fermement attaché et que leur activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP est lente, les petites GTPases ont recours à des protéines régulatrices pour contrôler leur activité. Les protéines d'échange GDP-GTP (GEFs) catalysent la dissociation du GDP et activent donc les petites GTPases en favorisant leur liaison au GTP (Wolfman and Macara 1990), qui est présent en plus grande concentration dans la cellule que le GDP. Les petites GTPases activées s'ancrent généralement à la membrane par l'entremise de modifications lipidiques post-traductionnelles et recrutent leurs effecteurs. Les protéines activatrices de GTPases (GAPs) stimulent l'activité d'hydrolyse du GTP des GTPases (Adari, Lowy et al. 1988, Cales, Hancock et al. 1988), menant ces dernières à lier le GDP. Dans leur état inactif, les petites GTPases se retrouvent sous la forme soluble en complexe avec la protéine *GDP dissociation inhibitor* (GDI) qui masque leurs groupements lipidiques (Novick and Zerial 1997). Pour plusieurs petites GTPases, leurs fonctions dans la cellule sont intimement liées à leur capacité à cycler entre un état inactif et actif et sont ainsi comparées à des interrupteurs moléculaires de la cellule. Pour simplifier l'écriture, une GTPase liée au GTP ou au GDP sera représentée ::GTP (ex. Rab::GTP) ou ::GDP (Rab::GDP), respectivement.

Deux familles de petites GTPases participent à différentes étapes du trafic vésiculaires, soit les Rabs et les *ADP-ribosylation factors*, ou Arfs. Les protéines Rabs forment une famille d'environ 70 membres chez l'humain (Pereira-Leal and Seabra 2000, Colicelli 2004) et au moins 27 membres chez *Drosophila melanogaster* (appelé simplement Drosophile dans cette

thèse) dont 23 sont conservés chez les mammifères (Zhang, Schulze et al. 2007, Gillingham, Sinka et al. 2014). Les Rabs sont généralement associées à un organite et à une route de transport précise (Bhuin and Roy 2014) et régulent entre autres la spécificité du transport vésiculaire (Novick and Zerial 1997). De leur côté, la famille des Arfs inclut six Arfs, la protéine Sar1 et environ 20 autres protéines appelées *Arf-like* ou ARL. Les membres de la famille des Arfs régulent la formation des vésicules de transport (Gillingham and Munro 2007).

### 1.1.2.1. Les régulateurs de l'activité des Rabs

Les Rab-GAPs sont importantes pour limiter l'activité d'une Rab dans le temps et dans l'espace. Le domaine *Tre2-Bub2-Cdc16* (TBC) est présent au sein de 44 protéines chez l'humain (Bernards 2003) et démontre une activité Rab-GAP *in vitro*. Le domaine TBC emploie deux résidus catalytiques, soit une arginine et une glutamine, pour stabiliser l'état de transition et accélérer l'activité GTPase des Rabs (Pan, Eathiraj et al. 2006). Ce mécanisme d'action unique (par l'addition du résidu glutamine) du domaine TBC est appelé *dual-finger mechanism*. A ce jour, plus de la moitié des protéines encodant un domaine TBC ont un substrat (protéine Rab) identifié (Zhang, Walsh et al. 2005, Pan, Eathiraj et al. 2006, Dabbeek, Fatar et al. 2007, Fuchs, Haas et al. 2007, Yoshimura, Egerer et al. 2007, Chotard, Mishra et al. 2010, Hsu, Morohashi et al. 2010, Nottingham, Ganley et al. 2011, Davey, Humphrey et al. 2012, Longatti, Lamb et al. 2012, Nottingham, Pusapati et al. 2012, Tan, Ng et al. 2012). Un seul exemple d'une protéine ayant une activité Rab-GAP mais ne possédant pas de domaine TBC est le complexe Rab3GAP1/Rab3GAP2 qui comme son nom l'identifie, cible Rab3 (Fukui, Sasaki et al. 1997).

Contrairement aux Rab-GAPs dont un domaine clairement identifié agit sur la majorité des Rabs, plusieurs domaines différents démontrent une activité Rab-GEF *in vitro*. En effet, chez la levure, le complexe TRAPP comprenant 7 sous-unités (Jones, Newman et al. 2000), le duo Ric1p/Rgp1p (Pusapati, Luchetti et al. 2012) et Mon1p-Ccz1p (Nordmann, Cabrera et al. 2010) et la protéine sec2p (Dong, Medkova et al. 2007) possèdent différents domaines et exercent des activités Rab-GEF avec des mécanismes variés. Les protéines contenant des domaines VPS9 forment une large famille de Rab-GEF et ciblent plus de 7 Rabs différentes

(Horiuchi, Lippe et al. 1997, Delprato, Merithew et al. 2004, Delprato and Lambright 2007, Burgo, Sotirakis et al. 2009). Enfin, plusieurs protéines contenant un domaine DENN (*differentially expressed normal versus neoplastic*) ont démontré une activité Rab-GEF (Allaire, Marat et al. 2010, Yoshimura, Gerondopoulos et al. 2010, Wu, Bradley et al. 2011, Xiong, Bayat et al. 2012, Ioannou, Bell et al. 2015).

Les Rabs possèdent généralement deux cystéines en C-terminal qui sont sujettes à l'addition d'un groupement lipidique *geranylgeranyl* par une geranylgeranyltransférase (Khosravi-Far, Lutz et al. 1991, Seabra, Brown et al. 1992). Une *Rab escort protein* (REP) favorise l'interaction entre la Rab et la geranylgeranyltransférase (Andres, Seabra et al. 1993, Armstrong, Seabra et al. 1993). Cette queue lipidique est essentielle pour assurer l'ancrage des Rabs aux membranes. Dans leur état inactif, une GDI lie les Rabs, masque le groupement lipidique, et forme un complexe Rab::GDP-GDI soluble (Soldati, Riederer et al. 1993). Une protéine impliquée dans le déplacement de la GDI, appelée facteur de déplacement de la GDI (GDF), permet de libérer la Rab::GDP de l'emprise de la GDI et promeut la localisation de Rab::GDP sur les membranes (Figure 1.2). L'action de la GDF n'a été démontrée biochimiquement que pour Rab5 et Rab9 en complexe avec la GDI (Dirac-Svejstrup, Sumizawa et al. 1997).

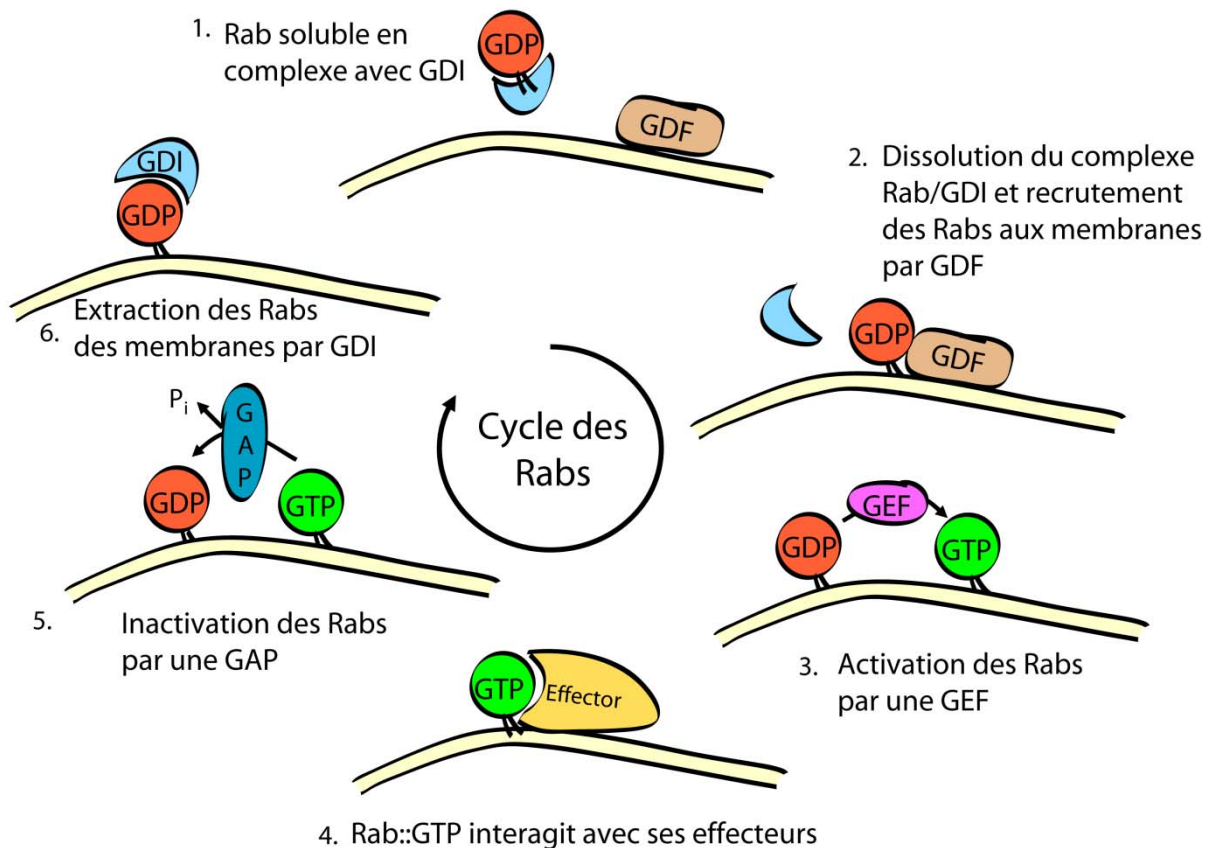


Figure 1.2 : Représentation schématique du cycle des Rabs.

### *Cascade des Rabs*

Le trafic de cargos vers leur destination finale peut nécessiter plusieurs différentes étapes de transport. La notion de « cascade de Rab » fait référence au recrutement par une Rab d'un régulateur d'une autre Rab pour l'étape suivante du trafic d'un cargo. Ce mécanisme d'action permet la coordination séquentielle de l'activité des Rabs. Par exemple, une Rab<sup>X</sup> en amont peut être inhibée par une GAP recrutée par une Rab<sup>Y</sup>::GTP en aval (Rivera-Molina and Novick 2009). Cette GAP est considérée comme un effecteur de la Rab<sup>Y</sup> puisqu'elle ne stimule pas son activité GTPase. Dans un même ordre d'idée, le recrutement de la GEF d'une Rab en aval peut être fait par une Rab::GTP en amont (Ortiz, Medkova et al. 2002).

### 1.1.2.2. Présentation de différentes techniques expérimentales pour étudier les petites GTPases et le trafic vésiculaire

Comme discuté à l'Annexe I, il est important de combiner des méthodes *in vitro* et *in vivo* afin de caractériser un régulateur d'une GTPase. Voici quelques exemples de techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de microscopie utilisées régulièrement pour étudier les petites GTPases ou le trafic vésiculaire. Plusieurs de ces techniques ont été utilisées lors de nos recherches.

Une percée importante concernant l'étude des GTPases a été le développement du *effector pull down assay* permettant de mesurer l'activité de ces GTPases. Initialement, le domaine de liaison à la petite GTPase Ras de la protéine Raf avait été purifié et utilisé pour précipiter Ras::GTP. La quantité de Ras::GTP peut ensuite être quantifiée par immunobuvardage de type *western blot* en utilisant un anticorps spécifique pour Ras (Taylor and Shalloway 1996, Franke, Akkerman et al. 1997). Cette technique peut ensuite être adaptée pour n'importe quelle petite GTPase, dont les Rabs (voir Annexe I pour le développement d'un *effector pull down assay* pour la petite GTPase Rab11).

Des essais biochimiques GAP ou GEF *in vitro* permettent de quantifier précisément le changement de liaison au GTP ou au GDP qui survient sur une GTPase d'intérêt en présence de la GAP ou de la GEF (Allaire, McPherson et al. 2015, Mishra and Lambright 2015). Ces essais font intervenir des nucléotides marqués de différentes façons (radioactivité, fluorescence).

La cinétique du mouvement d'un récepteur endocyté peut être suivie en marquant le ligand d'un récepteur de façon radioactive (Bucci, Parton et al. 1992) ou avec un fluorophore (Ullrich, Reinsch et al. 1996). L'incubation des cellules avec ce ligand, suivi de lavages, permet de suivre l'internalisation de ce ligand, minute par minute, dans les différents organites rencontrés. Un anticorps dirigé contre une protéine transmembranaire permet aussi de suivre l'internalisation de ce dernier (Emery, Hutterer et al. 2005). Un deuxième marquage permet d'identifier l'organite dans laquelle se trouve la protéine internalisée (Emery, Hutterer et al. 2005).

La construction de mutants de GTPase appelés dominant négatif (DN) ou constitutif actif (CA) permet d'étudier la perte de fonction ou le gain de fonction d'une GTPase, respectivement (Jones, Litt et al. 1995, Rybin, Ullrich et al. 1996). En effet, le mutant DN d'une GTPase donnée séquestre sa GEF et inhibe les interactions en aval avec ses effecteurs. De leur côté, les mutants CA ne peuvent généralement plus hydrolyser le GTP et lient donc constitutivement leurs effecteurs. L'expression d'un mutant CA séquestre les GAPs et les effecteurs spécifiques de la GTPase en question.

Récemment, grâce à l'avancée de la microscopie, il est possible de suivre en temps réel la dynamique de compartiments cellulaires *in vivo*. Il suffit d'exprimer dans les cellules des protéines de fusion des GTPases ou de leurs effecteurs avec une protéine fluorescente (Emery, Hutterer et al. 2005, Assaker, Ramel et al. 2010). Il est aussi possible de suivre l'activité des petites GTPases en construisant des sondes FRET (*Förster resonance energy transfer*) intramoléculaires. Le processus physique de FRET fait intervenir un fluorophore donneur qui, une fois excité, transfère son énergie à un fluorophore accepteur voisin. Le concept est le suivant, la sonde FRET consiste en un domaine de liaison d'un effecteur bien caractérisé fusionné à la petite GTPase d'intérêt. Une paire de fluorophores donneur-accepteur est présente sur cette sonde. Le changement de conformation suivant l'activation de la GTPase et sa liaison à son domaine de liaison présent sur la sonde rapproche les deux fluorophores afin de permettre l'échange d'énergie qui peut être détecté, par exemple, par microscopie. Une sonde FRET a été construite pour plusieurs membres des GTPases de la famille des Rho (dont Rac, voir chapitre 2) (Pertz and Hahn 2004, Pertz, Hodgson et al. 2006, Machacek, Hodgson et al. 2009, Wang, He et al. 2010) et pour Ras (Nishioka, Frohman et al. 2010). Une sonde FRET existe pour Rab5 (Kitano, Nakaya et al. 2008).

Différentes techniques sont possibles pour analyser le contenu protéique d'un endosome identifié par la présence d'une Rab. Suivant l'homogénéisation des cellules, l'isolation des endosomes peut se faire par centrifugation, par immuno-isolation ou par cytométrie en flux en utilisant un anticorps contre la Rab (ou un effecteur) en question. Le contenu en protéine de ces endosomes peut ensuite être déterminé, par exemple, par spectrométrie de masse (Eca Guimaraes de Araujo, Fialka et al. 2010, Schiel, Simon et al. 2012).



### **1.1.3. De l'assemblage des vésicules jusqu'à leur fusion**

Il est important de rappeler les nombreuses étapes du trafic vésiculaire afin de situer les Rabs dans ce processus cellulaire.

#### **1.1.3.1. Manteau protéique des vésicules**

La plupart des vésicules bourgeonnent d'un domaine spécialisé d'une membrane en s'entourant d'un manteau protéique. Ce manteau protéique sert premièrement à concentrer les protéines membranaires en une région spécialisée qui formera ensuite la membrane de la vésicule de transport. Deuxièmement, ce manteau moule la vésicule en devenir. En effet, les protéines du manteau forment généralement un treillis courbé ressemblant à un ballon de soccer (Brodsky 2012).

Il y a trois classes de manteau protéique, soit la *i*) clathrine (Pearse 1976), *ii*) COPI (*cytosolic coatomer complex I*) (Letourneur, Gaynor et al. 1994) et *iii*) COPII (*cytosolic coatomer complex II*) (Barlowe, Orci et al. 1994). Alors que les manteaux à base de COPI ou COPII interviennent plutôt dans le transport de vésicule du E.R. et entre les membranes du Golgi, les manteaux à base de clathrine se retrouvent généralement sur les vésicules émanant du TGN ou de la voie d'endocytose (Brodsky 2012).

#### **1.1.3.2. La famille des Arfs contrôle l'assemblage du manteau protéique**

Les Arfs régulent l'assemblage des manteaux à base de clathrine et de COPI (Donaldson, Kahn et al. 1991), alors que Sar1 régule plutôt l'assemblage des manteaux à base de COPII (Barlowe, Orci et al. 1994). Lorsqu'une vésicule est en développement sur une membrane, une Arf-GEF présente à la membrane active sa Arf cible. L'activation des Arfs permet à ces protéines de s'ancrer fermement à la membrane via une hélice amphipatique en N-terminal et de recruter les protéines du manteau via différents mécanismes cellulaires selon la Arf impliquée (Gillingham and Munro 2007).

### **1.1.3.3. Les phosphatidylinositols identifient certains organites et certains domaines membranaires**

La famille des phospholipides membranaires dérivés du phosphatidylinositol (PtdIn), appelée phospho-inositides (PIPs), accomplit plusieurs importantes fonctions cellulaires. Les PtdIns peuvent suivre des cycles rapides de phosphorylation et de déphosphorylation aux positions 3', 4' et 5' sur leur groupement inositol pour produire différentes classes de PIPs. La distribution de PIPs varie d'un organite à l'autre, et parfois même d'une région à l'autre sur une membrane continue. Les PIPs influencent le trafic vésiculaire en recrutant différentes protéines régulatrices du trafic vésiculaire qui possèdent des domaines de liaison à une classe de PIP particulière (Bohdanowicz and Grinstein 2013). Par exemple, dans la voie d'endocytose, les PIPs phosphorylés aux résidus 4' et 5' de leur groupement inositol, appelés  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ , recrutent des protéines accessoires essentielles au recrutement de la clathrine (Rohde, Wenzel et al. 2002).

### **1.1.3.4. La dynamine régule le bourgeonnement des vésicules**

Lorsque les vésicules à manteau de clathrine se forment sur la membrane, il y a recrutement de la protéine soluble à activité GTPase, la dynamine, qui s'assemble tel un anneau autour du cou de la vésicule en formation à l'aide de son domaine de liaison au  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  (Grinstein, Yelin et al. 2013). La dynamine promeut la fission de la membrane dont le mode d'action reste toujours à élucider. La vésicule détachée de la membrane perd rapidement son manteau de clathrine (Brodsky 2012).

### **1.1.3.5. Implication des Rabs depuis le bourgeonnement des vésicules jusqu'à leur fusion à la membrane cible du compartiment receveur**

Vu la diversité et l'omniprésence de membrane dans la cellule, les vésicules de transport doivent être très sélectives dans la reconnaissance de la membrane cible du compartiment receveur et cette sélectivité est assurée, entre autres, par les Rabs et leurs effecteurs.

Il est généralement admis que chacune des Rabs régule une route de transport précise (Bhuin and Roy 2014). Par exemple, la voie d'endocytose fait intervenir plusieurs Rabs

différentes. Rab5 est impliquée dans l'internalisation de cargos depuis la membrane plasmique et régule le transport de ces cargos jusqu'au EE (Gorvel, Chavrier et al. 1991, Bucci, Parton et al. 1992). De son côté, le remplacement de Rab5 par Rab7 est important pour la maturation du EE en LE (Rink, Ghigo et al. 2005, Poteryaev, Datta et al. 2010). Rab4 et Rab35 régulent le recyclage rapide de cargo depuis le EE jusqu'à la membrane plasmique (van der Sluijs, Hull et al. 1992, Marat and McPherson 2010). Pour sa part, Rab11 est localisée au RE et au TGN et régule le transport de vésicule du RE à la membrane plasmique, du TGN au RE ou du TGN à la membrane plasmique (Urbe, Huber et al. 1993, Ullrich, Reinsch et al. 1996, Casanova, Wang et al. 1999). Rab14 régule un compartiment endosomal impliqué dans le recyclage de cargo à la membrane plasmique, distinct du compartiment Rab11 (Linford, Yoshimura et al. 2012).

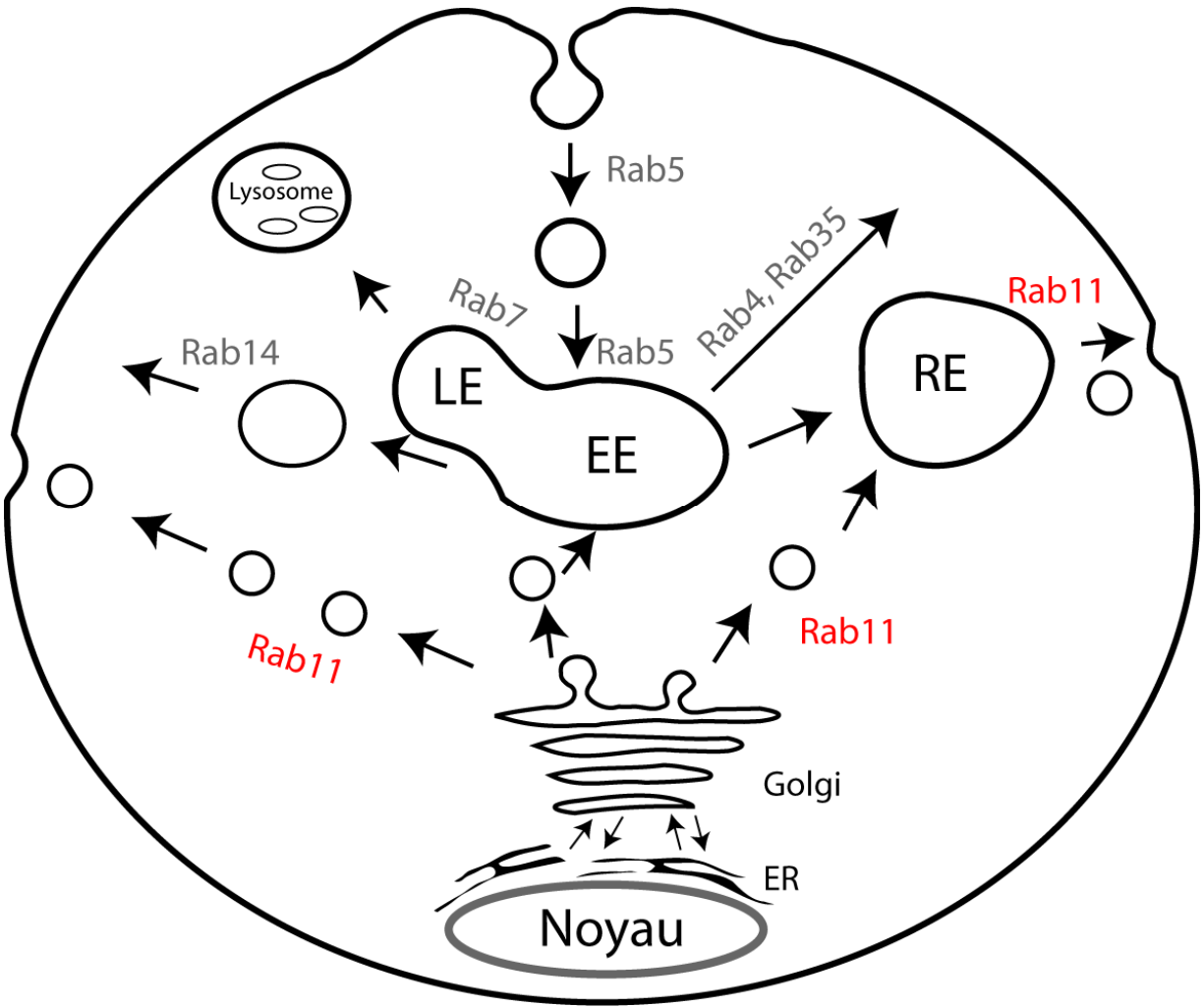


Figure 1.3 : Illustration du rôle de certaines Rabs lors du trafic vésiculaire. Rab11, qui fait l'objet de cette thèse, est illustré en rouge.

Les Rabs influencent et régulent plusieurs étapes du trafic vésiculaire selon le type d'effecteur que ces Rabs recrutent.

*i)* D'abord, des évidences montrent que les Rabs peuvent concentrer et séquestrer les cargos à la membrane du compartiment donneur avant l'invagination de la vésicule (Diaz and Pfeffer 1998, McLauchlan, Newell et al. 1998).

*ii)* Certains effecteurs des Rabs sont des moteurs moléculaires qui assurent le mouvement des vésicules sur le cytosquelette d'actine ou de microtubule jusqu'à la membrane cible. Dans d'autres cas, les effecteurs permettent de faire le pont entre une Rab et un moteur moléculaire (Lapierre, Kumar et al. 2001, Hales, Vaerman et al. 2002, Li, Satoh et al. 2007).

*iii)* D'autres effecteurs des Rabs sont des facteurs d'arrimage (*tethering factor*). L'arrimage des vésicules est défini comme la connexion initiale depuis un long trajet entre une vésicule de transport et la membrane cible (Cao, Ballew et al. 1998). Cette étape permet de capturer et stabiliser les vésicules avant leur fusion prochaine avec la membrane du compartiment receveur. Aussi, l'arrimage est impliqué dans la spécificité des routes à suivre, puisque les Rabs lient un facteur d'arrimage particulier sur la membrane cible. Les facteurs d'arrimage peuvent être divisés en deux catégories : les protéines avec de longs *coiled-coil* et les larges complexes multiprotéiques (*exocyste*) (Heider and Munson 2012).

*iv)* Il a été suggéré que les Rabs soient impliquées dans le processus de fusion des vésicules en interagissant directement ou indirectement avec le complexe SNARE (Sogaard, Tani et al. 1994).

#### **1.1.3.6. Le complexe SNARE promeut la fusion membranaire**

Lorsqu'une vésicule de transport est stabilisée sur la membrane cible, cette vésicule libère son contenu par fusion membranaire. Les protéines du complexe SNARE (*soluble NSF[N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein receptors*) catalysent les réactions de fusion entre les membranes en rapprochant les bicouches des membranes plasmiques et vésiculaires, telles des fermetures éclair. Les SNARES associées aux vésicules (v-SNARES) et les SNARES à la membrane cible (t-SNARES) forment un complexe appelé trans-SNARES qui permet la fusion finale entre la vésicule et la membrane de l'organite (Sollner, Bennett et al.

1993, Sollner, Whiteheart et al. 1993). Aussi, ces protéines apportent une couche supplémentaire de spécificité lors du transport vésiculaire en s'assurant que seules les vésicules ayant améri à la membrane cible appropriée puissent fusionner. Il y a au moins 35 protéines de ce complexe dans les cellules des mammifères, et toutes sont associées à un organite spécifique des voies d'exocytose ou d'endocytose (Sudhof and Rothman 2009).

## 1.2. Présentation de la petite GTPase Rab11

Le génome des mammifères code pour trois isoformes de Rab11 soient Rab11a, Rab11b et Rab11c (appelé communément Rab25) (Welz, Wellbourne-Wood et al. 2014). L'analyse de l'expression des gènes de Rab11 a permis de montrer que Rab11a est exprimé de façon ubiquitaire (Goldenring, Soroka et al. 1994), alors que Rab11b (Lai, Stubbs et al. 1994) et Rab11c (Goldenring, Shen et al. 1993) semblent être exprimés spécifiquement dans certains tissus. Chez la *Drosophile*, il y n'a qu'une seule isoforme de Rab11 (Sasamura, Kobayashi et al. 1997) et les allèles nuls de *rab11* sont létaux (Jankovics, Sinka et al. 2001).

Comme discuté auparavant, Rab11 est impliquée dans différentes routes de trafic vésiculaire selon sa distribution sous-cellulaire. Les premières analyses biochimiques sur des cellules en culture montrent que Rab11b se retrouve sur des membranes dérivées du TGN (Urbe, Huber et al. 1993). Ensuite, des analyses d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques pour Rab11a et pour Rab11c montrent que Rab11 est aussi enrichie aux zones apicales de cellules épithéliales en culture (Casanova, Wang et al. 1999). Des observations similaires au sein de tissus polarisés provenant de lapin confirment la localisation apicale de Rab11 (Goldenring, Smith et al. 1996). Par la suite, le raffinement de la microscopie a permis l'observation de Rab11 au RE péricentriolaire (aussi appelé RE péricentrosomal) (Ullrich, Reinsch et al. 1996), compartiment qui avait déjà été observé en 1984 (Yamashiro, Tycko et al. 1984). La localisation péricentriolaire de Rab11 est particulièrement évidente suivant la division asymétrique des cellules précurseurs des organes sensoriels chez la *Drosophile* (Emery, Hutterer et al. 2005).

Le récepteur de la transferrine (TfR) a été largement étudié et sert de sonde pour étudier l'activité de Rab11. En effet, le TfR est internalisé depuis la membrane plasmique et

parvient au EE pour être ensuite ciblé vers le RE. Il sera finalement recyclé de façon Rab11 dépendante vers la membrane plasmique. L'expression d'un mutant Rab11<sup>DN</sup> n'influence pas les premières étapes d'internalisation du TfR, mais plutôt le recyclage de ce récepteur depuis le RE vers la membrane plasmique (Ullrich, Reinsch et al. 1996).

Plus d'une trentaine de protéines transmembranaires et quelques protéines solubles ont été identifiées comme étant distribuées dépendamment de l'activité de Rab11 selon différents contextes cellulaires (Kelly, Horgan et al. 2012). Ces cargos sont impliqués dans des voies de signalisation très diverses et illustrent l'importance du trafic vésiculaire dépendant de Rab11 dans plusieurs contextes biologiques différents.

### **1.2.1. Régulation de Rab11 par les GAPs**

La découverte des domaines TBC a été une grande percée dans la compréhension de la régulation des Rabs. En 2009, lorsque nous avons commencé nos études sur l'identification de la GAP de Rab11, il existait déjà plusieurs divergences sur l'identité de cette GAP :

A) En 2007, trois articles ont été publiés sur la relation entre Evi5, une protéine ayant un domaine TBC et Rab11. Une première étude montre à l'aide d'essais GAP *in vitro* que l'activité GTPase de Rab11 est augmentée en présence d'Evi5 (Dabbekeh, Faitar et al. 2007) alors que deux autres groupes publient que Evi5, bien qu'il puisse lier Rab11, n'agit pas comme GAP de Rab11, selon des expériences similaires à l'étude précédente (Fuchs, Haas et al. 2007, Westlake, Junutula et al. 2007).

B) D'autres essais GAP *in vitro* montrent que les protéines aux domaines TBC GAPcenaA (Fuchs, Haas et al. 2007) et TBC1D15 (Zhang, Walsh et al. 2005) présentent des activités modérées Rab11-GAP.

C) Des études montrent que Evi5 aurait plutôt une activité GAP envers Rab35 (Fuchs, Haas et al. 2007), alors que Evi5-like, une protéine similaire à Evi5, aurait une activité GAP envers Rab23 (Yoshimura, Egerer et al. 2007).

## 1.2.2. Régulation de Rab11 par la Rab-GEF Crag

L'activité Rab11-GEF de la protéine Crag a été caractérisée *in vitro* et son mécanisme d'action *in vivo* a été élucidé dans l'œil de Drosophile. En effet, Crag est essentielle pour coordonner l'activité de Rab11 lors du trafic de la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Li, Satoh et al. 2007, Xiong, Bayat et al. 2012).

## 1.2.3. Effecteurs de Rab11

Les effecteurs de Rab11 ont des propriétés moléculaires diverses et leur interaction avec Rab11 coordonne certaines voies de transport.

### 1.2.3.1. Famille des interacteurs protéiques de Rab11 ou Rab11-FIPs

Les membres de la famille des interacteurs protéiques de Rab11, ou Rab11-FIPs (appelés simplement FIPs), possèdent un domaine de liaison à Rab11 (RBD), situé en C-terminal de ces protéines. Les structures cristallographiques des domaines RBD des FIPs de classe I et de classe II en interaction avec Rab11::GTP ont été élucidées. Les RBDs s'agencent en une hélice alpha *coiled-coil* centrale et forment une structure hétérotétramérique Rab11-(RBD)<sub>2</sub>-Rab11 (Jagoe, Lindsay et al. 2006, Shiba, Koga et al. 2006, Burke, Inglis et al. 2014). Les membres des FIPs sont séparés en deux classes selon leur domaine en N-terminal (*Table 1.I*).

Table 1.I : Protéines FIPs humaines et leurs orthologues chez la Drosophile

Humain	Drosophile	Classe
FIP1-A-B-C	Rip11	I
FIP2	Rip11	I
FIP5	Rip11	I
FIP3	Nuf	II
FIP4	Nuf	II

Chez l'humain, les membres des FIPs de classe I sont FIP1A, FIP1B, FIP1C, FIP2 et FIP5 (Prekeris, Klumperman et al. 2000, Prekeris, Davies et al. 2001). Chez la Drosophile,



Rip11 est la seule protéine FIP de classe I (Li, Satoh et al. 2007). Les FIPs de classe I possèdent un domaine C2 en N-terminal qui interagit directement avec les PtdIns(3,4,5) $P_3$  enrichies à la membrane plasmique (Prekeris, Klumperman et al. 2000, Lindsay and McCaffrey 2004). FIP2 interagit directement avec la séquence C-terminale de la protéine moteur d'actine myosine Vb (MyoVb) (Hales, Vaerman et al. 2002). Le complexe Rab11/FIP2/MyoVb suggère que FIP2 agisse comme protéine adaptatrice entre Rab11 et la MyoVb et puisse diriger ce complexe vers la membrane plasmique à l'aide de son domaine C2.

De leur côté, les membres des FIPs de classe II sont FIP3 et FIP4 et possèdent un domaine de liaison au Arf (Hickson, Matheson et al. 2003, Fielding, Schonteich et al. 2005), une région riche en proline et un motif de liaison au calcium (*EF-hand*) dont la fonction reste à déterminer (Wilson, Fielding et al. 2005). Chez la Drosophile, *Nuclear fallout* (Nuf) est la seule protéine FIP de classe II (Riggs, Rothwell et al. 2003). FIP3 interagit avec le complexe dynéine (Horgan, Hanscom et al. 2010), une protéine motrice qui se dirige vers l'extrémité « moins » des microtubules. Le complexe dynéine/FIP3/Rab11 permettrait de diriger les vésicules Rab11 en périphérie vers le RE péricentriolaire (Riggs, Rothwell et al. 2003, Emery, Hutterer et al. 2005).

La localisation des différentes FIPs par rapport à la localisation de chacune d'entre elles a été étudiée par microscopie en temps réel. Les FIPs signent des segments de route précis tout au long du trajet d'un même récepteur. Par exemple, le TfR rencontre dans les premières minutes de son internalisation des vésicules FIP1B, FIP2 et FIP5. Dans un deuxième temps, TfR est enrichi dans des vésicules FIP1C et FIP3. Il semble que dans un troisième temps, TfR retourne dans des compartiments FIP2 et FIP5 pour être finalement recyclé à la membrane plasmique (Baetz and Goldenring 2013).

Les FIPs sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires et leurs fonctions biologiques seront présentées dans les sections suivantes 1.3.2, 1.3.3 et 1.3.4. Quelques évidences tentent à démontrer que la fonction des Rab11-FIPs est étroitement liée à des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation. Les détails de ces observations seront donnés au point 1.3.4.1

### 1.2.3.2. Protéines ERM

Les protéines Ezrine, Radixine et Moesine (ERM) sont trois protéines hautement homologues de la famille des FERM (4.1, Ezrine, Radixine, Moesine) (Sato, Funayama et al. 1992) et ont la propriété de faire le pont entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. En effet, leur domaine FERM N-terminal lie le Ptdln(4,5) $P_2$  à la membrane plasmique (Niggli, Andreoli et al. 1995) et leur domaine de liaison à l'actine C-terminal lie le cytosquelette d'actine (Gary and Bretscher 1995). Les protéines ERM cyclent entre un état de conformation ouvert (protéines actives) ou fermé (protéines inactives) puisque le domaine FERM peut lier le domaine C-terminal d'une même molécule (Gary and Bretscher 1995). L'activation de ces protéines provient initialement de la liaison du domaine FERM au Ptdln(4,5) $P_2$  puis de la phosphorylation d'une thréonine conservée située sur le domaine de liaison à l'actine, permettant ensuite à ce domaine de lier l'actine (Nakamura, Amieva et al. 1995, Matsui, Maeda et al. 1998). Alternativement, les protéines ERM peuvent lier et stabiliser les microtubules (Solinet, Mahmud et al. 2013) et interagir avec des domaines PDZ d'autres protéines (Reczek, Berryman et al. 1997).

Nous avons identifié, chez la Drosophile, que la moésine interagit avec Rab11 et que cette interaction est nécessaire pour la communication cellulaire collective. Cette interaction fera l'objet du chapitre 2.

### 1.2.3.3. PI4KIII $\beta$ /Fwd

PI4KIII $\beta$ , ou *Four wheel drive* (Fwd) chez la Drosophile, est une Ptdln-4-kinase qui phosphoryle le Ptdln pour générer du Ptdln(4) $P$ . Il a d'abord été montré que PI4KIII $\beta$  et Rab11 interagissent lors d'analyses par double hybride en levure (de Graaf, Zwart et al. 2004). Cette interaction a été confirmée avec les protéines humaines et celles de Drosophile (Polevoy, Wei et al. 2009, Burke, Inglis et al. 2014). Les structures cristallographiques entre Rab11a et PI4KIII $\beta$ , et le complexe ternaire entre FIP3/Rab11a/PI4KIII $\beta$  ont été élucidés (Burke, Inglis et al. 2014). Ces structures proposent que la protéine PI4KIII $\beta$ , localisée sur les membranes du Golgi (de Graaf, Zwart et al. 2004), puisse d'abord recruter Rab11 au Golgi, qui à son tour recrute son effecteur FIP3 (Burke, Inglis et al. 2014). Le complexe Rab11/FIP3 pourrait ensuite promouvoir le trafic de vésicules depuis le Golgi.

#### **1.2.3.4. GOLPH3**

Récemment, une étude a montré que la protéine hautement conservée GOLPH3 (*Golgi phosphoprotein 3*) forme un complexe stable avec Rab11 et que l'interaction entre GOLPH3 et Rab11 est nécessaire pour la localisation de Rab11 au sillon de clivage lors de la cytokinèse des spermatocytes de *Drosophile* (Sechi, Colotti et al. 2014). GOLPH3 lie directement le Ptdln(4)*P* au Golgi via un domaine GPP34 peu caractérisé (Sechi, Colotti et al. 2014) et est essentiel au maintien de l'architecture du Golgi (Dippold, Ng et al. 2009).

#### **1.2.3.5. Sec15**

Le complexe protéique appelé *exocyste* impliqué dans l'arrimage des vésicules à la membrane du compartiment receveur est composé de plusieurs protéines, dont la sous-unité Sec15. Il a d'abord été démontré que Sec15 interagit avec la protéine de type Rab appelée Sec4 (liant le GTP) chez la levure et est impliquée dans la reconnaissance des vésicules Sec4 sur la membrane cible du compartiment receveur (Salminen and Novick 1989). Une interaction a ensuite été décrite chez la *Drosophile* et chez l'humain entre Sec15 et Rab11 et cette interaction a été montrée comme étant essentielle pour la capture de vésicules Rab11 sur les membranes des compartiments receveurs appropriés (Zhang, Ellis et al. 2004, Jafar-Nejad, Andrews et al. 2005, Wu, Mehta et al. 2005, Guichard, McGillivray et al. 2010).

#### **1.2.3.6. Protrudine**

Récemment, il a été montré que le transport des vésicules Rab11 vers l'extrémité « plus » des microtubules serait en partie contrôlé par la liaison de Rab11 à la protéine Protrudine (Matsuzaki, Shirane et al. 2011). Différents résultats suggèrent que la Protrudine serait une protéine adaptatrice et ferait le pont entre Rab11 et le membre de la famille des kinésines (KIF) 5a, Kif5a, famille de protéine motrice qui se dirige vers le l'extrémité « plus » des microtubules. En effet, une interaction directe entre la Protrudine et KIF5a (Matsuzaki, Shirane et al. 2011) et une interaction entre la Protrudine et Rab11::GDP (Shirane and Nakayama 2006, Matsuzaki, Shirane et al. 2011) ont été identifiées. La phosphorylation de la Protrudine sur plusieurs résidus régule sa capacité à lier Rab11 (Shirane and Nakayama 2006). La Protrudine contient un domaine RBD et un domaine FYVE (*Fab1, YOTB, Vac, and EEAI*)

(Burd and Emr 1998) qui lie préférentiellement, dans le cas spécifique de la Protrudine, le PtdIns(4,5) $P_2$ , le PtdIns(3,4) $P_2$  et le PtdIns(3,4,5) $P_3$  (Gil, Kim et al. 2012). Ainsi, la Protrudine pourrait diriger le complexe Rab11/Protrudine/Kif5 vers différentes membranes cibles. Des indications suggèrent aussi que la Protrudine est un inhibiteur global de Rab11 (Shirane and Nakayama 2006). La Protrudine n'est pas conservée chez la Drosophile.

#### **1.2.3.7. Myosine V**

En plus des complexes Rab11/FIP2/MyoVb, Dynéine/FIP3/Rab11 et Rab11/Protrudine/Kif5, Rab11 peut directement interagir avec MyoVb (Lapierre, Kumar et al. 2001) et cette interaction est nécessaire pour le transport de certains cargos (Wang, Edwards et al. 2008, Schuh 2011). La structure cristallographique entre Rab11 et le domaine globulaire de la queue de MyoVb a été élucidée (Pylypenko, Attanda et al. 2013). Comme le site de liaison de Rab11 sur la MyoVb est hautement conservé chez les myosines, et que Rab11 et Myosine Va (MyoVa) interagissent (Lindsay, Jollivet et al. 2013), l'interaction entre la MyoVb et MyoVa avec Rab11 est probablement similaire. Des études futures seront nécessaires pour caractériser la stichométrie et la structure d'un complexe potentiel entre Rab11/MyoVb/FIP2 (Welz, Wellbourne-Wood et al. 2014).

#### **1.2.3.8. Rabin8**

L'interaction entre Rabin8 et Rab11::GTP est un exemple de cascade de Rab. La protéine Rabin8 est une Rab8-GEF (Hattula, Furuhejm et al. 2002) et peut interagir avec Rab11::GTP. L'interaction entre Rab11 et Rabin8 stimule l'activité GEF de Rabin8 et cette interaction est essentielle pour activer Rab8 lors de la ciliogenèse (Knodler, Feng et al. 2010).

#### **1.2.3.9. Rab11BP/Rabphilin-11**

En 1999, deux groupes indépendants ont montré biochimiquement une interaction entre Rab11::GTP et la protéine *Rab11-binding protein* (Rab11BP), appelée Rabphilin-11 par le second groupe (Mammoto, Ohtsuka et al. 1999, Zeng, Ren et al. 1999). Aucune caractérisation fonctionnelle entre Rab11 et Rab11BP n'a été réalisée à ce jour. Rab11BP

possède un domaine de liaison à Rab11 central, entouré d'un domaine riche en proline en N-terminal et des répétitions WD40 en C-terminal (Zeng, Ren et al. 1999).

#### **1.2.4. Maladies reliées à des défauts d'expression de Rab11**

L'implication de Rab11c dans le cancer est bien caractérisée. Rab11c agit comme un oncogène et se retrouve surexprimé dans les cancers ovariens et du sein (Cheng, Lahad et al. 2004), alors que Rab11c agit plutôt comme suppresseur de tumeur et se retrouve supprimé dans le cancer du côlon (Goldenring and Nam 2011). Plusieurs observations suggèrent que la modulation de l'expression de Rab11c affecte au moins trois des six capacités biologiques acquises lors du développement du cancer (*hallmarks of cancer*) (Hanahan and Weinberg 2011), soit l'augmentation de la prolifération, la prévention de l'apoptose et l'augmentation de la capacité migratoire des cellules (Cheng, Lahad et al. 2004, Goldenring and Nam 2011, Chung, Wei et al. 2014). Aussi, il a été observé que des défauts de trafic dépendant de Rab11 seraient impliqués dans la maladie de Huntington (Li, Sapp et al. 2009, Li, Standley et al. 2009) et d'Alzheimer (Greenfield, Leung et al. 2002, Bhuiin and Roy 2015).

### **1.3. Processus cellulaires impliquant Rab11**

Afin de donner un aperçu des différentes fonctions de Rab11 *in vivo*, le rôle de Rab11 sera présenté lors de la migration collective des cellules de bordure de *Drosophila* (point 1.3.1) et les fonctions de Rab11 conjointement avec celles des FIPs seront présentées lors de la cytokinèse (point 1.3.2), lors de la division asymétrique (point 1.3.3) et lors du trafic de la E-cadhérine dans des modèles cellulaires polarisés (point 1.3.4).

### **1.3.1. La migration collective : la Drosophile montre la voie**

Damien Ramel, Carl Laflamme, Gloria Assaker and Gregory Emery

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie et Département de pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

*Médecine Sciences Amérique*

Novembre 2012

Auteur de correspondance : Gregory Emery

Mots clefs : Migration cellulaire, Signalisation cellulaire, Cancer.

### 1.3.1.1. Résumé

La migration cellulaire est un des mécanismes clés du développement et de la dissémination métastatique, responsable de plus de 90% des décès de patients atteints de cancer. De nombreuses évidences anatomo-pathologiques indiquent que la dissémination de nombreux cancers se fait *via* des migrations collectives. Cependant ce type de migration est peu caractérisé comparativement à la migration de cellules uniques. Il devient donc essentiel de comprendre les modes de régulation de la migration collective pour pouvoir définir de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces. La mouche *Drosophile* se révèle être un allié aussi inattendu qu'efficace pour l'étude de ce type de migration. Dans cette revue, nous détaillerons les dernières avancées mécanistiques contrôlant la migration collective qui ont été mises à jour récemment grâce à la *Drosophile*, ainsi que les grandes questions à répondre dans le but d'envisager un ciblage thérapeutique efficace de la formation des métastases.

### 1.3.1.2. Introduction

#### La migration collective

La migration cellulaire collective émerge comme un mécanisme majeur impliqué dans différents processus physiologiques et pathologiques, au cours du développement et lors de la formation de métastases (Friedl and Gilmour 2009). Ainsi, elle intervient par exemple dans la régénération des épithéliums, la croissance et la ramification des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse ou lors de l'invasion des tissus par des cellules tumorales (Rhabdomyosarcomes, cancers colorectaux, carcinomes spinocellulaires, cancer du sein, etc) (Thiery 2009, Yilmaz and Christofori 2010). L'étude de la migration collective est donc un enjeu majeur pour la compréhension de mécanismes de morphogénèse, mais aussi pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement ou la prévention de la formation des métastases.

Une migration peut être considérée comme collective lorsque des cellules migrent ensemble, en établissant des contacts entre elles (Rorth 2009). Comme pour la migration de cellules uniques, la migration collective met en jeu des mécanismes de régulation contrôlant la polymérisation du cytosquelette d'actine et la polarité cellulaire. Cependant, il existe des différences fondamentales entre les deux types de migration. En effet, migrer collectivement implique de nouvelles contraintes auxquelles les cellules doivent répondre afin de conserver leurs adhésions les unes aux autres et coordonner leurs mouvements pour migrer ensemble efficacement dans la bonne direction. Différentes stratégies permettent de répondre à ces nouvelles problématiques menant à l'existence de différents types de migration collective (Rorth 2009). Plusieurs organismes modèles sont utilisés pour étudier la migration collective tels que le poisson zébré, le xénope ou la Drosophile (Rorth 2009). Cette dernière constitue un modèle de choix qui présente une série d'avantages pour l'étude de différents types de migrations collectives *in vivo*. En effet, au cours du développement de la mouche, des migrations collectives ont lieu sous forme de petits groupes de cellules épithéliales polarisées ou sous forme de feuillets de cellules épithéliales. Les principaux systèmes de migration collective chez la Drosophile comprennent la migration des cellules formant le mésoderme durant la gastrulation, la migration des feuillets épithéliaux latéraux durant la fermeture



dorsale de l'embryon, la migration des cellules épithéliales durant la morphogenèse de la trachée et la migration des cellules de bordure (BC) durant l'ovogenèse (Brumby and Richardson 2005) (Figure 1.4).

### **1.3.1.3. Le modèle des cellules de bordure**

Un des modèles de migration collective les plus étudiés est le système des BC dans la chambre d'œuf de *Drosophile* (Montell 2003). Lors du stade 8 de l'ovogenèse de la *Drosophile*, un groupe de 8 cellules folliculaires antérieures appelées cellules de bordure, se détache de la monocouche de l'épithélium folliculaire en réponse à la cytokine Unpaired (Upd) sécrétée par les cellules polaires (Figure 1.4). Upd active la voie JAK/STAT dans les BC, ce qui permet la formation et l'émission de protrusions et leur détachement de l'épithélium (Silver and Montell 2001). Le groupe de cellules effectue ensuite une migration postérieure à travers les cellules nourricières, en direction de l'ovocyte, qu'il atteint au stade 10 de l'ovogenèse. Pour ce faire, les BC utilisent la molécule d'adhésion E-Cadhérine pour adhérer aux cellules nourricières (Niewiadomska, Godt et al. 1999). Il a été démontré que la migration des BC s'effectue en deux phases distinctes, utilisant des mécanismes différents. La première phase, qui correspond à la migration postérieure précoce, dépend d'un comportement cellulaire polarisé. Cependant, la deuxième phase qui correspond à la migration postérieure tardive et la migration dorsale, est basée sur un comportement dynamique collectif des cellules ou chacune des cellules du groupe peut prendre la tête de la migration (Bianco, Poukkula et al. 2007). Après avoir atteint l'ovocyte, ces cellules changent de direction et migrent dorsalement pour s'arrêter finalement au niveau du noyau de l'ovocyte. Cette migration en deux étapes nécessite environ 6 heures. La directionnalité du mouvement est déterminée par deux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), en réponse aux ligands sécrétés par l'ovocyte (Rorth 2002). De nombreuses études et cribles génétiques ont permis de déterminer quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ce modèle et plus récemment, la mise au point de techniques d'imagerie *in vivo* a permis de mieux comprendre les paramètres dynamiques de cette migration (Prasad, Wang et al. 2011). Ainsi, des voies majeures déjà connues comme altérées dans les processus métastatiques chez les mammifères ont été identifiées comme régulant la migration des BC. Par exemple, l'hypoxie, connue pour son rôle actif dans le

développement des tumeurs, a été identifiée comme un régulateur de la migration des BC (Doronkin, Djagaeva et al. 2010). Ces cribles ont également permis de découvrir de nouveaux acteurs importants conservés dans l'évolution, tel que le gène codant pour la protéine Psidin, qui s'est avéré être un acteur important dans la régulation de la dynamique de l'actine dans les cellules épithéliales mammaires (Kim, Cho et al. 2011). Ces données démontrent que les BC constituent un outil idéal pour l'étude de la migration collective. Dans cette revue, nous allons discuter des principales voies régulatrices de la migration collective élucidées grâce à l'étude des BC. En particulier, nous détaillerons le rôle des récepteurs de guidage, des petites GTPases et de l'endocytose qui émergent comme des acteurs majeurs de ce type de migration.

#### **1.3.1.4. La régulation**

##### *Les RTK*

L'orientation des BC durant leur migration dirigée est assurée par deux voies de signalisation portant sur le récepteur PVR (*Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) receptor Related*) et le récepteur EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Duchek and Rorth 2001, Duchek, Somogyi et al. 2001). La migration de ces cellules vers l'ovocyte est guidée essentiellement par un gradient du ligand de PVR : PVF1 (*PDGF/VEGF-like factor 1*) qui est exprimé dans les cellules germinales, et retrouvé à des niveaux élevés dans l'ovocyte. Il a été démontré que l'expression ectopique de ce ligand entraîne une réorientation des BC (McDonald, Pinheiro et al. 2003). D'autre part, le récepteur EGFR possède un rôle largement redondant à celui de PVR dans cette migration, puisque les BC peuvent s'orienter en utilisant soit PVR ou EGFR. De plus, la sur-expression séparée de chacun des trois ligands du récepteur EGFR : *spitz (spi)*, *vein (vn)*, et *gurken (grk)* bloque la migration des BC, et le phénotype le plus fort est obtenu avec *spitz*. Au moment où les BC atteignent l'ovocyte, EGFR est davantage impliqué dans l'orientation des cellules, et ceci en guidant la migration dorsale en réponse à son ligand Grk sécrété par l'ovocyte (Duchek and Rorth 2001). Paradoxalement, une autre étude a démontré que Grk et Vn, contrairement aux deux autres ligands d'EGFR : Spi et Keren (Krn), sont incapables de rediriger la migration des BC *in vivo*. Cette étude conclut ainsi que seuls Spi et Krn

fonctionnent, probablement avec PVF1, pour guider les BC à travers la chambre d'oeuf (McDonald, Pinheiro et al. 2006).

Un aspect intéressant de la régulation des RTKs durant la migration des BC est la localisation de leur activité. En effet, les RTKs actifs sont fortement polarisés à l'avant des BC (Jekely, Sung et al. 2005, Assaker, Ramel et al. 2010) (Figure 1.5). La cellule qui mène la migration présente le plus haut taux de récepteurs actifs au sein de son front de migration, alors que les autres cellules diminuent leur niveau d'activité des RTKs. La conséquence cellulaire directe de cette signalisation par les RTKs est la formation d'une longue extension cellulaire par une seule cellule du groupe de BC. Le groupe de cellules se comporte ainsi exactement comme une cellule unique polarisée en réponse à un gradient chimiotactique. Quel serait alors l'avantage d'un tel comportement ? L'hypothèse actuelle est que la concentration de récepteurs actifs dans la cellule qui mène la migration permettrait d'hyper-sensibiliser cette cellule, et de désensibiliser les autres cellules du groupe. Ainsi, seule la cellule de tête serait sensible au gradient du ligand permettant une migration plus efficace, au contraire de la migration de cellules uniques, où les cellules sont davantage sensibles aux fluctuations de concentration du gradient qui pourraient faire dévier leur route.

On ne connaît pas assez les cascades de signalisation et les événements cellulaires qui surviennent en aval des récepteurs RTKs dans ce système. Cependant, un événement central en aval de la signalisation des RTKs est l'activation de la petite GTPase Rac1.

#### *Rac et le cytosquelette*

Les GTPases de la famille Rho (Rac1, Cdc42 et Rho1) sont des régulateurs majeurs de la migration cellulaire via leurs effets sur le cytosquelette d'actine et de tubuline (Etienne-Manneville and Hall 2002). Leur rôle en oncogenèse est bien documenté notamment au niveau de leur implication dans la dissémination et les processus métastatiques. Comme toutes les petites GTPases, elles oscillent entre un état inactif, lié au GDP (Guanosine diphosphate), et un état actif, lié au GTP (Guanosine triphosphate), dans lequel elles vont pouvoir médier leurs effets sur le cytosquelette notamment par la liaison d'effecteurs. Les protéines GEF (*Guanine Exchange Factor*) sont responsables de l'échange du GDP avec le GTP et contrôlent ainsi l'activation des petites GTPases. L'inactivation se fait par l'hydrolyse du GTP en GDP, à

l'aide de protéines GAP (*GTPase Activating Protein*). Il existe un nombre considérable de données sur la régulation et le rôle de ces GTPases dans les systèmes de migration simple, cependant jusque récemment leur mode de fonctionnement lors de la migration collective était méconnu.

Le modèle de migration des BC a permis de compléter cette lacune. En effet, bien que l'implication de Rac dans les BC soit connue depuis près de 20 ans (Murphy and Montell 1996), ce n'est que très récemment qu'il a été montré que Rac1 est la GTPase nécessaire pour la formation de protrusions lors de la migration collective (Wang, He et al. 2010). Le mécanisme d'activation de Rac1 reste encore inconnu. Un des candidats pour ce rôle est la GEF Mbc (Myoblast city, l'orthologue de DOCK180). En effet, Mbc et son partenaire Elmo (Engulfment and Cell Motility) sont nécessaires pour la première phase de la migration où l'orientation de la migration dépend de la localisation cellulaire de la signalisation au sein de la cellule de front (Bianco, Poukkula et al. 2007). Mbc est une GEF connue de Rac dans d'autres modèles (Cote and Vuori 2007) et pourrait être également impliquée dans l'activation de Rac1 dans le modèle des BC, bien qu'il n'existe aucune évidence directe à ce jour. Il existe de nombreuses GEF et GAP capable de réguler Rac1 et identifier lesquelles sont impliquées dans ce processus est un axe de recherche important actuellement.

L'expression des formes dominante négative (DN) ou constitutivement active (CA) de *Rac1* entraîne des défauts de migrations sévères, indiquant que son activité doit être précisément contrôlée de façon spatio-temporelle. En effet, l'étude de la distribution de l'activité de Rac1 par FRET (Aoki and Matsuda 2009) (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) *in vivo*, a démontré que son activité est restreinte au front de migration de la cellule qui mène la migration (Wang, He et al. 2010) (Figure 1.5). Cette polarisation de l'activité de Rac1 est dépendante des RTKs (Wang, He et al. 2010). De plus, l'équipe du Pr. Montell a élégamment démontré, en activant ou en désactivant Rac1 localement grâce à l'utilisation de formes contrôlées par la lumière (Wu, Wang et al. 2011), que le niveau d'activation de Rac1 a des conséquences cellule autonome, mais aussi non-cellule autonome. En effet, lorsque l'activité Rac1 est élevée dans une cellule, les autres cellules du groupe gardent un niveau restreint d'activité de Rac1 ce qui inhibe la formation de protrusions et prévient toute migration dans une autre direction. Au contraire, l'inhibition de Rac dans une cellule entraîne

un arrêt de la migration, une perte de la directionnalité, et la formation de protrusions dans les autres cellules du groupe par un mécanisme impliquant la kinase JNK (Wang, He et al. 2010). Ces résultats révèlent la présence de mécanismes de communication entre les cellules du groupe pendant la migration. Ainsi, les questions importantes à répondre sont: par quels mécanismes les cellules communiquent entre elles? Comment sont-elles capables de mesurer le niveau d'activité de Rac dans les autres cellules du groupe? Quel est le rôle des autres GTPases Cdc42 and Rho1 ?

### *L'endocytose*

Les mécanismes d'endocytose, par lesquels la cellule internalise des protéines de la membrane plasmique, sont cruciaux pour assurer une réponse adéquate aux différentes stimulations extracellulaires (Scita and Di Fiore 2010). Ainsi, l'endocytose émerge comme un important régulateur de la migration cellulaire dirigée, en réponse à un gradient chimiotactique (Schiefermeier, Teis et al. 2011). Les molécules internalisées *via* endocytose peuvent suivre de nombreuses routes pour être acheminées vers l'endosome précoce. Dans ce compartiment, un tri est opéré entre les molécules devant être dégradées et celles devant être recyclées à la membrane plasmique. Les premières sont acheminées vers l'endosome tardif puis le lysosome pour être subséquemment dégradées, alors que les autres sont recyclées à la membrane plasmique soit par une voie de transport directe, soit *via* l'endosome de recyclage. Les petites GTPases de la famille des Rabs régulent le trafic vésiculaire entre les différents compartiments de la voie endosomale (Figure 1.6).

Les premières observations d'une implication de l'endocytose dans la migration collective proviennent du laboratoire du Dr. P. Rorth. Cette équipe a démontré que des BC déficientes pour la protéine BCl (Casitas B-lineage Lymphoma), une E3 ubiquitine ligase régulant l'internalisation des RTKs par ubiquitination, présentaient une délocalisation des récepteurs de guidance et des défauts de migration importants (Jekely, Sung et al. 2005). De plus, l'absence de la protéine Sprint, une GEF présumée de Rab5 qui contrôle l'entrée dans les endosomes précoces, donne des phénotypes similaires (Jekely, Sung et al. 2005). Ces données suggèrent que l'endocytose est une actrice majeure de la régulation de la réponse aux signaux extracellulaires en contrôlant la restriction spatiale des récepteurs de guidance. Cependant, il

n'y a aucune évidence directe montrant que ce sont effectivement les RTKs qui subissent cette endocytose. Plus récemment, suite à un criblage de candidats par l'expression de formes dominantes négatives de différentes protéines Rabs, nous avons identifié Rab5 et Rab11 (qui régule le recyclage de l'endosome de recyclage vers la membrane plasmique) comme des acteurs importants de la migration des BC (Assaker, Ramel et al. 2010). Bien que les phénotypes induits par une abolition de l'activation de Rab5 soient dramatiques, son mécanisme d'action dans la migration collective reste obscur. Au contraire, le rôle et la régulation de Rab11 ont pu être appréhendés. L'expression de la forme dominante négative de Rab11 induit un blocage de la migration. Cet effet est dû spécifiquement à une perte de la polarisation des RTKs actifs. D'autres molécules impliquées dans la migration telles que les intégrines ou les cadhérines ne sont pas affectées malgré le fait qu'elles soient classiquement décrites comme régulées par *Rab11*. Ce mécanisme fait intervenir le complexe multi-protéique de l'exocyste qui est chargé d'adresser les vésicules des endosomes vers la membrane plasmique. En effet, la déplétion de sous-unités de l'exocyste conduit à un défaut de migration et une perte de polarité des RTKs actifs (Assaker, Ramel et al. 2010). Ces données, en écho aux travaux sur *BCL* et *Sprint*, confirment que l'endocytose joue un rôle majeur dans le maintien de la polarité des récepteurs de guidage actifs. Cependant, la question demeure ouverte si les RTKs sont la cible de ce cycle d'endocytose impliquant *Rab5*, *Rab11* et le complexe de l'exocyste.

Une des sous-unités de l'exocyste, Sec15, interagit spécifiquement avec la forme active de Rab11 (Rab11-GTP) et est donc un effecteur de Rab11 (Wu, Mehta et al. 2005). Sec15 est fortement polarisé pendant la migration des BC de façon dépendante de Rab11 (Assaker, Ramel et al. 2010). Ainsi, une forme fusionnée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) de Sec15 (Sec15-GFP) peut être utilisée comme révélateur du statut d'activité de Rab11 *in vivo* pendant la migration. En effet, la distribution vésiculaire comparée à la distribution cytoplasmique est modifiée lors d'un changement d'activité de Rab11. Ainsi, avec cet outil, il est désormais envisageable d'identifier et d'étudier des régulateurs de Rab11 tels que des GEFs et des GAPs.

Récemment, suite à un criblage par RNAi des Rab-GAPs lors de la migration des BC, nous avons identifié le gène *Evi5* comme étant essentiel à la migration des BC. *Evi5* de la

Drosophile est l'orthologue d'Evi5 et EVI5-like chez l'humain, auxquels différentes activités GAPs ont été attribuées. L'utilisation de Sec15-GFP comme senseur de l'activité de Rab11 a permis de démontrer que lors de la migration des BC, Evi5 agit comme Rab11-GAP. Là encore, de manière logique, la déplétion ou la surexpression d'Evi5 induit une perte de polarité des RTK actifs (Laflamme, Assaker et al. 2012). Il est intéressant de constater que parmi les autres GAP affectant la migration des BC se trouvent *Rn-Tre*, dont la cible de l'orthologue chez les mammifères est Rab5.

Ensemble, ces travaux montrent clairement que l'endocytose régule la polarité des récepteurs de guidage pendant la migration collective (Figure 1.6). Cependant, la question de la molécule qui emprunte ces voies d'endocytose est encore ouverte. Si les RTKs semblent être la piste la plus logique, personne n'a été capable de les détecter spécifiquement dans un compartiment donné. Ainsi, il serait parfaitement possible que cette régulation des RTKs soit indirecte, et que les acteurs principaux restent à découvrir.

#### **1.3.1.5. Conclusion**

L'étude des mécanismes qui contrôlent la migration collective est d'une importance capitale pour la compréhension du développement d'organismes supérieurs, mais aussi en cancérologie. Cependant, plusieurs aspects de ce type de migration restent obscurs. Il est donc crucial d'imaginer de nouvelles approches pour identifier des gènes régulateurs de cette migration. Des cribles génétiques sophistiqués pourraient être mis au point pour révéler de nouveaux régulateurs de la migration collective en utilisant les organismes modèles tels que la Drosophile. De même, l'utilisation de méthodes avancées de microscopie *in vivo* devrait permettre d'analyser plus finement la dynamique de ce type de migration. La migration collective est un exemple montrant que les organismes multicellulaires ne sont pas simplement une addition de cellules indépendantes, mais au contraire que les cellules peuvent coordonner leurs efforts. Ainsi, un des enjeux des années à venir, serait de comprendre quelles sont les forces mécaniques qui sont mises en jeu dans les migrations collectives. Ces forces, qui sont à la fois créées et exercées par les cellules, ont une grande influence sur les tissus. Une autre perspective d'avenir serait d'utiliser les organismes modèles pour cribler des collections de petites molécules. En effet, un nombre croissant d'évidences montre que plusieurs cancers

utilisent la migration collective pour envahir les tissus et produire des métastases. Ainsi, la découverte d'inhibiteurs pharmacologiques pouvant sélectivement bloquer la migration collective serait une percée thérapeutique majeure dans le traitement de ces cancers.

#### **1.3.1.6. Remerciements**

Les travaux réalisés par les auteurs sont soutenus par des financements des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), et par la Société de Recherche sur le Cancer (SRC) ainsi que par des bourses des Fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ, D.R et C.L) et de la Fondation Cole (G.A). G.E est titulaire de la chaire de recherche du Canada en Trafic Vésiculaire et signalisation cellulaire.



### 1.3.1.7. Légendes des figures:

#### **Figure 1.4: Différents exemples de migration collective dans la Drosophile**

(A) La fermeture dorsale de l'embryon met en jeu des feuillets de cellules épithéliales. Les cellules se déplacent collectivement des deux côtés de l'embryon. Ce type de migration utilise des changements de la forme cellulaire par élongation accompagnés d'extensions de protrusions. Les cellules en arrière du front de migration induisent la migration de cellules du front de migration.

(B) La morphogénèse de la trachée s'effectue par une migration branchée sur un tronc préexistant. Cette migration nécessite d'importantes modifications de la morphologie cellulaire à travers le remodelage des jonctions intercellulaires par des mouvements d'intercalation.

(C) La migration des cellules BC s'effectue sous forme d'un groupe de cellules épithéliales avec une méthode de type mésenchymateux au front de migration (voir section modèle de la migration des BC).

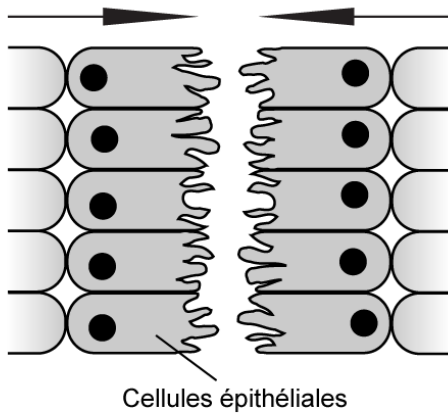
#### **Figure 1.5 : Polarité de l'activité de Rac et des RTK actifs dans les BC**

Durant la migration les récepteurs actifs se concentrent au front de migration entraînant l'augmentation de l'activité de Rac uniquement dans la cellule qui mène la migration. Ainsi, les autres cellules maintiennent des niveaux bas de Rac actifs, empêchant ainsi la formation de protrusions dans d'autre direction.

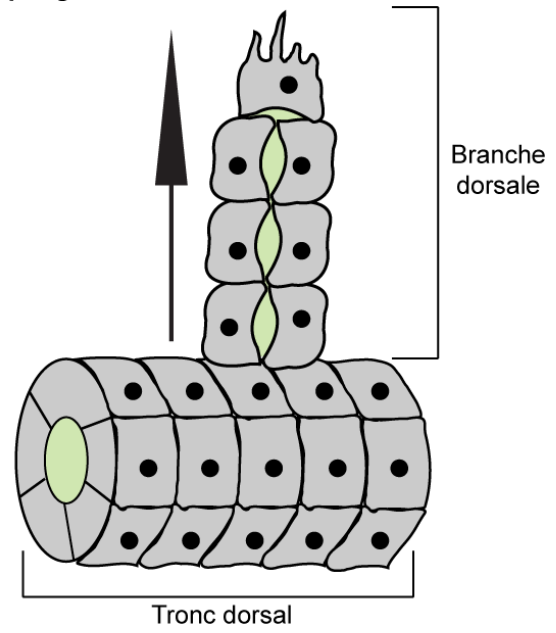
#### **Figure 1.6: Rôle et régulation de l'endocytose dans la migration des BC**

Schéma représentant les voies d'endocytose impliquées dans la régulation de la migration des BC. Rab5 régule l'entrée dans les endosomes précoces, Rab11 régule le recyclage des endosomes précoces vers la membrane plasmique *via* l'endosome de recyclage et le complexe de l'exocyste. L'altération de l'activité de ces protéines ou de leurs régulateurs Evi5 (GAP de Rab11) ou sprint (GEF de Rab5) induit une perte de la polarité des récepteurs actifs. BCl (E3 ubiquitine ligase des RTK) est également nécessaire à la polarité des RTK.

**A. Fermeture dorsale de l'embryon**



**B. Morphogenèse de la trachée**



**C. Cellules de bordure (chambre d'oeuf stade 10)**

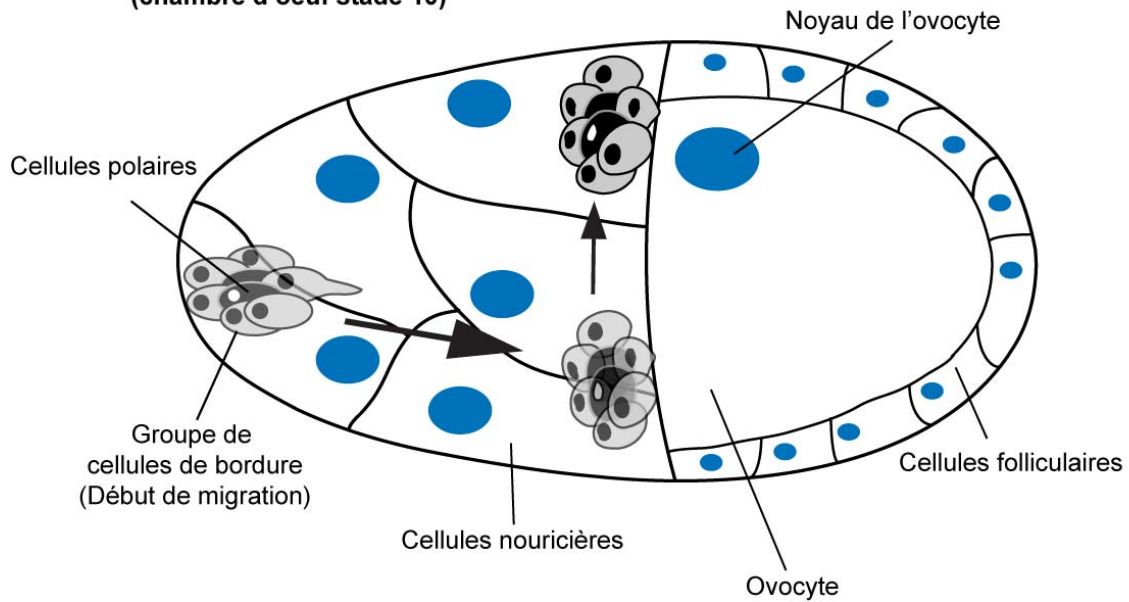


Figure 1.4 Différents exemples de migration collective dans la Drosophile.

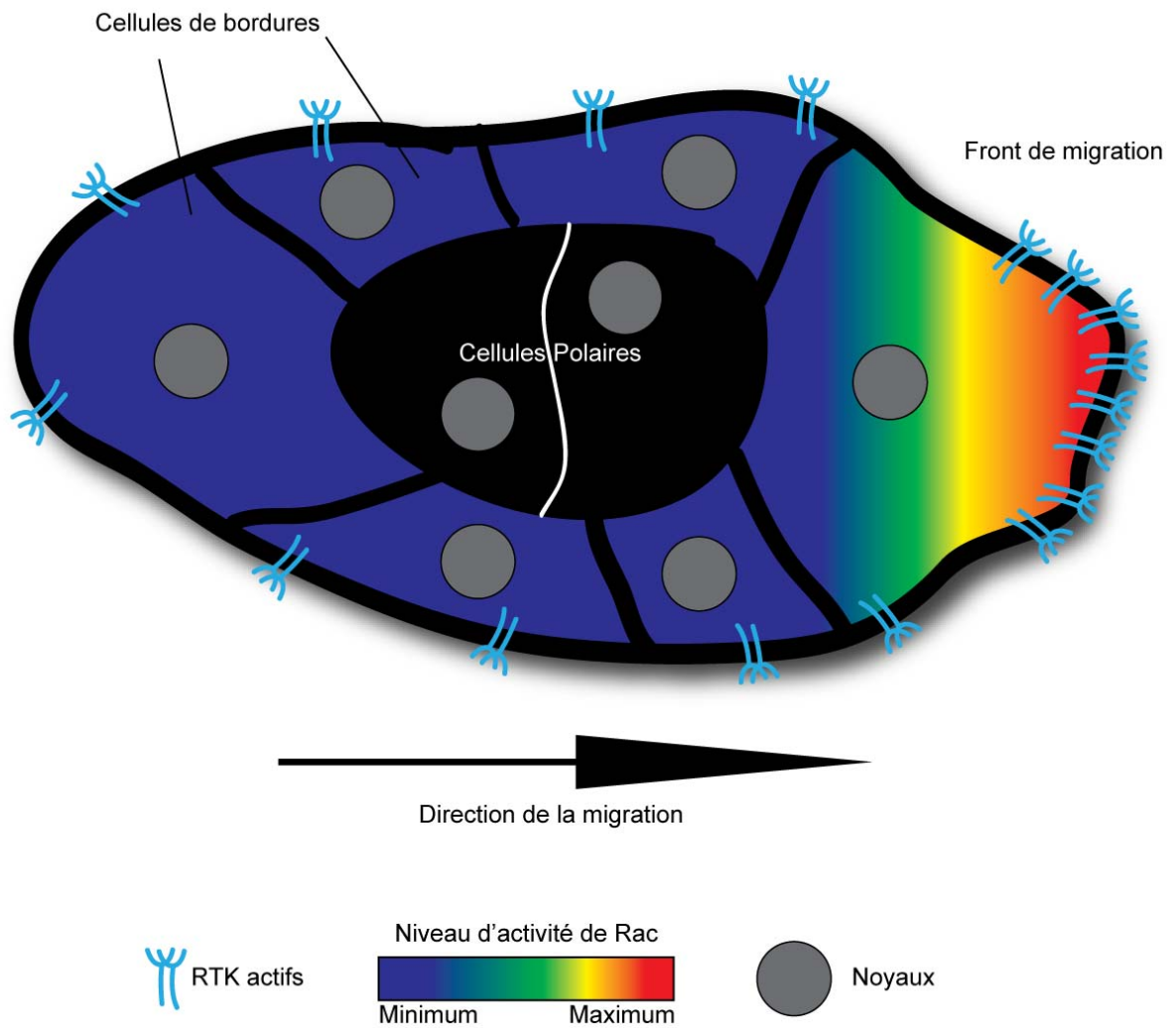


Figure 1.5 : Polarité de l'activité de Rac et des RTK actifs dans les BC.

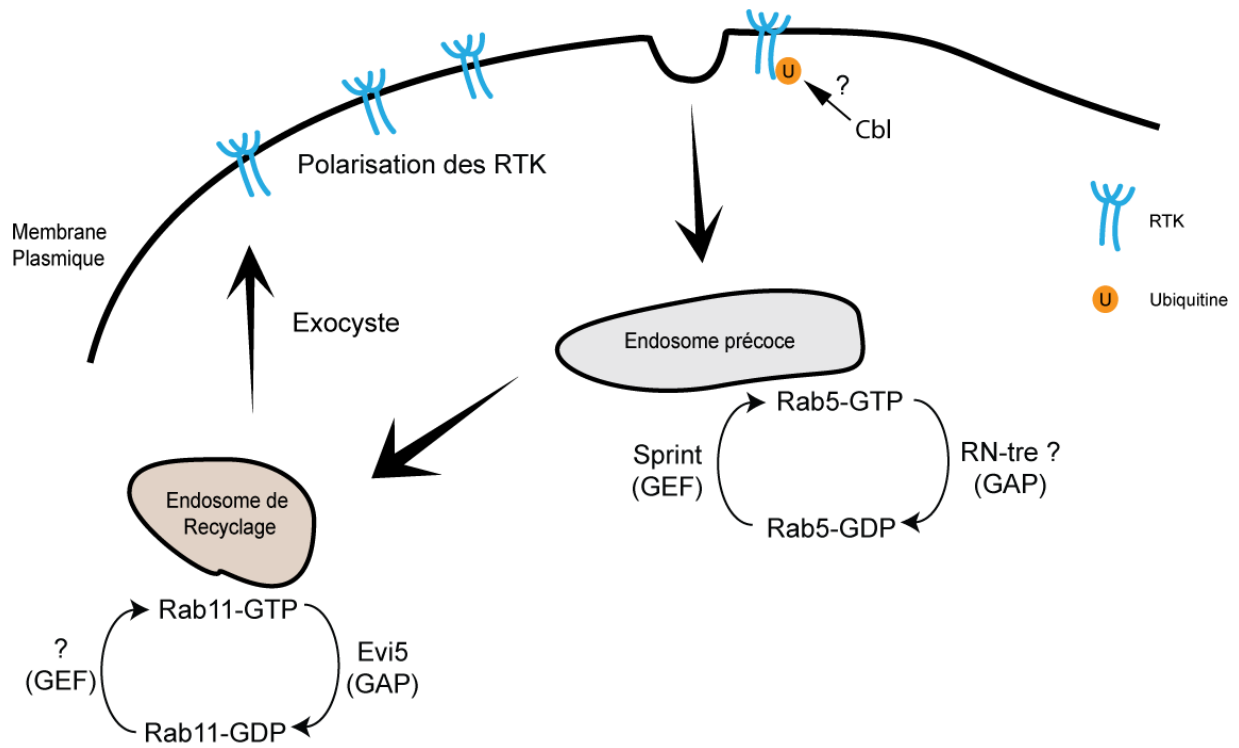


Figure 1.6 : Rôle et régulation de l'endocytose dans la migration des BC.

### 1.3.2. Rôle des endosomes lors de la cytokinèse tardive

Le cycle cellulaire culmine avec la cytokinèse qui permet la séparation physique des deux cellules filles. La cytokinèse débute lors de l'anaphase avec la contraction de l'anneau d'actine-myosine. Cette contraction génère une force suffisante pour permettre l'ingression de la membrane plasmique formant le sillon de clivage qui divise le cytoplasme des deux cellules filles en 2 domaines distincts. Les cellules filles restent connectées par le pont intercellulaire (contenant le *midbody*) qui perdure jusqu'à l'abscission de sa membrane plasmique (Green, Paluch et al. 2012). Le trafic membranaire joue un rôle prépondérant lors de la cytokinèse tardive (depuis la formation du pont intercellulaire jusqu'à l'abscission). Cette section de l'introduction se penchera sur les différents endosomes et autres régulateurs de la cytokinèse qui sont étudiés au chapitre 4.

Table 1.II : Glossaire de la cytokinèse.

---

L'**anneau d'actine-myosine**, ou anneau de contraction, contient de la F-actine et le moteur myosine II. La petite GTPase RhoA spécifie la zone de contraction et son activité est régulée par la Rho-GEF Ect2.

---

Le ***centralspindlin*** est un complexe hétérotétramérique composé de deux molécules de la kinésine-6, MKLP1, et de deux molécules de MgcRacGAP.

---

Le **fuseau central** est la zone de microtubule située entre les deux ADN fils.

---

Le ***midbody*** est formé des extrémités « plus » enchevauchées des microtubules du fuseau central et contient plusieurs protéines essentielles à l'abscission. Le *midbody* se retrouve au centre du pont intercellulaire.

---

Le **pont intercellulaire** est formé lorsque le sillon de clivage termine son ingression et contient plusieurs protéines restantes de l'anneau d'actine-myosine et des microtubules du fuseau central.

---

#### 1.3.2.1. Premières évidences de l'importance du trafic vésiculaire lors de la cytokinèse

A la fin des années 1990 et au début des années 2000, quelques groupes de recherche ont étudié le rôle du trafic vésiculaire dans l'acheminement de lipide au sillon de clivage

(Finger and White 2002). La première évidence que le trafic membranaire était important lors de la cytokinèse vient de la découverte qu'une perte de fonction de la protéine *syntaxine 1* (une t-SNARE) est requise pour la cytokinèse chez la Drosophile, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et l'oursin de mer (Burgess, Deitcher et al. 1997, Conner and Wessel 1999, Jantsch-Plunger and Glotzer 1999). En effet, ces résultats suggèrent que la fusion de vésicule par l'entremise du complexe des SNAREs est essentielle lors de la cytokinèse. D'ailleurs, les auteurs ont observé que l'ingression du sillon de clivage se fait normalement, et qu'il régresse avant le processus d'abscission (Conner and Wessel 1999), décelant déjà un rôle pour le trafic membranaire lors de la cytokinèse tardive. Une autre étude montre que la source principale de membrane lors de la cytokinèse n'est pas la membrane plasmique, mais plutôt les membranes intracellulaires (Lecuit and Wieschaus 2000), indiquant un rôle pour le trafic vésiculaire dans la distribution de ces lipides.

Des observations subséquentes suggèrent que le trafic vésiculaire depuis l'appareil de Golgi soit nécessaire lors de la cytokinèse. En effet, le traitement d'embryon de Drosophile avec la molécule *Brefeldin A* inhibe l'ingression du sillon de clivage lors des premières divisions cellulaires (Sisson, Field et al. 2000). La *Brefeldin A* inhibe l'activation des Arfs par les GEFs sur les membranes du Golgi et inhibe ainsi tout transport vésiculaire depuis le Golgi (Donaldson, Finazzi et al. 1992, Hunziker, Whitney et al. 1992). Une autre observation supportant le rôle du trafic vésiculaire vient de la déplétion des protéines Rab11 chez *C. elegans* (Rab-11.1 et Rab-11.2) qui bloque aussi la cytokinèse (Skop, Bergmann et al. 2001). Deux articles ont su démontrer par la suite que des vésicules quittant le Golgi fusionnent avec la membrane plasmique lors de la cytokinèse tardive (Gromley, Yeaman et al. 2005, Goss and Toomre 2008). La caractérisation subséquente du rôle du trafic vésiculaire a permis l'identification des vésicules Rab11/FIP3(+) et des vésicules Rab35(+) comme régulateurs majeurs de la cytokinèse tardive et leurs rôles moléculaires sont présentés dans les prochaines sections.

### **1.3.2.2. Endosome de recyclage, Rab11 et les Rab11-FIPs**

#### *Endosome de recyclage*

Lors de l'entrée des cellules en mitose, les cellules s'arrondissent, menant à une réduction dramatique de la surface de la membrane plasmique. Il semble que cette réduction soit causée en partie par une diminution de la fusion du RE avec la membrane plasmique, sans changement dans le taux général d'endocytose (Boucrot and Kirchhausen 2007). Le transport de vésicule du RE et la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique reprend lors de la cytokinèse, menant à la récupération de la surface totale de la membrane plasmique des cellules filles (Boucrot and Kirchhausen 2007). La fusion des vésicules provenant du RE avec la membrane plasmique en cytokinèse semble importante puisque leur inhibition mène à des défauts de cytokinèse (Low, Li et al. 2003, Boucrot and Kirchhausen 2007, Albertson, Cao et al. 2008).

#### *Rôle de Rab11 et de Nuf lors de la cellularisation de l'embryon de Drosophile*

Un modèle d'étude des régulateurs de la cytokinèse est la cellularisation de l'embryon de Drosophile. Lors du développement de l'embryon de la Drosophile, il y a d'abord des séries rapides de divisions cellulaires sans cytokinèse. Tous les noyaux partagent ainsi le même cytoplasme, produisant un syncytium. Le syncytium subit ensuite un processus de formation cellulaire, c'est-à-dire que chacun des noyaux sera entouré d'une membrane plasmique. Ce processus est appelé « cellularisation » et nécessite des réarrangements du cytosquelette d'actine et de microtubule, fait intervenir plusieurs régulateurs clés de la cytokinèse (Mazumdar and Mazumdar 2002) et requiert le trafic vésiculaire dépendant de Rab11.

Différentes études du laboratoire du Dr Sullivan suggèrent que Nuf, conjointement avec Rab11, régule la dynamique de l'actine lors de la cellularisation de l'embryon de Drosophile. D'abord, Nuf et Rab11 se retrouvent au RE péricentrosomal dépendamment de la liaison de Nuf à la dynéine (Riggs, Fasulo et al. 2007). Des embryons de Drosophile mutants pour Nuf ou Rab11 échouent à former un sillon de clivage lors de la cellularisation, et cause des défauts sévères d'organisation de l'actine et des défauts d'intégrité de la membrane (Riggs, Rothwell et al. 2003). Certaines évidences suggèrent que Nuf régule la distribution de la RhoGEF2 lors de la cellularisation et agit ainsi dans la voie de signalisation de Rho1 (RhoA chez les mammifères) (Cao, Albertson et al. 2008). L'activation spécifique de la petite GTPase

Rho1, en une zone préétablie de la membrane plasmique spécifie la zone de contraction ainsi que l'assemblage de l'anneau de contraction (Prokopenko, Brumby et al. 1999, Kimura, Tsuji et al. 2000, Tolliday, VerPlank et al. 2002).

### *Rab11 et FIP3 lors de la cytokinèse de cellules en culture*

Dans les cellules humaines, des résultats du groupe du Dr Prekeris montrent que Rab11 et FIP3 régulent la cytokinèse tardive (Wilson, Fielding et al. 2005). D'abord, Wilson et al. montre qu'entre 20 et 30% des cellules déplétées en Rab11 ou en FIP3 présentent de la binucléation et que le temps d'abscission de ces cellules est significativement augmenté. Cet article montre aussi que des vésicules FIP3 se déplacent du RE péricentrosomal jusqu'au sillon de clivage/midbody lors de la cytokinèse. Il est intéressant de noter que bien que Rab11 soit nécessaire pour recruter FIP3 sur les membranes, un mutant de FIP3 qui ne lie pas Rab11 est tout de même recruté au *midbody* (Wilson, Fielding et al. 2005).

Fielding et al. démontrent ensuite une nouvelle interaction entre les FIPs de classe II et Arf6, et montrent que Rab11 et Arf6 peuvent lier simultanément FIP3 ou FIP4. Ils observent que Arf6 est nécessaire au recrutement de FIP3 et Rab11 au *midbody* par sa liaison au membre de l'*exocyste* Exo70p, qui est lui-même localisé au *midbody* (Fielding, Schonteich et al. 2005). Il avait déjà été suggéré que Arf6 interagisse avec le complexe de l'*exocyste* au *midbody* (Prigent, Dubois et al. 2003, Gromley, Yeaman et al. 2005).

Schiel et al. identifient ensuite les différents cargos acheminés au *midbody* par les endosomes FIP3 lors de la cytokinèse tardive (Schiel, Simon et al. 2012). Les auteurs se sont intéressés aux différentes protéines appelées *secretory carrier membrane proteins* (SCAMPs, 5 protéines chez l'humain, un orthologue chez la Drosophile), de par la capacité de SCAMP3 à lier TSG101 (Aoh, Castle et al. 2009), un membre du complexe de l'*exocyste*, et de par la localisation endosomale des protéines SCAMPs (Castle and Castle 2005). Les auteurs montrent que SCAMP2 est localisée au pont intercellulaire dépendamment de FIP3 et que 4 à 10% des cellules au sein de la population totale montrent de la binucléation suivant la co-déplétion de SCAMP2 et de SCAMP3. En procédant ensuite à une immunoprécipitation de vésicules FIP3 suivie de spectrométrie de masse pour identifier les protéines contenues dans ces vésicules, les auteurs ont identifié la protéine p50RhoGAP. Ils ont par la suite observé que



p50RhoGAP distribue de façon FIP3 dépendante au *midbody* et que sa déplétion mène à des défauts de cytokinèse de l'ordre de 8 à 12% au sein de la population totale. Enfin, les auteurs montrent que les protéines SCAMP2-3 et p50RhoGAP sont nécessaires pour dépolymériser les filaments d'actine lors de la cytokinèse tardive. Ces filaments d'actine présents dans le pont intercellulaire doivent être dépolymérisés afin de permettre le recrutement du complexe ESCRT au *midbody* (Schiel, Simon et al. 2012). Le complexe ESCRT est indispensable pour l'étape finale d'abscission (Guizetti, Schermelleh et al. 2011).

#### *Le complexe du centralspindlin serait impliqué lors du trafic vésiculaire*

Le *centralspindlin* est un complexe hétérotétramérique composé de deux molécules de la kinésine-6, MKLP1 (ou Pavarotti -Pav- chez la Drosophile), et de deux molécules de MgcRacGAP, comprenant un domaine GAP prédit pour cibler les membres de la famille des Rho (Mishima, Kaitna et al. 2002, Mishima, Pavicic et al. 2004, Pavicic-Kaltenbrunner, Mishima et al. 2007). Le *centralspindlin* régule l'activation spécifique de RhoA dans la zone de contraction préétablie en mobilisant la RhoGEF Ect2 (Tatsumoto, Xie et al. 1999, Yuce, Piekny et al. 2005, Nishimura and Yonemura 2006, Hutterer, Glotzer et al. 2009), régule l'assemblage de l'anneau de contraction (Zhao and Fang 2005, D'Avino, Takeda et al. 2008) et l'activité kinésine de MKLP1 est essentiel à la formation du fuseau central (Mishima, Kaitna et al. 2002). Certains régulateurs de la cytokinèse, dont Nesd chez la Drosophile et son orthologue SHBCP1 chez l'humain, peuvent lier les membres du *centralspindlin* (Montembault, Zhang et al. 2010, Asano, Hasegawa et al. 2014).

Le groupe de Prekeris a montré que MgcRacGAP lie directement FIP3, indépendamment de la liaison de FIP3 à Rab11 ou à Arf6, et que cette interaction a lieu principalement en fin de cytokinèse. La déplétion de MKLP1 abolit le recrutement de FIP3 au *midbody*. Puisque Ect-2 possède une affinité plus grande pour MgcRacGAP que FIP3, il a été suggéré que FIP3 serait recrutée au *midbody* par MgcRacGAP suivant le départ de Ect2 du *midbody* (Simon, Schonteich et al. 2008).

#### *Relation entre Rab11 et le PtdIns4P lors de la cytokinèse des spermatocytes*

Chez la *Drosophila*, la division méiotique des spermatocytes est un modèle d'étude de la cytokinèse. Rab11 est un régulateur clé de la cytokinèse des spermatocytes et des pertes de fonction de *rab11* mènent à des défauts de cytokinèse de l'ordre de 15 à 40%, dépendamment des allèles de *rab11* utilisés. Rab11 est enrichie au Golgi (et non dans une population RE pericentrosomale) et au sillon de clivage lors de la cytokinèse. Une perte de fonction de *rab11* affecte principalement la stabilité du pont intercellulaire et la distribution de vésicules dérivées du Golgi. La distribution de Rab11 au sillon de clivage est dépendante de sa liaison à son effecteur Fwd (Giansanti, Belloni et al. 2007). Rab11 colocalise avec Fwd sur les membranes du Golgi. Fwd est nécessaire pour l'enrichissement des vésicules Rab11 en PtdIns4P et Rab11 régule le transport de ces vésicules au sillon de clivage. Rab11 régule la cytokinèse en aval de Fwd, tel que démontré par des interactions génétiques entre *fwd* et *rab11* (Polevoy, Wei et al. 2009).

GOLPH3, un effecteur de Rab11, localise sur des membranes enrichies en PtdIns4P chez les spermatocytes et une perte de fonction de *GOLPH3* mène à des défauts de cytokinèse. GOLPH3 stabilise le sillon de clivage et régule en partie la localisation du complexe du *centralspindlin* et de Rab11 en interagissant avec Pav et avec Rab11 (Sechi, Colotti et al. 2014).

Une mutation dans le gène *brunelleschi* (*bru*), soit une sous-unité du complexe TRAPPII, mène à des défauts de cytokinèse chez les spermatocytes. *bru* et *rab11* interagissent génétiquement et une perte de fonction de *bru* empêche la distribution de Rab11 au sillon de clivage. *bru* interagit génétiquement aussi avec *fwd*, suggérant que *bru* participe au déplacement de membrane entre le Golgi et le sillon de clivage (Robinett, Giansanti et al. 2009) (*Table 1.III*).

#### *FIPs de classe I*

Bien que le rôle des Rab11-FIPs de classe II lors de la cytokinèse a été démontré dans différents modèles cellulaires, aucune étude n'a montré de fonction pour les Rab11-FIPs de classe I dans ce processus cellulaire. Il a toutefois été observé que FIP5 localise au *midbody* lors de la cytokinèse des cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) (Li, Mangan et al. 2014).

Table 1.III : Sommaire des protéines régulant la distribution de Rab11 et leur localisation subcellulaire, leur fonction cellulaire et le taux de bi ou multinucléation associé à leur perte de fonction sont indiqués.

Protéine	Localisation	Fonction	Défaut de cytokinèse	Ref.
Fwd	Golgi	Phosphatidylinositol 4-kinase	~100%	(Polevoy, Wei et al. 2009)
GOLPH3	Golgi	Traffic membranaire depuis le Golgi	>70%	(Sechi, Colotti et al. 2014)
Bru	Golgi	Traffic membranaire depuis le Golgi	>80%	(Robinett, Giansanti et al. 2009)
Arf6	Endosome, membrane plasmique, <i>midbody</i>	Traffic membranaire	>80%	(Dyer, Rebollo et al. 2007)
Pavarotti	Fuseau central, <i>midbody</i>	Membre du complexe <i>centralspindlin</i>	>75%	(Goshima and Vale 2003)

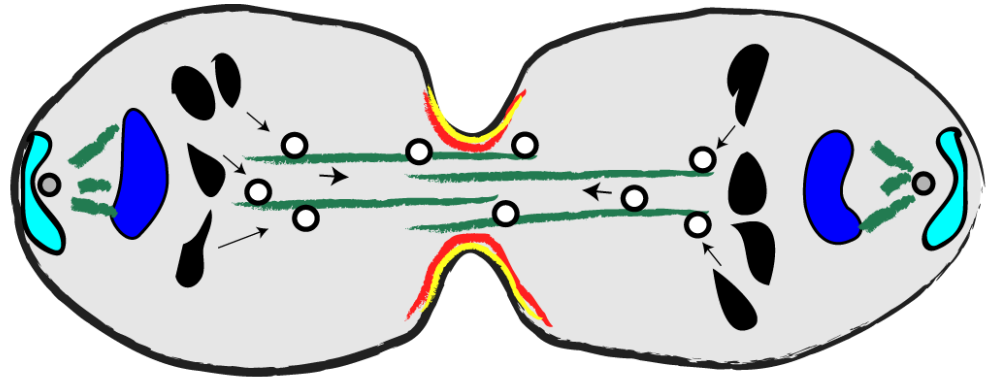
### 1.3.2.3. Rab35 et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

Il est intéressant de noter que parmi les 27 Rabs exprimées chez la Drosophile, seules les déplétions de Rab5, Rab11 et de Rab35 ont mené à des défauts de cytokinèse significatifs lors d'un crible RNAi en cellules S2 de Drosophile (Kouranti, Sachse et al. 2006). La déplétion de Rab35 donne les défauts de cytokinèse les plus pénétrants, alors que les défauts reliés à la déplétion de Rab5 ou de Rab11 sont plus subtils. Lors de la division cellulaire, Rab5 est impliquée dans l'alignement des chromosomes en métaphase (Capalbo, D'Avino et al. 2011) et aucun lien direct entre Rab5 et la cytokinèse n'a été relaté. De son côté, le rôle de Rab35 a été bien caractérisé ces dernières années et sa fonction lors de la cytokinèse est étroitement liée à l'homéostasie du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> au sillon de clivage et au *midbody*.

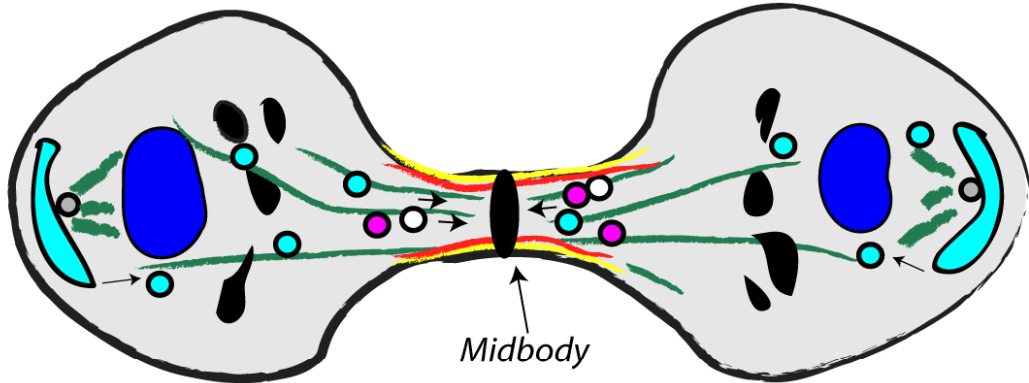
Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est synthétisé *de novo* dans le sillon de clivage principalement par la phosphorylation du PtdIns4P par une PtdIns4P5-kinase (Emoto, Inadome et al. 2005). Le

PtdIns(4,5) $P_2$  est essentiel pour la stabilité du sillon de clivage après ingression (Emoto, Inadome et al. 2005, Field, Madson et al. 2005) et remplit cette fonction entre autres en liant directement la protéine d'échafaudage Anilline (Liu, Fairn et al. 2012). Anilline joue un rôle crucial dans la stabilité du sillon de clivage et dans l'ingression symétrique du sillon en interagissant avec les protéines RhoA, myosin II, actin (Piekny and Glotzer 2008), Ect2 (Frenette, Haines et al. 2012), et le *centralspindlin* (D'Avino, Takeda et al. 2008). Anilline permet aussi l'ancrage de l'anneau de contraction à la membrane plasmique (Kechad, Jananji et al. 2012, Liu, Fairn et al. 2012). Le PtdIns(4,5) $P_2$  doit être hydrolysé en PtdIns4P lors de la cytokinèse tardive par OCRL (Ben El Kadhi, Roubinet et al. 2011, Dambournet, Machicoane et al. 2011), une PtdIns5P-phosphatase dont le recrutement au pont intercellulaire est dépendent du trafic par Rab35 (Kouranti, Sachse et al. 2006, Dambournet, Machicoane et al. 2011).

Le groupe du Dr Echard a activement participé à la caractérisation de Rab35 lors de la cytokinèse. Ce groupe a démontré que Rab35 régule le recyclage rapide de cargo (en étudiant le recyclage de TfR) et donc contrôle une voie probablement distincte de celle de Rab11. La déplétion de Rab35 relocalise le PtdIns(4,5) $P_2$  sur des vacuoles dans les cellules HeLa (Kouranti, Sachse et al. 2006), phénotype similaire à la déplétion de OCRL dans des cellules S2 de Drosophile (Ben El Kadhi, Roubinet et al. 2011). Ce groupe a ensuite montré que OCRL interagissait avec Rab35::GTP et localisait au pont intercellulaire dépendamment de Rab35. Ce groupe a aussi observé des défauts d'abscission et une accumulation anormale de PtdIns(4,5) $P_2$  et de F-actine au pont intercellulaire chez des cellules dont les protéines Rab35 ou OCRL ont été déplétées. La dépolymérisation de l'actine par la molécule *Latrunculine A* permet de sauver partiellement les défauts observés lors de la déplétion de Rab35 ou de OCRL, suggérant que OCRL est acheminé par Rab35 au pont intercellulaire, permettant d'hydrolyser le PtdIns(4,5) $P$  en PtdIns4P menant à la dépolymérisation de l'actine nécessaire aux étapes d'abscission (Dambournet, Machicoane et al. 2011).

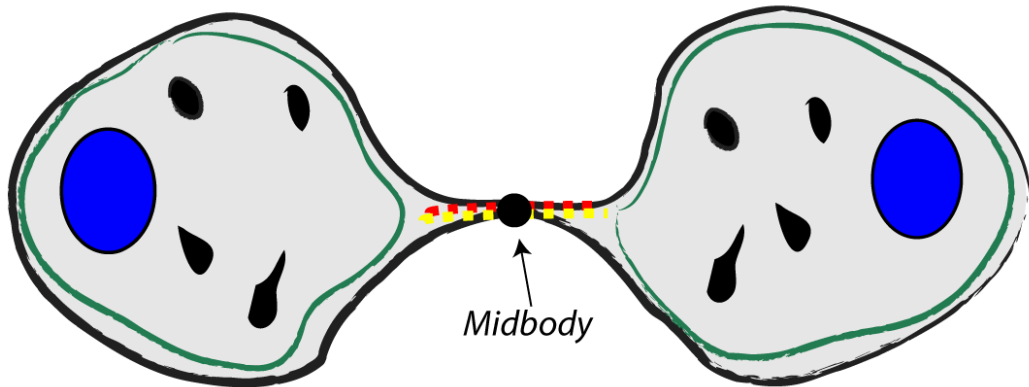


○ Vésicule Rab11 (enrichie en PtdIns4P enriched, dérivé du Golgi)



● Vésicule Rab35 (contient la phosphatase OCRL)

● Vésicule FIP3 (contient p50RhoGAP et Scamp)



RE péricentriolaire

Domaine enrichie en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

Anneau d'actine-myosine

Microtubule

ADN



Golgi (éclaté dans les cellules de *Drosophile*)

Figure 1.7 : Synthèse et représentation schématique du rôle des endosomes Rab11/FIP3(+) et Rab35(+) chez les cellules humaines et de Drosophile. Les vésicules Rab11(+) enrichies en PtdIns(4)*P* quittent le Golgi et délivrent leur contenu au sillon de clivage. Le PtdIns(4)*P* est utilisé pour synthétiser du PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> par une PtdIns4*P*5-kinase. Le PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> est un acteur majeur de la cytokinèse. En fin de cytokinèse, les vésicules FIP3(+) acheminent p50RhoGAP et Scamp, deux protéines essentielles pour la dépolymérisation des filaments d'actine au pont intercellulaire. Les vésicules Rab35(+) sont essentielles pour acheminer OCRL, une PtdIns5*P*-phosphatase, aussi au pont intercellulaire. OCRL est nécessaire pour hydrolyser le PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> en fin de cytokinèse. L'hydrolyse du PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> et la dépolymérisation des filaments d'actine sont nécessaires pour les étapes d'abscission subséquentes.

### **1.3.3. Division asymétrique des SOPs**

La première division asymétrique des cellules précurseurs des organes sensoriels (SOPs) chez la Drosophile résulte en deux cellules filles (appelées pIIb et pIIa) aux destins cellulaires différents. Rab11 est localisé au RE péracentrosomal de la cellule fille pIIb et promeut, spécifiquement dans cette cellule fille, le recyclage de Delta, un ligand transmembranaire du récepteur Notch. Le recyclage de Delta dans la cellule fille pIIb permet, conjointement avec d'autres mécanismes cellulaires, de ne promouvoir la signalisation Notch que dans la cellule pIIa. La signalisation Notch spécifie un destin cellulaire différent dans la cellule pIIa, en comparaison avec la cellule fille pIIb. La localisation de Rab11 au RE péracentrosomal dans la cellule fille pIIb est dépendante de sa liaison à Nuf (Emery, Hutterer et al. 2005).

### **1.3.4. Trafic de la E-cadhérine lors de la polarité épithéliale**

Les cellules épithéliales sont composées de deux domaines membranaires, l'un apical et l'autre basolatéral, dont la composition en lipide et en protéine diffère. Ces domaines sont séparés entre autres par les jonctions adhérentes comprenant la E-cadherin (E-cad) qui contribuent aux contacts cellule-cellule.

#### **1.3.4.1. Rôle de FIP2 indépendant de Rab11 lors de l'établissement de la polarité dans les cellules MDCK**

Le trafic de la E-Cad par Rab11 dans les cellules MDCK épithéliales polarisées de rein de chien est controversé. Certaines recherches montrent que l'expression de Rab11<sup>DN</sup> empêche la E-cad de se rendre aux jonctions adhérentes (Lock and Stow 2005, Desclozeaux, Venturato et al. 2008), alors qu'une autre étude du groupe du Dr Goldenring observe que l'expression de Rab11<sup>DN</sup> n'altère pas le trafic de la E-cad (Lapierre, Avant et al. 2012). Cette dernière étude suggère aussi que Rab11 et FIP2 ne régulent pas les mêmes voies de transport (Lapierre, Avant et al. 2012).

##### *La phosphorylation de FIP2 et FIP5 est essentielle à leur fonction*

Des études entreprises par le groupe du Dr Goldenring montre que la fonction de FIP2 dans la régulation de la polarité est intrinsèquement liée à sa phosphorylation par la protéine kinase Par-1 sur la serine 227. En effet, un mutant non phosphorylable et un mutant phosphomimétique de FIP2 inhibent la formation des jonctions adhérentes en inhibant le trafic de la E-cad à ces jonctions (Ducharme, Hales et al. 2006, Lapierre, Avant et al. 2012). Puisque ce groupe suggère que Rab11 n'est pas impliqué dans le recyclage de la E-cad (Lapierre, Avant et al. 2012), ce groupe propose que la fonction de FIP2 dans le contexte de la polarité épithéliale des cellules MDCK est indépendante de sa liaison à Rab11.

Il est intéressant de noter que la phosphorylation de FIP5 par ERK (Su, Bryant et al. 2010) et GSK3 (Li, Mangan et al. 2014) régule la fonction de FIP5 dans les cellules MDCK lors de la transendocytose de l'immunoglobuline A et dans la formation de la lumière apicale, respectivement.

#### **1.3.4.2. Rab11 lors de la polarité épithéliale chez la Drosophile**

Une première étude dans les cellules épithéliales de Drosophile montre l'importance du complexe *exocyste* (dont Sec15) pour réguler le transport de la E-Cad du RE vers des sites précis sur la membrane plasmique. Le rôle de Rab11 n'a cependant pas été étudié (Langevin, Morgan et al. 2005). Une étude montre ensuite que les toxines libérées par la bactérie *Bacillus anthracis*, causant la maladie du charbon (*Anthrax*), ciblent spécifiquement

l'interaction Rab11/Sec15 et cause notamment une réduction de la E-Cad aux jonctions adhérentes de cellules épithéliales de disques imaginaux de *Drosophile*. Les auteurs montrent que ces toxines fonctionnent similairement dans les cellules humaines (Guichard, McGillivray et al. 2010). Dans les cellules souches de la lignée germinale de l'ovaire de la *Drosophile*, une perte de fonction de *rab11* mène à des défauts de trafic de la E-cad à la membrane plasmique (Bogard, Lan et al. 2007). Dans les cellules polarisées de la trachée, la E-Cad est distribuée à la membrane plasmique dépendamment de Rab11 et de Rip11 (Shaye, Casanova et al. 2008). D'autres études montrent que la E-cad est distribuée par Rab11 dans l'ectoderme de l'embryon (Roeth, Sawyer et al. 2009), dans les neurones (Kawauchi, Sekine et al. 2010) et dans les cellules folliculaires de la chambre d'œuf (Xu, Lan et al. 2011). Enfin, une divergence persiste sur le rôle de Rab11 dans le trafic de la E-Cad au travers du groupe des cellules de bordure lors de la migration collective (Assaker, Ramel et al. 2010, Cobreros-Reguera, Fernandez-Minan et al. 2010, Wan, Wang et al. 2013).

## **1.4. Présentation des protéines 14-3-3**

Les petites GTPases sont utiles en tant qu'interrupteur moléculaire dans la cellule. D'autres mécanismes cellulaires sont possibles pour permettre la régulation rapide et ordonnée de différentes voies de signalisation. La phosphorylation et la déphosphorylation de protéines sont des mécanismes très bien caractérisés et sont des événements clés lors de la transduction de signaux cellulaires. Les protéines 14-3-3 ont la propriété de lier des protéines phosphorylées et s'intègrent ainsi dans la régulation de voie de signalisation phospho-dépendante. Nous avons identifié une interaction entre 14-3-3 et Rip11 et la caractérisation de cette interaction sera présentée au chapitre 4.

### **1.4.1. Structure des protéines 14-3-3**

Les protéines 14-3-3 forment une famille de protéines hautement conservées (2 isoformes chez la *Drosophile* et 7 chez l'humain) qui forment des homo et hétérodimères stables (Gardino and Yaffe 2011). Ces protéines peuvent lier plus de 200 protéines cibles et modulent ainsi plusieurs mécanismes cellulaires. La configuration tridimensionnelle de 14-3-3 correspond à un « U » dont la cavité, appelée cavité de liaison des substrats, peut accommoder



deux peptides provenant de partenaires de liaison (substrat) (Liu, Bienkowska et al. 1995). Dans cette cavité se trouvent plusieurs acides aminés basiques qui forment une poche chargée positivement. Cette poche interagit avec les résidus phosphorylés des substrats (Liu, Bienkowska et al. 1995, Petosa, Masters et al. 1998).

### **1.4.2. Mode de reconnaissance des cibles protéiques par 14-3-3**

Les protéines 14-3-3 reconnaissent des motifs contenant une phosphorylation sur un résidu sérine ou thréonine (Muslin, Tanner et al. 1996). Il existe trois types de motifs de liaison à 14-3-3 soient: le mode I R[S/Φ][+]pSXP, le mode II RX[Φ/S][+]pSXP et le motif III pSX<sub>1-2</sub>-COOH où pS est une sérine phosphorylée (la sérine peut être une thréonine), Φ est un résidu aromatique, + est un résidu basique et X peut être n'importe quel acide aminé (Johnson, Crowther et al. 2010). Ces séquences de liaison ne sont pas exclusives. Par exemple, le peptide R18 est un antagoniste puissant de 14-3-3 et lie fermement la cavité de liaison des substrats, sans être lui-même phosphorylé (Petosa, Masters et al. 1998).

#### **1.4.2.1. Mécanismes d'action des protéines 14-3-3**

14-3-3 module l'activité ou la conformation de ses substrats par différents mécanismes d'action : *i)* induction d'un changement conformationnel direct des substrats, *ii)* occlusion d'une séquence spécifique ou d'une structure particulière des substrats et *iii)* stabilisation d'un complexe multiprotéique (Reinhardt and Yaffe 2013).

### **1.4.3. Rôles de 14-3-3 dans la cytocinèse**

Une première étude montre que 14-3-3 régule la cytocinèse indirectement de par sa capacité à contrôler la traduction de protéine en mitose. Wilker et al. montre d'abord que la déplétion de 14-3-3σ dans des cellules en culture cause des défauts de cytocinèse de l'ordre de 12 et 18%. Les auteurs observent ensuite que la déplétion de 14-3-3σ bloque la transcription de la kinase p58 PITSLRE. Le phénotype de binucléation causé par la déplétion de 14-3-3σ peut être sauvé en forçant l'expression de p58 PITSLRE (Wilker, van Vugt et al. 2007).

Une deuxième étude montre que 14-3-3 séquestre MKLP1 et inhibe la formation du complexe *centralspindlin*. Douglas et al. montre que 14-3-3 lie MKLP1 lorsque celle-ci est

phosphorylée au site S710 et empêche la formation du complexe du *centralspindlin in vitro*. La liaison de 14-3-3 à MKLP1 est inhibée lorsque MKLP1 est phosphorylé au site S708 par Aurora B. MKLP1 phosphorylée au site S708 localise au fuseau central. Les auteurs suggèrent que 14-3-3 est donc un inhibiteur global de la formation du *centralspindlin* et que Aurora B permet d'activer localement la formation du *centralspindlin* sur le fuseau central (Douglas, Davies et al. 2010).

Une dernière étude dévoile une interaction entre Arf6 et MKLP1 et démontre que cette interaction est nécessaire pour empêcher MKLP1 de lier 14-3-3 au *midbody* et ainsi éviter la désintégration de ce dernier. Joseph et al., montrent que la région liée par Arf6 sur MKLP1 chevauche la région liée par 14-3-3, mais n'est pas identique. Les auteurs montrent ensuite que la liaison entre Arf6 et MKLP1 est essentielle pour la cytocinèse principalement pour la formation du *midbody* à l'aide d'une protéine mutante de MKLP1 ne pouvant pas lier Arf6. Les auteurs montrent enfin que la déstabilisation du *midbody* causée par la perte d'interaction entre Arf6 et MKLP1 peut être sauvée en inhibant l'interaction entre MKLP1 et 14-3-3 (Joseph, Hutterer et al. 2012).

#### **1.4.4. Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans le trafic vésiculaire**

Le rôle de 14-3-3 lors du trafic vésiculaire est peu étudié. Toutefois, les études présentées dans cette section dévoilent un rôle important pour 14-3-3 dans la régulation du transport vésiculaire.

Shandala et al. montrent qu'une perte de fonction de *14-3-3ε* phénotype la déplétion de *rab4* ou de *rab11* sur le recyclage de Drosopycine qui s'accumule près de la membrane plasmique des *fat body cells*. La Drosopycine est un peptide antimicrobien sécrété par les *fat body cells* lors d'infection bactérienne chez la Drosophile. Aussi, lors d'essais de colocalisation, les auteurs montrent que Rab11 et 14-3-3ε se retrouvent à très grande proximité dans ces mêmes cellules (Shandala, Woodcock et al. 2011).

Chez *C. elegans*, un crible pangénomique basé sur l'imagerie du vers conçu pour trouver des régulateurs de RAB-11.1 a permis d'identifier 14-3-3 (PAR-5 chez *C. elegans*) comme un régulateur indirect de la localisation de RAB-11.1. En effet, la déplétion de *par-5*

mène à une déstructuration du cytosquelette d'actine (par le changement d'activité de différentes protéines régulatrices de la dynamique de l'actine) et une redistribution de RAB-11.1 sur des sites ectopiques d'actine (Winter, Hopfner et al. 2012).

Le transporteur de glucose 4 (GLUT4) est entreposé dans des vésicules d'entreposage intracellulaires (GSVs). La présence d'insuline cause le déplacement et la fusion rapide de ces GSVs avec la membrane plasmique. Le transport des GSV est régulé par la protéine Rab-GAP AS160 (contenant un domaine TBC) (Sano, Kane et al. 2003). L'activité GAP de AS160 est modulée par phosphorylation (Kane, Sano et al. 2002). La phosphorylation de AS160 par Akt (Kane, Sano et al. 2002) stimule une interaction entre AS160 et 14-3-3 et mène à l'inactivation subséquente de son activité GAP (Tan, Ng et al. 2012). La mutation des sites phosphorylés par des résidus non phosphorylables (générant un mutant incapable de lier 14-3-3) crée un AS160 constitutif actif. De façon intéressante, la fusion du peptide R18 au mutant AS160 constitutif actif rétablit son activité GAP à un niveau normal (Tan, Ng et al. 2012). L'intégration de 14-3-3 dans cette voie de signalisation permet d'inhiber l'activité catalytique d'AS160 et de permettre le transport des GSV vers la membrane plasmique suite à une réponse à l'insuline.

## 1.5. Questions et objectifs de recherche

Nous avons aujourd'hui une bonne connaissance de l'identité de la majorité des régulateurs clés du trafic vésiculaire et de leurs fonctions biochimiques. L'un des défis actuels qui s'imposent repose sur la caractérisation des mécanismes moléculaires qui assurent, en aval des signaux cellulaires, la coordination entre le trafic vésiculaire et la distribution de cargos à la membrane appropriée lors d'une situation biologique normale ou pathologique. Nous contribuons à répondre à ce défi en caractérisant la régulation de l'activité de Rab11 chez la *Drosophile*. Plus spécifiquement, nous :

- i)* adressons la fonction de Rab11 lors de la migration cellulaire collective *in vivo* (chapitre 2)
- ii)* étudions l'identité de la GAP de Rab11 lors de la migration cellulaire collective *in vivo* (chapitre 3)
- iii)* examinons une nouvelle interaction entre l'effecteur de Rab11, Rip11, et les protéines d'échafaudage 14-3-3 lors de la division cellulaire.



## CHAPITRE 2

### ARTICLE

Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell  
movement

*Nature cell biology, 2013*

## **2. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements**

Damien Ramel<sup>1</sup>, Xiaobo Wang<sup>2</sup>, Carl Laflamme<sup>1</sup>, Denise J. Montell<sup>2</sup> and Gregory Emery<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) and Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

<sup>2</sup>Department of Biological Chemistry, Center for Cell Dynamics, Johns Hopkins School of Medicine

\*To whom correspondence should be addressed

## 2.1. Contribution des coauteurs

Cet article démontre que Rab11 est un nouveau régulateur de la communication cellulaire entre les BCs lors de la migration collective. J'ai participé à la caractérisation du mécanisme moléculaire impliqué dans ce nouveau rôle associé à Rab11. J'ai identifié par spectrométrie de masse un nouveau partenaire de Rab11, soit la Moésine, et j'ai confirmé cette interaction par *GST pull down*. J'ai aussi montré, à l'aide d'un algorithme de segmentation de vésicule développé dans notre *JBC 2012* (chapitre 3), que la Moésine n'est pas en amont de Rab11. Ma participation se limite donc à la Figure 2.4a, Figure 2.9 (Supp.4)a et b et le Tableau (Table) 2.I.

## 2.2. Abstract

Collective cell movements contribute to development and metastasis. The small GTPase Rac is a key regulator of actin dynamics and cell migration but the mechanisms that restrict Rac activation and localization in a group of collectively migrating cells are unknown. Here, we demonstrate that Rab5 and Rab11 regulate Rac activity and polarization during collective cell migration. We use photoactivatable forms of Rac to demonstrate that Rab11 acts on the entire group to ensure that Rac activity is properly restricted to the leading cell through regulation of cell-cell communication. In addition, we show that Rab11 binds to the actin cytoskeleton regulator Moesin and regulates its activation *in vivo* during migration. Accordingly, reducing Moesin activity also affects cell-cell communication, whereas expressing active Moesin rescues loss of Rab11 function. Our model suggests that Rab11 controls the sensing of the relative levels of Rac activity in a group of cells leading to the organization of individual cells in a coherent multicellular motile structure.



## 2.3. Introduction

Collective cell migration emerges as a fundamental mode of migration that is widely used during the development of multicellular organisms (Rorth 2009) and in pathological conditions such as cancer (Thiery 2009, Yilmaz and Christofori 2010) (Montell 2008, Friedl and Gilmour 2009). In *Drosophila*, border cells are a powerful model to study collective cell migration allowing the combination of cell biology and genetics *in vivo* (Brumby and Richardson 2005, Prasad, Wang et al. 2011). During *Drosophila* oogenesis, border cells perform a stereotypic migration between the germ cells toward the oocyte (Rorth 2002, Montell 2003, Montell, Yoon et al. 2012) (Figure 2.1a). Directional information is provided by ligands of two receptor tyrosine kinases (RTKs), the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor receptor (PVR) (the *Drosophila* homolog of vertebrate PDGF and VEGF receptors) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Duchek and Rorth 2001, Duchek, Somogyi et al. 2001, Rorth 2002, McDonald, Pinheiro et al. 2003, McDonald, Pinheiro et al. 2006). A signaling cascade activated by both RTKs leads to the activation of Rac1 which is both necessary (Murphy and Montell 1996) and sufficient to direct border cell migration when activated focally through the formation of protrusions (Wang, He et al. 2010). Recently, we have shown that border cell migration requires the small GTPases Rab5 and Rab11 that regulate trafficking through the early and the recycling endosome (RE), respectively (Assaker, Ramel et al. 2010). Moreover, we identified a genetic interaction between Rac1 and Rab11 (Assaker, Ramel et al. 2010). Although these data highlight the importance of endocytosis for collective cell migration, the mechanistic links between Rac and endocytosis remain unknown.

## 2.4. Results

Rab5SN and Rab11SN share the same phenotypes in terms of active RTK localization (Assaker, Ramel et al. 2010) (Figure 2.6(Supp.1)a-c), however, Rab5SN expression induces a more severe phenotype than Rab11SN in terms of distance migrated in the egg chamber (Assaker, Ramel et al. 2010). This effect was not due to a loss of general polarity as the staining of apical/basal polarity markers (Pinheiro and Montell 2004) was unaffected by the expression of Rab11SN or Rab5SN (Figure 2.6(Supp.1)d-i). Thus, Rab5 and Rab11 might regulate RTK polarization through two independent mechanisms impacting differently on cluster morphology. To test this hypothesis, we first performed a phenotypic analysis on clusters expressing Lifeact fused to GFP. At the onset of migration, control clusters exhibit one major protrusion toward the leading edge (Figure 2.1b). By contrast, *Rab11SN* expression induces the formation of numerous ectopic protrusions (Figure 2.1, b-c). This pattern is conserved later during the migration process since *Rab11SN* expressing clusters produce more protrusions after 25%-50% of migration compared to control clusters (Figure 2.1c). After expression of *Rab5SN* we observed an absence of protrusion, a phenotype also observed when Rac activity is abolished by expression of dominant negative Rac (RacN17, Fig 2-1, b-c). To quantify the spatial distribution of protrusions, we designed a radar map dividing the cluster into 8 sectors (Figure S2). At the onset of migration, control clusters display a characteristic pattern of protrusions aligned toward the direction of migration, whereas *Rab11SN* expressing clusters have lost this pattern and present a more spread orientation (Figure 2.1d). After 25%-50% of migration, protrusions have conserved a strong bias toward the direction of migration in control clusters, whereas they lost directionality in *Rab11SN* expressing clusters (Figure 2.1e). Together, these data highlight the different roles of Rab11 and Rab5 in regulation of protrusion dynamics.

Since Rac is the main driving force for protrusion formation in border cells (Murphy and Montell 1996, Wang, He et al. 2010), and Rab5 endosomes are required for Rac activation in a single cell migration model (Palamidessi, Frittoli et al. 2008), we next analyzed Rac activity and localization in *Rab5SN* and *Rab11SN* expressing clusters. For this we took advantage of the Rac Förster resonance energy transfer (FRET) probe that has been adapted

for *Drosophila* (Itoh, Kurokawa et al. 2002, Wang, He et al. 2010). We monitored Rac activation in time and space in living egg chambers at the onset of migration (Figure 2.1f-t). In control conditions, the FRET signal exhibits a reproducible spatiotemporal pattern, with a higher signal in the leading cell (Figure 2.1f-j). Expression of *Rab5SN* eliminated any detectable FRET signal, demonstrating that endocytosis is required for Rac activation in border cells (Figure 2.1k-o and u). Expression of *Rab11SN* had no detectable effect on the overall level of activation of Rac (Figure 2.1p-t and u). However, the distribution of the FRET signal was abnormal. Indeed, high FRET signal alternated in different cells and did not stay at fixed position or was present simultaneously in multiple cells of the cluster (Figure 2.1p-t). To determine the persistence of Rac activity, we measured the FRET index specifically in the leading cell over time (as described in Figure 2.8(Supp.3)). We found that Rac activity was fluctuating over time upon expression of *Rab11SN*, as compared to control (Figure 2.1v and w). Still, we observed a strong Rac activity at the front of 20% of the clusters. Accordingly, some clusters expressing *Rab11SN* migrate at 75% to 100% of the migration distance (Assaker, Ramel et al. 2010). Together, these data show that Rab11 is required for the polarization and the persistence of Rac activity at the leading cell of a collectively migrating cluster.

To further investigate the link between Rab5, Rab11 and Rac, we used the photoactivatable analog of the active form of Rac (PA-RacQ61L), that is able to direct the migration of border cells (Figure 2.2 a-d) and was shown to inhibit formation of protrusions in the rest of the cluster (Wang, He et al. 2010, Wu, Wang et al. 2011). We predicted that migration of *Rab11SN* expressing clusters would not be rescued by local Rac activation because of competition of endogenous non-polarized Rac activity. By contrast, expression of *Rab5SN* should be rescued by PA-RacQ61L due to absence of competition of endogenous Rac. Consistent with the observation in fixed cells (Fig 1), *Rab11SN* expressing clusters displayed protrusions in all directions before phototreatment. Photoactivation of Rac induced local protrusions but failed to rescue migration of *Rab11SN* expressing cells (Figure 2.2e-h and u). Moreover, PA-RacQ61L did not inhibit formation of protrusions outside the illuminated area, indicating that Rab11 is involved in the cell-cell communication process required for cells to sense the relative level of Rac activity in adjacent cells (Figure 2.2e). In

accordance with our model, photoactivation of Rac in a *Rab5SN* expressing cluster was able to restore migration to the level of control clusters (Figure 2.2m-p and u). These effects were indeed due to local Rac activation since a mutant form of PA-RacQ61L that is insensitive to light (C450M) had no effect (Fig 2-2i-l and q-t). Taken together, these data show that Rab5 and Rab11 act at two different levels for Rac regulation. Rab5 acts on the activation of Rac whereas Rab11 is implicated in the control of the spatiotemporal pattern of Rac activity in the entire cluster.

To assess the potential function of Rab11 in cell-cell communication, we considered the morphological consequences of local inactivation of Rac by light, using a photoactivatable dominant negative form of Rac (PA-RacT17N). Illumination of the leading cells in a cluster expressing *PA-RacT17N* arrested migration (Wang, He et al. 2010) and led to formation of protrusions in the other cells of the cluster in all directions, but with a bias toward the leading edge (Figure 2.3a-c,j, k). In contrast, the cluster shape is unchanged when PA-RacT17N is locally activated in a *Rab11SN* background. Indeed, before phototreatment *Rab11SN* expressing clusters exhibit protrusions in all directions and this pattern is maintained after inhibition of Rac (Figure 2.3d-f, g, j). These data show that there is a strong defect of communication between border cells in *Rab11SN* expressing clusters. After *Rab5SN* expression, we observed that illumination of PA-RacT17N, did not induce ectopic protrusions (Figure 2.3g-i, k). This effect reflects the absence of Rac activity in these clusters. However, we observed a contraction of the cluster (Figure 2.3l) showing a global response to local inactivation of Rac, suggesting that communication is not affected. Together, these results demonstrate that Rab11 is a regulator of cell-cell communication during collective cell migration.

To investigate the molecular mechanism by which Rab11 regulates cell-cell communication, we searched for interactors of Rab11. We immobilized recombinant Glutathione S-Transferase (GST)-Rab11 on affinity column. GST-Rab11 was then loaded with GDP or GTP $\gamma$ S and cytosol of *Drosophila* embryos was applied. After extensive washes and elution with the converse nucleotide, the composition of the eluate was analyzed by mass spectrometry (Supplementary Table 2.I). Our experimental conditions allowed us to identify nucleotide specific interactors of Rab11. Accordingly, we found previously known interactors

of Rab11 GTP such as Nuclear fallout (Nuf) (Riggs, Fasulo et al. 2007, Cao, Albertson et al. 2008), and interactors of Rab11 GDP such as GDP-dissociation inhibitor (GDI) (Chen, Feng et al. 1998), validating our approach. Interestingly, we found that Moesin interacts specifically with the inactive form of Rab11. We confirmed this interaction in S2 cells, by pulldown of GST-Rab11WT, SN and QL and by western blotting with both exogenous GFP-moesin and endogenous Moesin (Figure 2.4a). Moesin belongs to the highly conserved ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) protein family and is the sole ERM gene found in the genome of *Drosophila*. ERM proteins participate in the organization of the cell cortex by linking the plasma membrane with the actin cytoskeleton (Fehon, McClatchey et al. 2010, Roubinet, Decelle et al. 2011). We first assessed whether Moesin acts upstream or downstream of Rab11 in border cells. To test this, we downregulated *Moesin* by RNAi and monitored the distribution and the volume of Sec15-GFP vesicles. Sec15 is a well characterized Rab11 effector that is polarized through a Rab11-dependent mechanism (Assaker, Ramel et al. 2010). Volume measurement of Sec15-GFP vesicles is a sensitive and specific readout of Rab11 activity (Laflamme, Assaker et al. 2012). Downregulation of *Moesin* had no effect on the polarization and the volume of Sec15 vesicles (Figure 2.9(Supp.4)a,b), demonstrating that Moesin does not act upstream of Rab11. We next tested if Rab11 regulates Moesin activity. ERM proteins unfold and become activated upon binding the phospholipid PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and phosphorylation of a conserved threonine residue within the C-terminal domain (Thr 559) (Fehon, McClatchey et al. 2010). Thus, we determined if Rab11 could regulate Moesin phosphorylation by examining the localization of Moesin and its level of activation using a specific phospho- Thr 559 antibody. In control conditions, activated Moesin is located at the periphery of the cluster (Figure 2.4b). We found that expression of *Rab11SN* decreases the amount of activated Moesin, as measured by immunofluorescence of phospho-Moesin (Figure 2.4b), suggesting that Rab11 controls the activation of Moesin. This decrease was not due to a reduction of the amount of Moesin as revealed by total Moesin stainings and quantifications at nurse cell/border cell interface (Figure 2.4c and e). These effects were specific to Rab11SN since Rab5SN expression altered neither phosphorylation (Figure 2.4b and d) nor localization (Figure 2.4c, e and f) of Moesin. Moreover, we observed that Rab11SN expression induces apparition of Moesin at the boundaries between border cells (Fig 2-4c and f) correlating with

redistribution of actin at these sites (Figure 2.9(Supp.4)c and d). These data indicate that pMoesin is responsible for actin recruitment at the periphery of the cluster. To confirm this observation we decreased the amount of Moesin by RNAi and we also observed accumulation of actin at the boundaries between border cells (Figure 2.9(Supp.4)c and d). We then tested whether a phosphomimetic mutant of Moesin (Moesin-TD) is able to restore the migration in a Rab11 deficient cluster by measuring migration and completion indexes (Assaker, Ramel et al. 2010). Expression of low levels of dominant negative Rab11 (YFP-Rab11SN) leads to defects in migration (Figure 2.4g, Figure 2.9(Supp.4)e and h). Strikingly, although *Moesin-TD* expression affects migration on its own (Figure 2.4g and Figure 2.9(Supp.4)f), it was able to significantly rescue the migration defect induced by *YFP-Rab11SN* (Figure 2.4g and Figure 2.9(Supp.4)i). Consistently, expression of *Moesin-TD* in the *YFP-Rab11SN* background rescued the orientation of protrusions toward the direction of migration (Figure 2.10(Supp.5)). Overexpression of *Moesin* WT alone had no effect (Figure 4g and Figure S4g) and was not able to rescue *YFP-Rab11SN* (Figure 2.4g and Figure 2.9(Supp.4)j). Finally, Moesin-TD failed to rescue both RacN17 and Rab5SN (Figure 2.4g) showing that Moesin is downstream of Rab11, but neither of Rac nor of Rab5. Together, these findings demonstrate that Rab11 regulates Moesin activity during collective cell migration.

To confirm that Moesin acts downstream of Rab11 to ensure correct communication between cells, we decided to perform a phenotypic analysis of clusters expressing Lifeact fused to GFP in a *Moesin* loss-of-function. Severe *Moesin* loss-of-functions are not viable (Polesello, Delon et al. 2002), hence we took advantage of the RNAi technology. We tested three different *Moesin* RNAi that induce partial depletion of *Moesin*. We measured by immunofluorescence that we depleted 50% of the protein. The migration of clusters with reduced Moesin was significantly affected (Figure 2.5a) showing that Moesin is important for border cell migration. At the onset of migration, control clusters exhibit one major protrusion toward the leading edge (Figure 2.5b). By contrast, reduction of Moesin levels leads to formation of protrusions in other directions (Figure 2.5b). Spatial distribution of protrusions is also altered after 25-50% of migration by *Moesin* knockdown (Figure 2.5b). Consistently, Rac activity, measured by FRET, was altered. We found that it was still polarized but present in different cells at the front of the cluster (Figure 2.5c and d). Finally, analyzing FRET signals

in the leading cell revealed that Rac activity was inconsistent and fluctuated over time after *Moesin* depletion (Figure 2.5e). Altogether, these data show that decreasing the level of *Moesin* phenocopies *Rab11* loss of function. Thus, we hypothesize that *Moesin* is also implicated in the control of cell-cell communication. To test this, we analyzed the effect of local inactivation of Rac after knockdown of *Moesin*, using PA-RacT17N. In control conditions, inactivation of Rac in the leading cell causes formation of protrusions in other cells of the cluster (Figure 2.5f-h, l). By contrast, *Moesin* RNAi impairs the ability of the non-illuminated cells to respond to phototreatment of the leading cell (Figure 2.5i-k, l). These results confirm that *Moesin* is regulating cell-cell communication during collective cell migration. These observations provide evidence for a previously unknown mechanism coordinating Rac activity during collective cell migration. This mechanism involves Rab11, which regulates Moesin activity and the formation of a coherent actin-Moesin structure that surrounds the cluster. In turn, this ensures that Rac is spatially restricted to the leading cell.

## 2.5. Discussion

Here, we demonstrated that Rab11 is a key regulator of cell-cell communication during collective movements, critical to achieve spatial restriction of Rac activation. Previous studies of border cell migration in *Drosophila* have indicated that endocytosis regulates collective cell migration essentially *via* the regulation of guidance receptor localization. We have shown that Rab5 (this study), Rab11 and the exocyst complex control active RTK polarization at the leading edge (Assaker, Ramel et al. 2010). From this, we initially hypothesized that an endocytic cycle involving Rab5 and Rab11 is controlling collective cell migration. However, we demonstrated here that expression of *Rab5SN* and *Rab11SN* leads to different effects in terms of actin dynamics and Rac activity. The differential effects led us to propose that Rab5 and Rab11 target different mechanisms to regulate collective cell migration. Accordingly, we found that Rab5 controls Rac activity as previously shown in single cell migration models (Palamidessi, Frittoli et al. 2008). In contrary, Rab11 acts on the whole cluster to spatially resolve Rac signaling, preventing it from becoming uniformly distributed and thus inefficient for migration.

The mechanism by which cells are able to sense the relative level of Rac activity in neighboring cells remains unclear. Our study identifies both Rab11 and Moesin as major regulators of this process. We found that Moesin binds the inactive form of Rab11 suggesting that Rab11 activity is required to release Moesin from Rab11. Moreover, we observed that *Rab11SN* induces a decrease of Moesin phosphorylation in border cells. How this is achieved is not known, but we can speculate that Rab11 is necessary to transport Moesin to domains where it can be phosphorylated by a kinase. Consistently with this idea, we observe that the distribution of total Moesin is different in control clusters compared to *Rab11SN* clusters. Whereas in control clusters Moesin is almost exclusively localized at boundaries around the cluster (border cell-nurse cell), it is found at border cell-border cell boundaries in *Rab11SN* clusters. As a consequence, we observe that Actin is also redistributed to internal boundaries. Moesin plays a critical role in organizing the epithelial architecture and in the regulation of cortical tension through regulation of the acto-myosin cytoskeleton (Fehon, McClatchey et al. 2010). Hence redistribution of Moesin and Actin to internal boundaries might change the



property of the cluster: in control clusters the acto-myosin cytoskeleton surrounds the entire cluster which reacts as a group, whereas in Rab11SN clusters it surrounds every cells which then seems to behave individually. Future work will be necessary to determine if this is achieved through the regulation of cortical tension or through another mechanism.

## 2.6. Materials and methods

*Fly genetics.* *slbo-GAL4* or *slbo-Gal4*, *UAS-CD8::GFP* drive UAS transgene expression in outer, migratory border cells, but not polar cells. Other stocks used were *UAS-Rab5SN/CyO*, *UAS-Rab11SN/CyO*, *UAS-RacN17*, *UAS-YFP-Rab11SN* have been described previously (Assaker, Ramel et al. 2010). *UAS-PA-RacQ61L* and *UAS-PA-RacT17N* and the light insensitive control *UAS-C450M-PA-RacQ61L* were described previously (Wang, He et al. 2010). *UAS-Lifeact GFP*, *UAS-Moesin-TD-Myc* were from the Bloomington stock center. UAS-RNAis moesin were from Vienna Drosophila RNAi Center (RNAi #3, no. #37917, TGACCACAAT AAGACCACCC ACACAGCCGG CTTTCTGGCC AACGATCGCC TGCTGCCGCA GCGCGTCATC GACCAGCACA AGATGTCCAA GGACGAGTGG GAGCAGTCGA TTATGACCTG GTGGCAGGAG CATCGCAGCA TGCTGCGCGA GGATGCCATG ATGGAGTATC TGAAGATCGC CCAAGACCTG GAGATGTACG GCGTAACTA CTTTGAGATC CGCAACAAGA AGGGCACGGA TCTTTGGCTG GGCGTAGACG CACTGGGTCT GAACATTTAC GAGCAGGACG ATAGGTTGAC GCC) and Bloomington stock center (RNAi #1, no 31135, TRIP, Top oligo: AAGAATTCAAATGTTGCGAATCTCGGAC, Bottom oligo : AGTCTAGATTCCGTGCCAAATTCTATCC and #2, no 33936, TRIP, Top oligo: CAGCAAGAGCAGATAATAATA, Bottom oligo TATTATTATCTGCTCTTGCTG). RNAi #3 was used for FRET and photoactivation experiments. All stocks were maintained at 25 degree.

*Live Imaging.* Living egg chambers were prepared for real-time imaging as described (Wang, He et al. 2010). FRET imaging of live border cells were acquired with Zeiss LSM510 inverted confocal microscope (Zeiss) equipped with a 40X/1.3 oil immersion objective as described previously (Wang, He et al. 2010). CFP and YFP images were processed by ImageJ and Metamorph software. Gaussian smooth filter was first applied to both channels with ImageJ. Then YFP image was used to create a binary mask with background set to zero. The final ratio image was generated with the « ratio Image » function of Metamorph using 8 ratios with 32 intensities (Aoki and Matsuda 2009). FRET ratio was calculated in the entire border cell cluster or specifically at the leading edge by measuring the average intensity of FRET and

CFP by the « Region measurements » function of Metamorph. Heat map of FRET indexes at the leading edge were generated with Excel. Rac photoactivation was performed as describe previously. Briefly, the 458 nm laser was set at 10% power. After 30 s, border cells were imaged using 568 nm. This series of steps was repeated for the duration of the time-lapse experiment.

*Measurements of migration speed, protrusion number and distribution.* Speed was determined as described previously(Wang, He et al. 2010). For protrusions quantifications, a circle was drawn in order to circumscribe the cell body. Any actin extension more than 4  $\mu\text{m}$  beyond was defined as a protrusion. For distribution analysis, each protrusion defined as previously was aligned on a radar map divided into 8 different sectors of 45 degrees each with the leading edge set at zero degree and the trailing edge at 180 degree. The length and the width of the arrow represent the amount of protrusions in a given direction. Analysis and quantifications were done with ImageJ and MATLAB and representations with Excel.

*Quantitative Analysis of RTK polarity.* Images from fixed tissues were acquired with LSM 510 META inverted microscope (Zeiss) using a 63x objective. Images were acquired by sequential scans in multiple channels. Quantifications of fluorescence intensities were performed as previously describe (Assaker, Ramel et al. 2010, Laflamme, Assaker et al. 2012).

*Tissue Staining and Antibodies.* Egg chambers were prepared and stained using standard techniques. All antibodies are previously described(Polesello, Delon et al. 2002, Assaker, Ramel et al. 2010) and were used at the indicated dilutions: mouse monoclonal anti-pTyr 1:10 (4G10), anti aPKC (1:50, Santa Cruz, #sc-216), rabbit anti phospho-Moesin (1:50) and total Moesin (1:100) (kind gift of S. Carreno). Secondary antibodies were from Invitrogen and coupled to Alexa Fluor 555 (anti-mouse #A21422 and anti-rabbit #A21427) and used at 1:250 dilutions. Alexa Fluor 555 labeled phalloidin (Invitrogen, #A34055) was used at 1:250 dilutions to visualize F-actin. DAPI (Sigma-Aldrich) was used to stain nuclei. Egg chambers were mounted in Mowiol 4–88 (Sigma-Aldrich). Images from fixed tissues were acquired using an LSM510 (Zeiss), using either a 40X (full size egg chambers) or 63X (border cells cluster alone) objectives. Images were acquired by sequential scans in multiple channels. For figure assembly, images were processed with Photoshop (Adobe), using only the “gaussian

blur” and the “level” functions. For a better rendering of the blue channel, a posttreatment with the “selective color” function was performed. Migration and Completion Indexes were calculated as described previously (Assaker, Ramel et al. 2010, Laflamme, Assaker et al. 2012).

*Rab11 GST pull down for mass spectrometry analysis.* Cytosol extracts from *Drosophila* embryos were prepared in the following homogenization buffer (20mM Tris-Cl pH8, 110mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT). Recombinant GST-Rab11 (previously cloned in pGex-6P1) was purified from BL21 bacteria as described (Yoshimura, Haas et al. 2008). Affinity column of GST-Rab11 loaded with GDP or with GTP $\gamma$ S were prepared, loaded with cytosol extracts, washed and eluted with excess of the converse nucleotide as in (Christoforidis and Zerial 2000). Total eluates were sent for analysis by mass spectrometry.

*Liquid chromatography mass spectrometry analysis.* TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) was added to the protein samples to reach the concentration of 5mM. Samples were incubated at 37 °C at 650 rpm for 30 min. 1 $\mu$ g of trypsin was added and the samples were digested overnight at 37 °C. The samples were dried down in a Speed and resolubilized in 50  $\mu$ l of ACN 5% /formic acid (FA) 0.2%. 20  $\mu$ l of each samples were injected on a C18 precolumn (0.3 mm i.d. x 5 mm) and samples were separated on a C18 analytical column (150  $\mu$ m i.d. x 100 mm) using an Eksigent nanoLC-2D system. A 76-min gradient from (A/B) 10–60% (A: formic acid 0.2 %, B: acetonitrile/0.2% formic acid) was used to elute peptides with a flow rate set at 600 nanoliter/min.

The LC system was coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher). Each full MS spectrum was followed by three MS/MS spectra (four scan events), where the three most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Tandem MS experiments were performed using collision-induced dissociation in the linear ion trap. The data were processed using the Mascot 2.2 (Matrix Science) search engine.

*Rab11 GST pull down for western blotting:* Stable S2 cells line expressing GST-Rab11 under pMT promoter were cultured in Schneider medium supplemented with 10% FBS and transfected with moesin-GFP using TransIT-LT1 (Mirus) on day 1. Protein expression was induced with 0,8mM of CuSO<sub>4</sub> on day 2. On day 4 cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer [20mM Tris (pH 8.0), 137mM NaCl, 1% Nonidet P40, 10% glycerol, 1mM EDTA]

with protease inhibitors. For GST pull-down assays, 50 $\mu$ l of 50% slurry of glutathione Sepharose beads equilibrated in lysis buffer was added to protein lysates and rocked for 4h at 4°C. Beads were then washed three times with 1ml of lysis buffer. Total protein lysates or eluted proteins were resolved on an 8-10% SDS/Page, transferred to nitrocellulose membranes and immune-detected using specific antibodies.

*Vesicle analysis:* Fluorescent images were analyzed using semiautomated software custom written in MATLAB (MathWorks) as previously described (Laflamme, Assaker et al. 2012). Briefly, image were first automatically thresholded using the GFP-Sec15 channel, and then fluorescent signal was detected in 3D.

*Statistical analysis:* Statistical comparisons of means were made using the unpaired Student's two-tailed *t*-test for two data sets. For statistical tests,  $p < 0.05$  was used as the criterion for statistical significance. Mean values are quoted s.e.m. in figures.

## **2.7. Acknowledgements**

We thank the Bloomington Stock Collection and the Vienna Drosophila RNAi Center for fly stocks. We thank Gloria Assaker, Carole Iampietro and Christian Charbonneau for technical assistance and helpful discussions. We also thank S. Carreno for providing phospho-Moesin and Moesin antibodies and important insights on related experiments. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) to G.E. (MOP-114899). G.E. holds a Canada Research Chair (Tier II) in Vesicular Trafficking and Cell signaling. D.R and C.L are supported by Fonds de Recherche Québec Santé (FRQS). IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research (CECR), the Canada Foundation for Innovation (CFI) and by the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). This paper is dedicated to the memory of Alain Ruffé.

## **2.8. Contributions**

G.E and D.R conceived the project and G.E directed it. D.R designed and performed FRET experiments, stainings of border cells and egg chambers, quantified migration, and developed the method for determination of the orientation of the protrusions. D.R and X.W performed photoactivation experiments. C.L developed mass spectrometry analysis and immunoprecipitations. D.R, D.M and G.E wrote the manuscript.

## 2.9. Figure legends

### Figure 2.1: Rab proteins regulate actin dynamics and Rac activity and polarization.

(a) Schematic representation of an egg chamber at stage 9 and 10. pTyr signaling and Rac activity are distinct events.

(b) Border cell clusters expressing *UAS- Lifeactin GFP* alone, with *UAS-Rab11SN* or *UAS-Rab5SN* at the onset of migration. The expression was driven by *slbo-Gal4* at 29°C Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .

(c) Quantification of protrusions number in the same conditions at the onset and after 25%-50% of migration of the indicated genotypes.  $n = 30, 19, 10$  and  $10$  respectively for control, Rab11SN, Rab5SN and RacN17 at the onset of migration.  $n = 15, 27, 10$  and  $10$  respectively for control, Rab11SN, Rab5SN and RacN17 at 25-50% of migration. \*  $p < 0,001$  (Student's  $t$  test).

(d) Analysis of protrusions distribution (see Figure S2 for details) in control and *Rab11SN* expressing clusters at the onset and after 25%-50% of migration.  $n = 20$  clusters.

(f-t) Processed FRET signal images of time-lapse series of border cells expressing *UAS-Rac Fret* alone or together with, *UAS-Rab11SN* or *UAS-Rab5SN* at the onset of migration. The expression was driven by *slbo-Gal4* at 29°C. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ .

(u) Quantification of the total FRET index in the indicated genotypes.  $n = 30$  for each conditions.

(v) Quantification of the ratio of the FRET index between front and back of the cluster for the indicated conditions.  $n = 30$  for each conditions. \*  $p < 0,001$  (Student's  $t$  test).

(w) Heat maps representing the FRET index along time at the leading edge of 10 WT and *Rab11SN* clusters. Error bars show s.e.m.

### Figure 2.2: Local activation of Rac does not rescue Rab11 loss-of-function phenotype.



**(a-d)** Selected still images from a time-lapse movie of photoactivation of *UAS-PA-RacQ61L* expressing cluster. n = 8.

**(e-h)** Selected still images from time-lapse movies of photoactivation of *UAS-PA-RacQ61L* in *UAS-Rab11SN* background. n = 11.

**(i-l)** Control experiment with *UAS-PA-RacQ61L C450M* insensitive to light in *UAS-Rab11SN* background. n = 10.

**(m-p)** Selected still images from time-lapse movies of photoactivation of *UAS-PA-RacQ61L* in *UAS-Rab5SN* background n = 8.

**(q-t)** Control experiment with *UAS-PA-RacQ61L C450M* insensitive to light in *UAS-Rab5SN* background. n = 9. The expression was driven by *slbo-Gal4* at 29°C. Blue circles indicate photoactivated region. The white arrows indicate the direction of migration and the dashed blue arrows the expected direction after photoactivation. Scale bars, 20 µm.

**(u)** Speed measurements for each genetic background presented in **a** to **t**. n = 8, 11, 10, 8, 9 respectively for control PA-Rac C450M, PA-Rac control, PA-Rac C450M, PA-Rac Rab11SN, PA-Rac C450M Rab5SN and PA-Rac Rab5SN at the onset of migration. \*  $p < 0,01$  (Student's *t* test). Error bars show s.e.m.

**Figure 2.3: Local inactivation of Rac reveals a role in cell-cell communication for Rab11.**

**(a-c)** Confocal images from an experiment of *UAS-PA-RacT17N* photoactivation in a control cluster. n = 11.

**(d-f)** Confocal images of photoactivation experiments in *UAS-Rab11SN* background. n = 13.

**(g-i)** Confocal images of photoactivation experiments in *UAS-Rab5SN* background. n = 12. Red circles indicate photoactivated region. The white arrows indicate the direction of migration. Scale bars, 20 µm.

**(j)** Analysis of protrusions distribution in control and *UAS-Rab11SN* expressing clusters.

**(k)** Quantifications of protrusions in *PA-RacT17N* experiments. n = 11, 13, 12 respectively for control, *Rab5SN*, *Rab11SN* at the onset of migration.

(l) Quantification of the area of clusters in *PA-RacT17N* experiments. n = 11, 13, 12 respectively for control, *Rab5SN*, *Rab11SN* at the onset of migration. The expression was driven by *slbo*-Gal4 at 29°C. \*  $p < 0,0001$  (Student's *t* test). Error bars show s.e.m.

**Figure 2.4: Rab11 interacts with and controls Moesin activity.**

(a) Stably transfected S2 cells expressing GST, GST-Rab11SN, WT or QL and *GFP-Moesin* or not were lysed and submitted to GST-pull downs. Lysates and immunoprecipitates were analyzed by western blotting using GFP, GST and Moesin antibodies. Western blots are representative of three independent experiments.

(b) Representative images showing the intensity and the distribution of p-Moesin at the onset of migration in control (*CD8-GFP*) (n = 11), in *Rab11SN* (n = 16) and *Rab5SN* (n = 10) expressing clusters. Scale bars, 10  $\mu$ m. The expression was driven by *Slbo*-Gal4 promoter.

(c) Representative images showing the intensity and the distribution of Moesin at the onset of migration in control (*CD8-GFP*) (n = 20), in *Rab11SN* (n = 20) and *Rab5SN* (n = 10) expressing clusters. Scale bars, 10  $\mu$ m. The expression was driven by *Slbo*-Gal4 promoter.

(d) Quantification of the ratio of the mean fluorescence signal of p-Moesin on GFP mean intensity at the interface between border cells (BC) and nurse cells (NC). n = 20, 20 and 10 respectively for Control, *Rab11SN* and *Rab5SN*.

(e) Quantification of the ratio of the mean fluorescence signal of Moesin at the interface between border cells (BC) and nurse cells (NC). n = 20, 20 and 10 respectively for Control, *Rab11SN* and *Rab5SN*.

(f) Quantification of the ratio of the mean fluorescence signal of Moesin on at the interface between border cells (BC) and nurse cells (NC) on the mean fluorescence signal of Moesin at BC-BC membranes. n = 20, 20 and 10 respectively for Control, *Rab11SN* and *Rab5SN*.

(g) Migration and completion indexes after expression of constructs indicated. n is indicated under each genotype. \*  $p < 0,0001$  (Student's *t* test). Error bars show s.e.m.

**Figure 2.5: Moesin regulates protrusion distribution, polarization of Rac activity and cell-cell communication.**

(a) Migration and completion indexes after expression of mcherry RNAi (control) or three different RNAi against *Moesin*. The expression was driven by *c306*-Gal4 at 32°C. n is indicated under each genotype \*  $p < 0,0001$  (Student's *t* test).

(b) Analysis of protrusions distribution in RNAi *Moesin* expressing clusters at the onset and after 25%-50% of migration. n = 14 clusters.

(c) *UAS-Rac Fret* is expressed in border cells expressing RNAi *Moesin* and Rac activity is visualized by FRET in living egg chambers at the onset of migration. The expression was driven by *c306*-Gal4 at 32°C. Scale bars, 10  $\mu$ m.

(d) Quantification of the total FRET index in control and in RNAi *Moesin* expressing clusters. n = 30 in each conditions.

(e) Heat maps representing the FRET index along time at the leading edge of 10 RNAi *moesin* clusters.

(f-h) Confocal images from an experiment of *UAS-PA-RacT17N* photoactivation in a control cluster The expression was driven by *slbo*-Gal4 at 32°C.

(i-k) Confocal images of a photoactivation experiment in a *UAS-RNAi Moesin* background at 32°C. Red circles indicate photoactivated region. The white arrows indicate the direction of migration. Scale bars, 20  $\mu$ m.

(l) Quantifications of protrusions in *PA-RacT17N* experiments. n = 11 for each conditions. \*  $p < 0,0001$  (Student's *t* test). Error bars show s.e.m.

**Figure 2.6 (Supp.1): Rab5SN expression alters pTyr polarity but not epithelial polarity.**

DAPI and pTyr staining of border cells expressing CD8-GFP alone (n = 10)

(a) or together with Rab5SN (n = 10)

(b) at the onset of migration. The pTyr channel is shown alone in grey scale (lower panel). The *slbo-Gal4* promoter drives all constructs at 29°C. Scale bars, 10 μm.

(c) Quantification of the ratio of the mean fluorescent signal of pTyr determined in an area of the leading edge [ $F(P)$ ] divided by the signal at the trailing edge [ $F(A)$ ] in control, *Rab11SN* and *Rab5SN* expressing clusters.  $n = 10$  in each condition. \*  $p < 0,0001$  (Student's  $t$  test). The *Slbo-Gal4* driver expresses *UAS* transgenes at both tips of the egg chamber, however only cells of the anterior tip are able to acquire migratory capacities. The yellow square points at the anterior part where the border cells are located at stage 9. The red square indicates the posterior pole of the egg chamber where follicular cells reside in a well-organized epithelium.

(d-f) Stage 9 egg chambers stained with aPKC and expressing *CD8-GFP* alone or with *Rab11SN* or *Rab5SN*.

(g-i) Stage 10 egg chambers stained with aPKC and expressing *CD8-GFP* alone or with *Rab11SN* or *Rab5SN*. Scale bars, 10 μm. Error bars show s.e.m.

### **Figure 2.7 (Supp.2): Evaluation of protrusions distribution.**

(a) Radar map is superposed on a control cluster expressing *UAS-CD8-GFP* with the zero set to the direction of migration. The blue dashed line indicates the leading protrusion.

(b) Radar map is superposed on a cluster expressing *CD8-GFP* and *Rab11SN* with the zero set to the direction of migration. The blue dashed lines indicate protrusions.

### **Figure 2.8 (Supp.3): Determination of Front and Back area for FRET measurements.**

(a) Radar map is superposed on a cluster with the zero set to the direction of migration. For measurements in front area, we measure CFP and YFP signal only in the region between 45 and -45 degree.

(b) For measurements in the back area, we measure CFP and YFP signal only in the region between 135 and -135 degree.

**Figure 2.9 (Supp.4): *Moesin* acts downstream of Rab11.**

(a) Representative confocal images showing the distribution of sec15-GFP vesicles at the onset of migration in control and RNAi Moesin expressing clusters. Scale bar, 10  $\mu$ m.

(b) Computational analysis of the conditions (a). Violin plots are vertical, side-by-side displays of histograms that represent the relative distribution of vesicle counts for a given volume. Each histogram was normalized by its maximum bin size. Green crosses indicate the medians of the thresholded distribution ( $250 < n$  vesicles). \*,  $P < 0.05$ ; KS test and rank sum test.

(c) Border cell clusters expressing *UAS- Lifeactin GFP* alone or with *UAS-RNAi Moesin* at the onset of migration. The *slbo*-Gal4 promoter drives all constructs at 32°C. Scale bars, 10  $\mu$ m.

(d) Quantification of the ratio of the mean fluorescence signal of *Lifeactin GFP* on at the interface between border cells (BC) on the mean fluorescence signal of *Lifeact GFP* at nurse cells (NC)–BC interface in control ( $n = 26$ ), Rab11SN ( $n = 20$ ) and Moesin RNAi expressing clusters ( $n = 13$ ).

(e, f, g, h, i, j) Representative examples of border cell migration at stage 10 when border cells express the indicated UAS constructs. The expression was driven by *c306*-Gal4 at 29°C. Scale bar, 20  $\mu$ m. \*  $p < 0,0001$  (Student's *t* test). Error bars show s.e.m.

**Figure 2.10 (Supp.5): *Moesin*-TD rescues dispersion of protrusions induced by Rab11SN expression.**

Analysis of protrusions distribution in the indicated genotypes at the onset and after 25%-50% of migration.  $n = 20, 10, 11$  and  $17$  respectively for control, YFP-Rab11SN, Moesin-TD and YFP-Rab11SN/Moesin-TD at the onset of migration.  $n = 15, 10, 10$  and  $10$  respectively for respectively for control, YFP-Rab11SN, Moesin-TD and YFP-Rab11SN/Moesin-TD at 25-50% of migration.

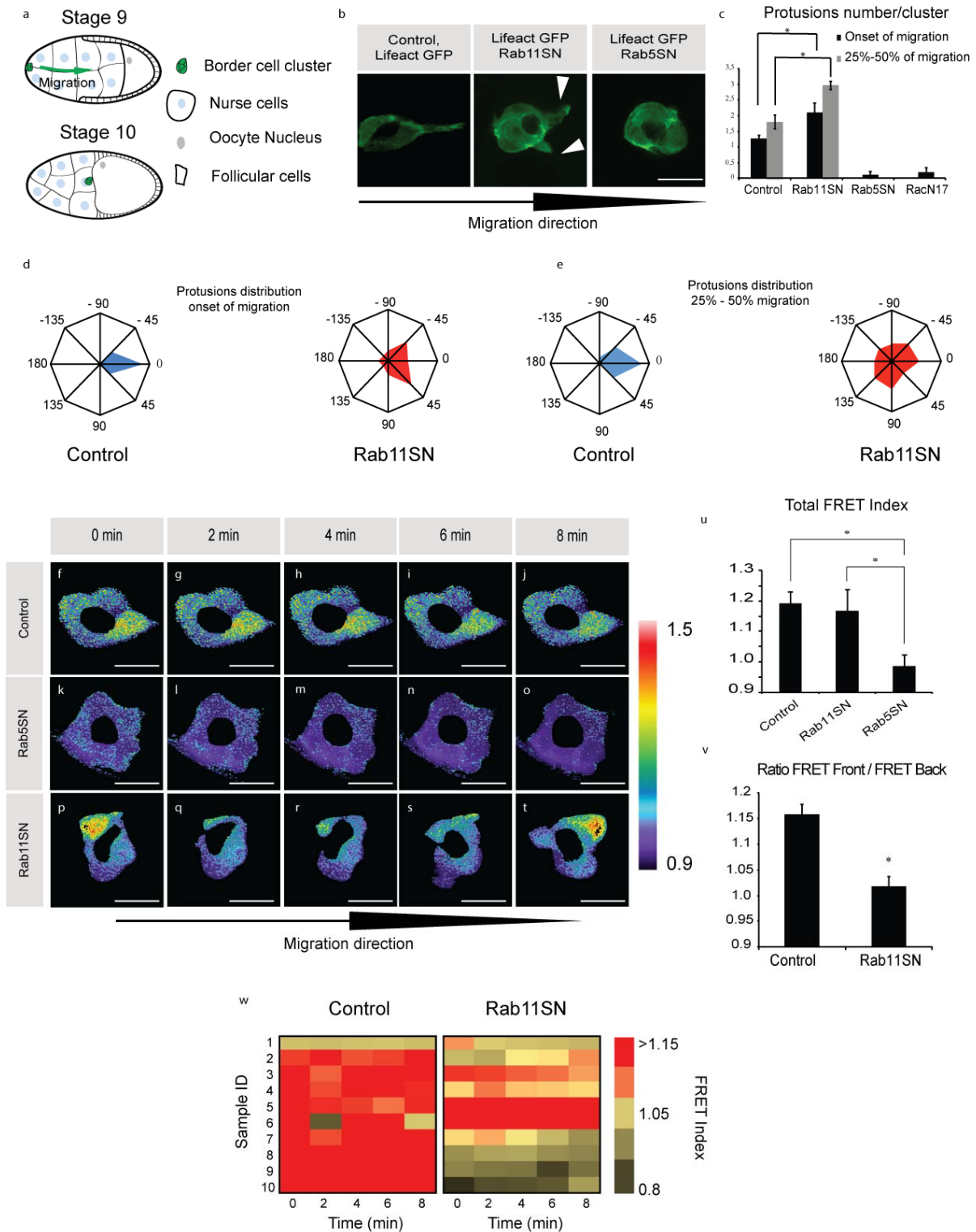


Figure 2.1: Rab proteins regulate actin dynamics and Rac activity and polarization

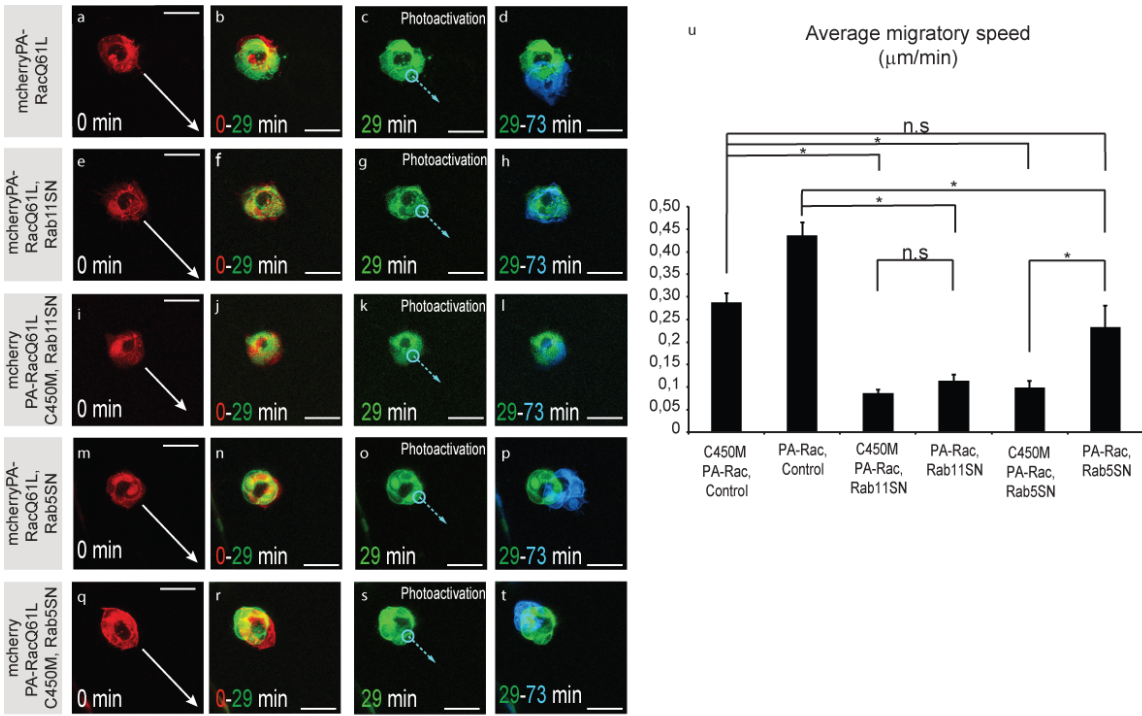


Figure 2.2: Local activation of Rac does not rescue Rab11 loss-of-function phenotype

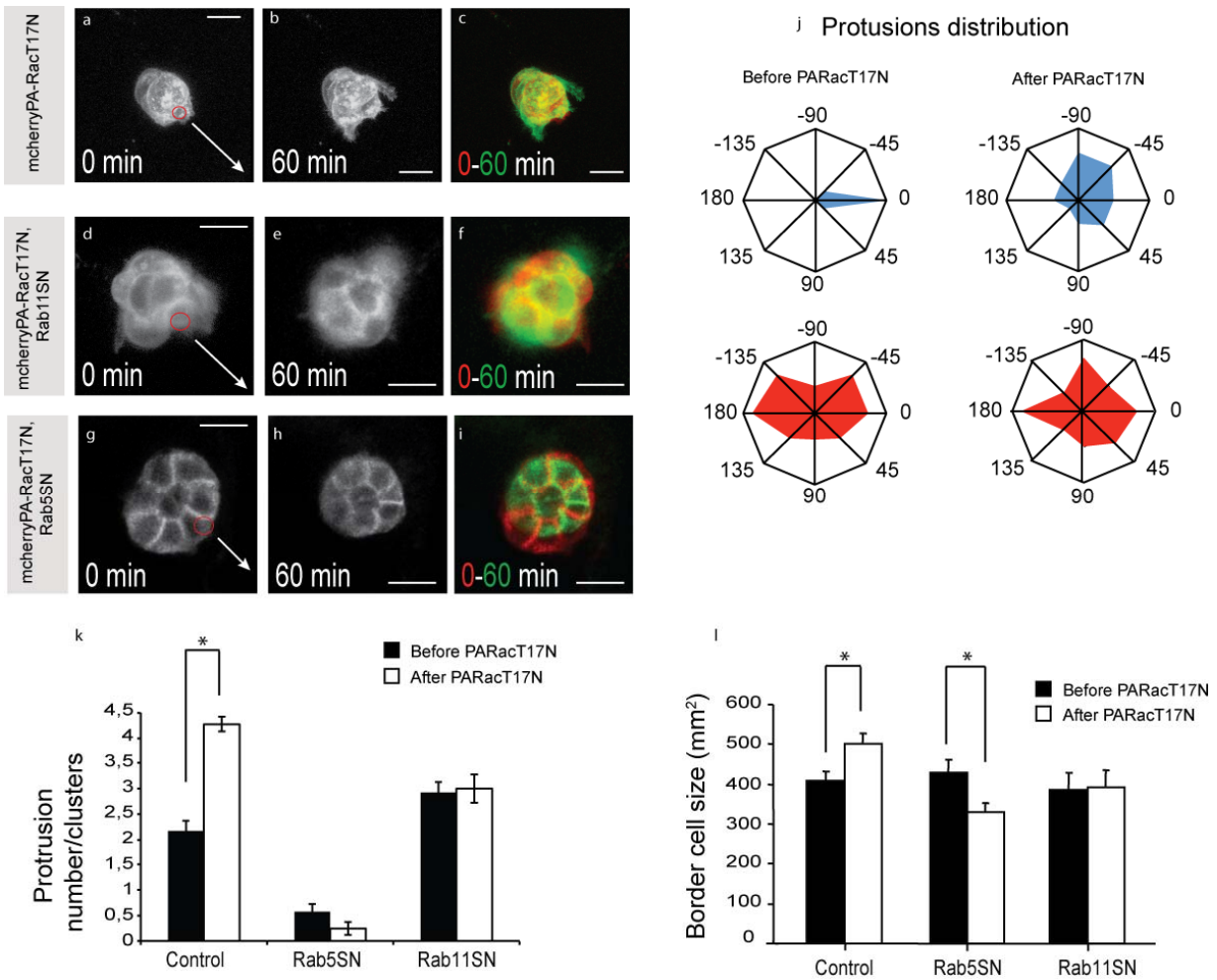


Figure 2.3: Local inactivation of Rac reveals a role in cell-cell communication for Rab11



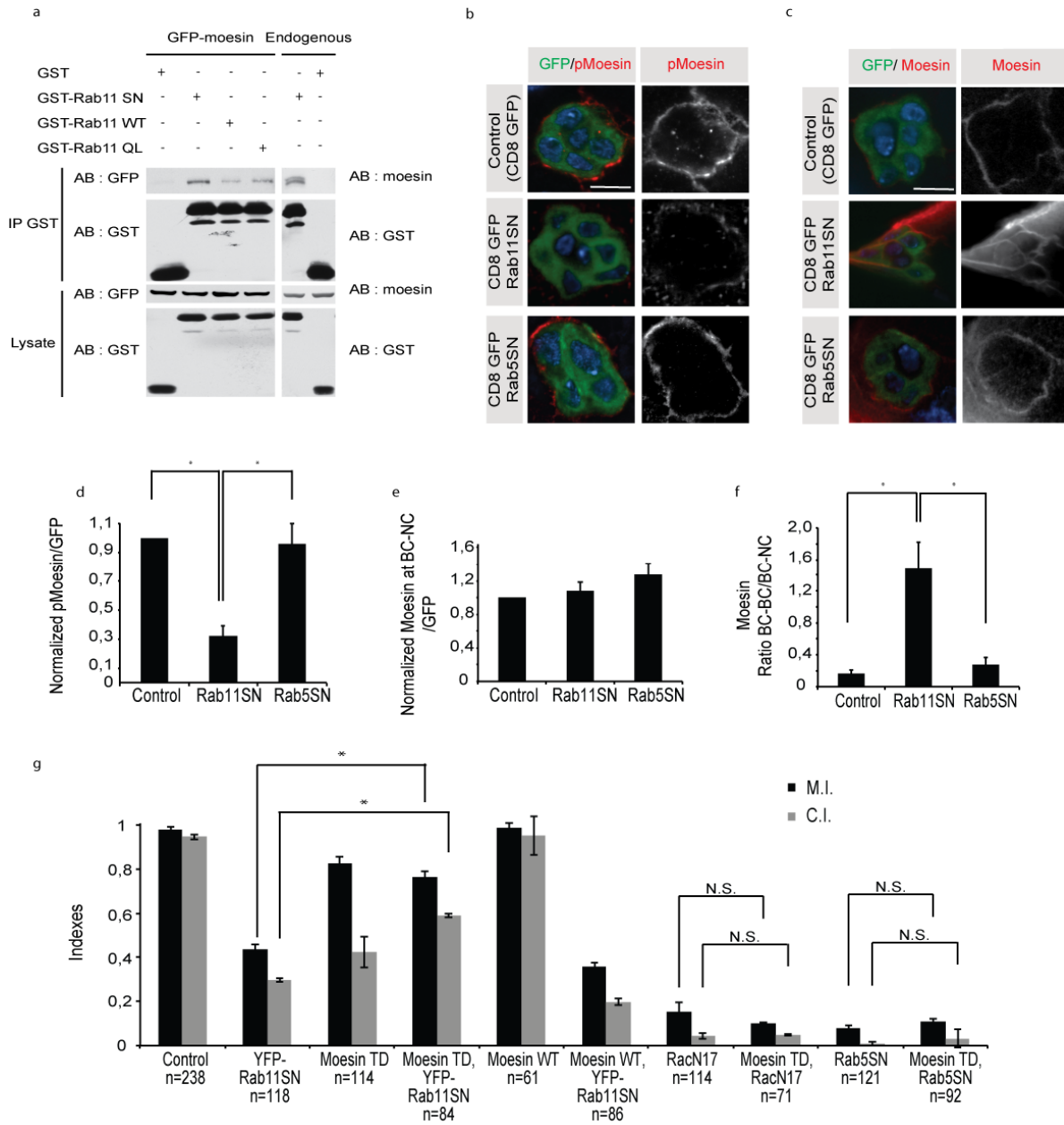


Figure 2.4: Rab11 interacts with and controls Moesin activity

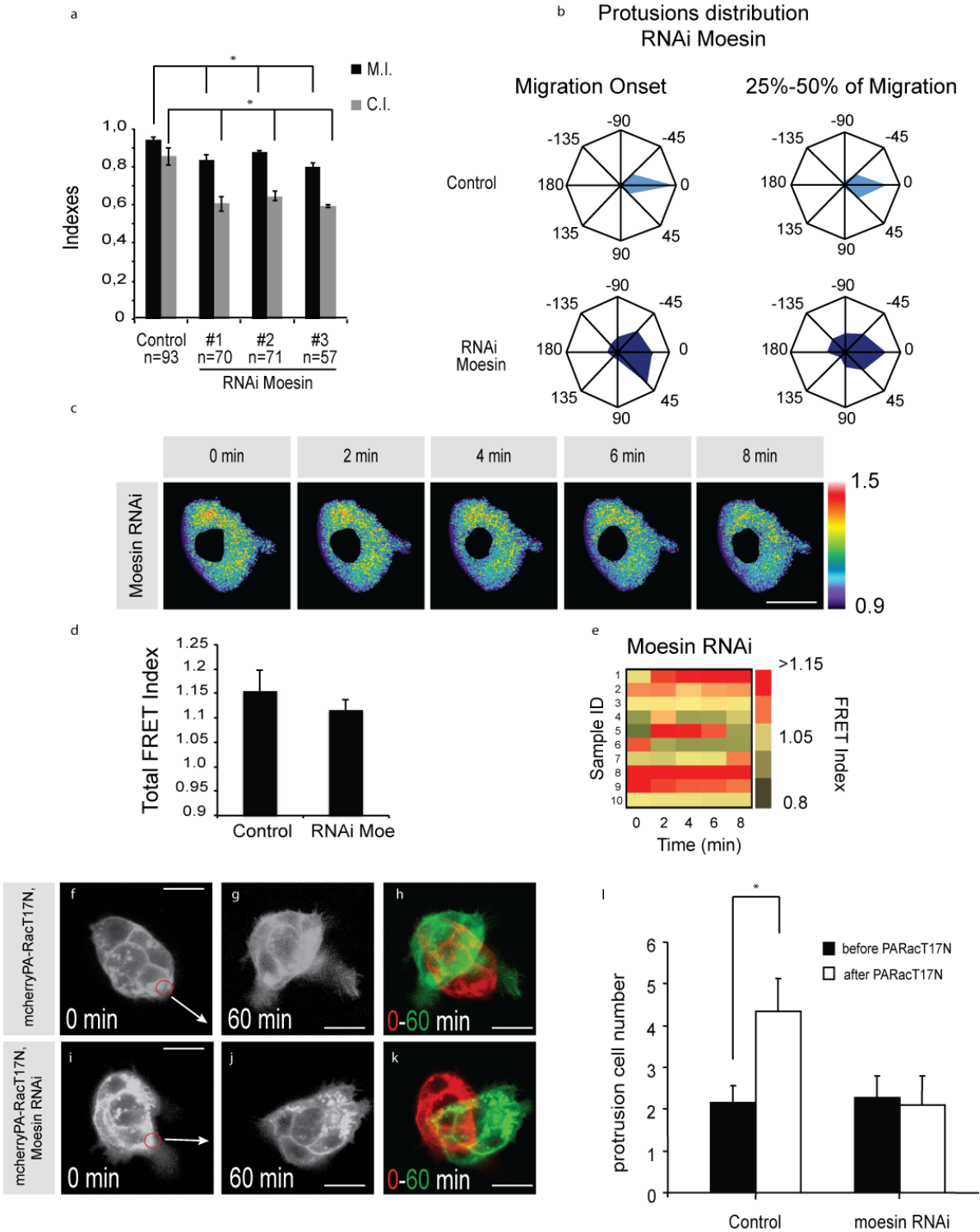


Figure 2.5: Moesin regulates protrusion distribution, polarization of Rac activity and cell-cell communication

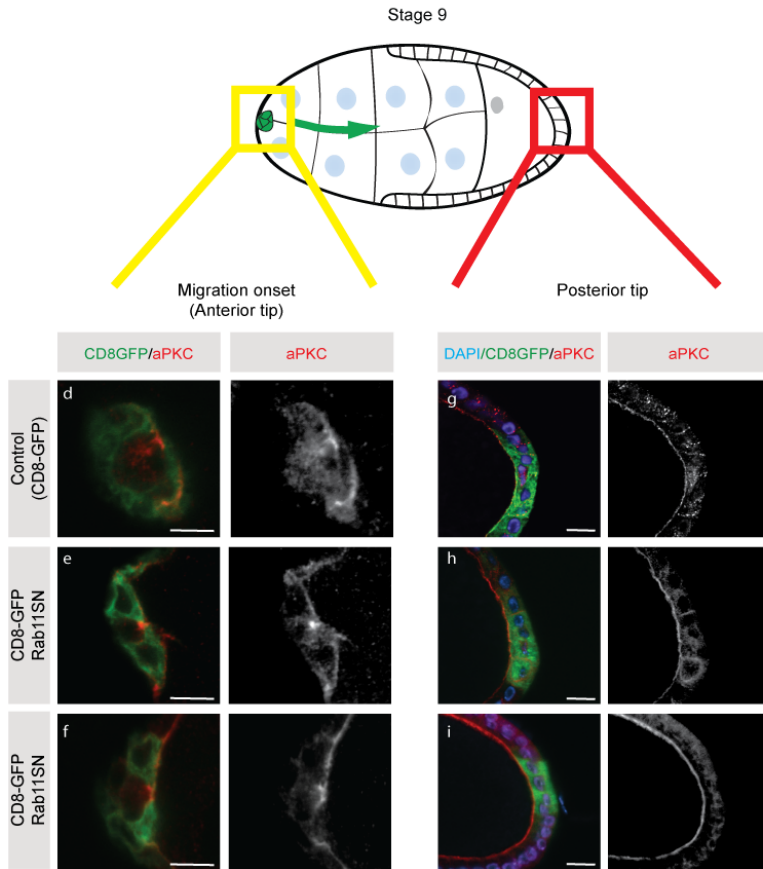
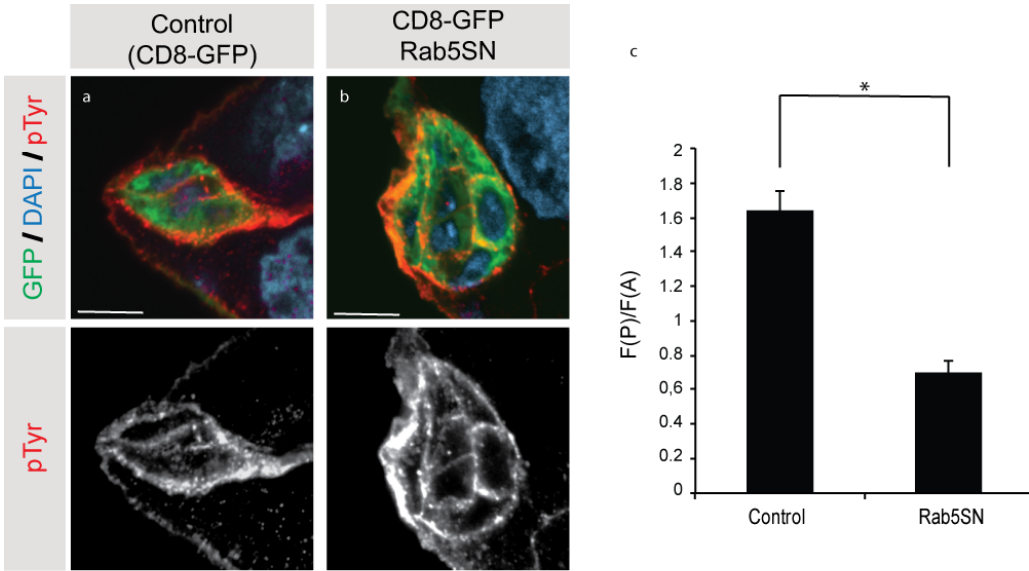


Figure 2.6 (Supp.1): Rab5SN expression alters pTyr polarity but not epithelial polarity

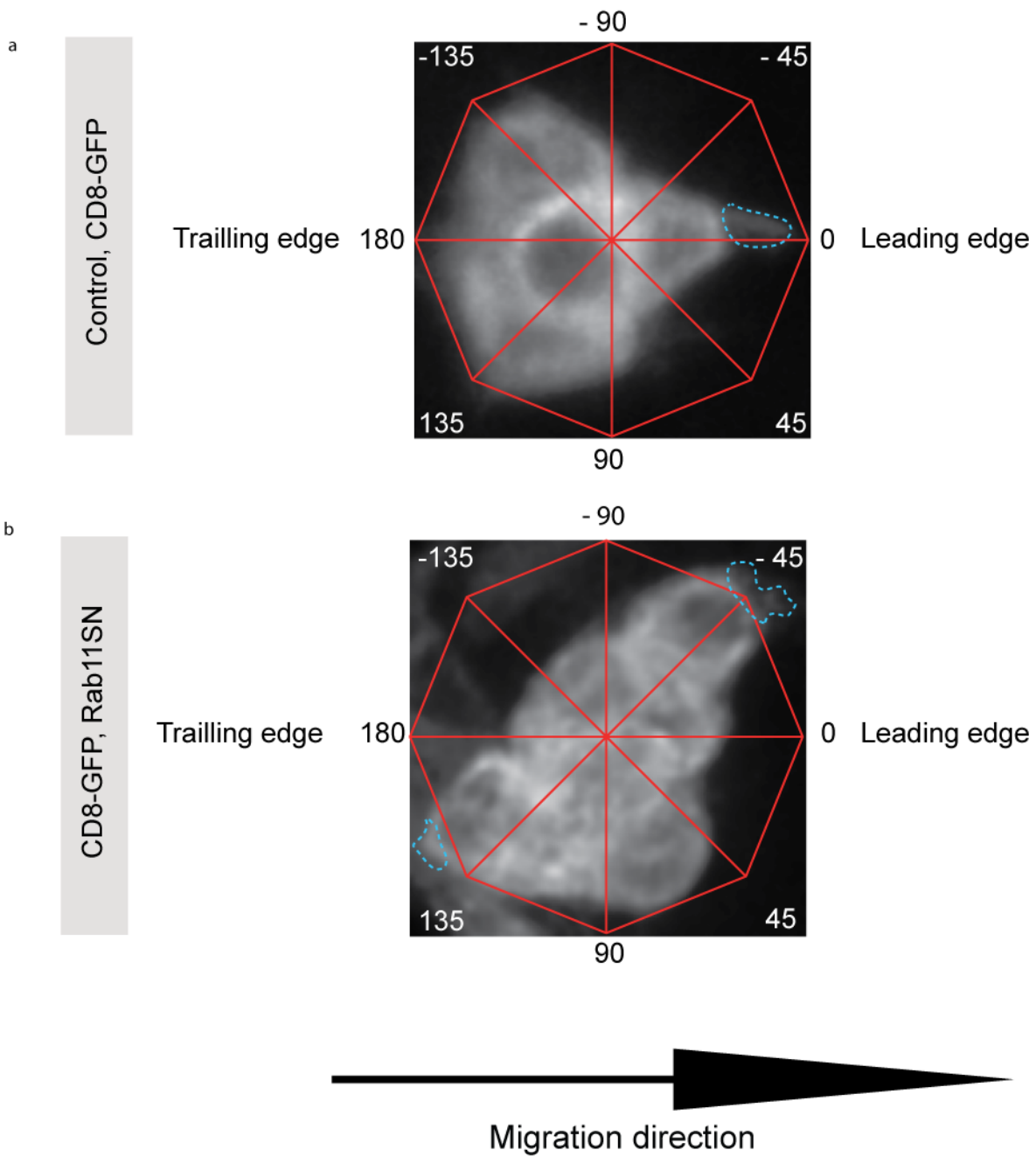
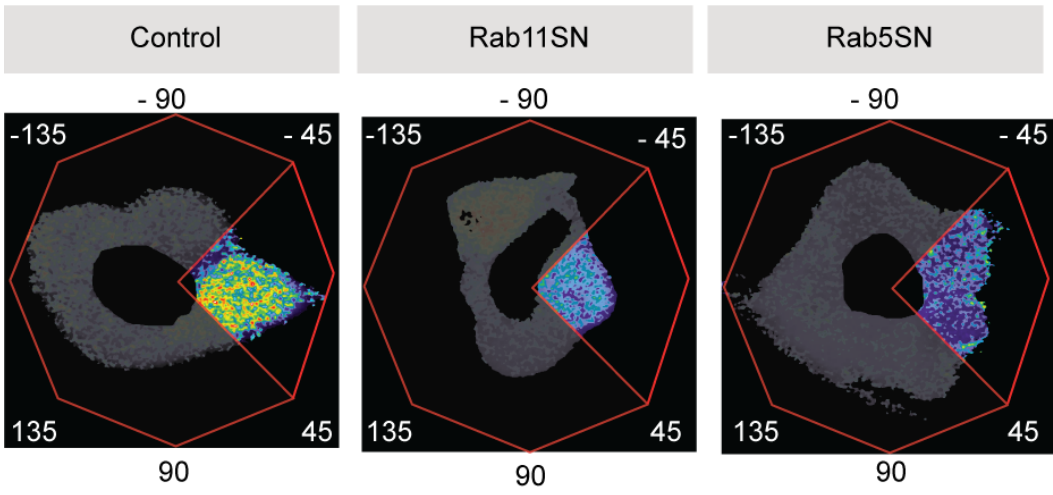
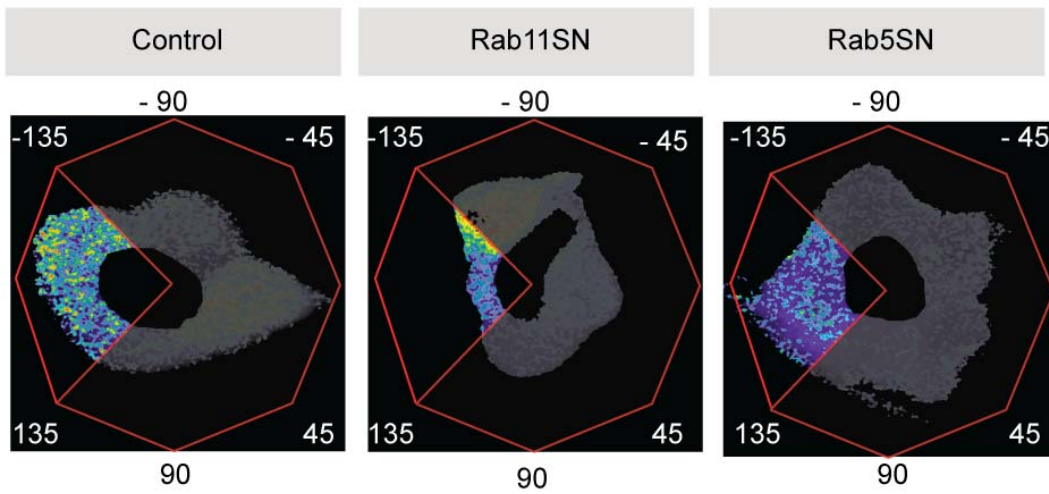


Figure 2.7 (Supp.2): Evaluation of protrusions distribution

a. Definition of the Front Area



b. Definition of the Back Area



Migration direction

Figure 2.8 (Supp.3): Determination of Front and Back area for FRET measurements

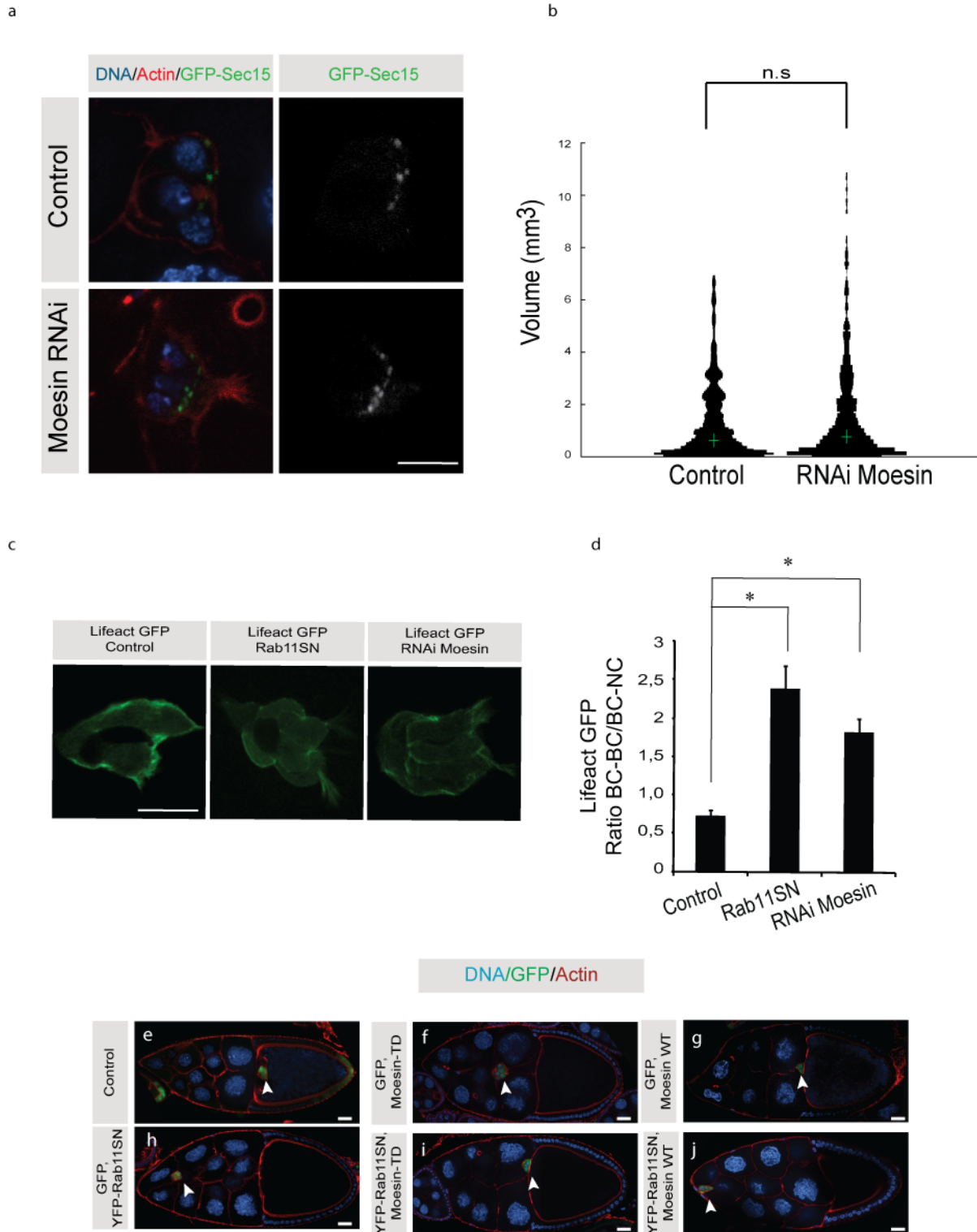


Figure 2.9 (Supp.4): *Moesin* acts downstream of Rab11

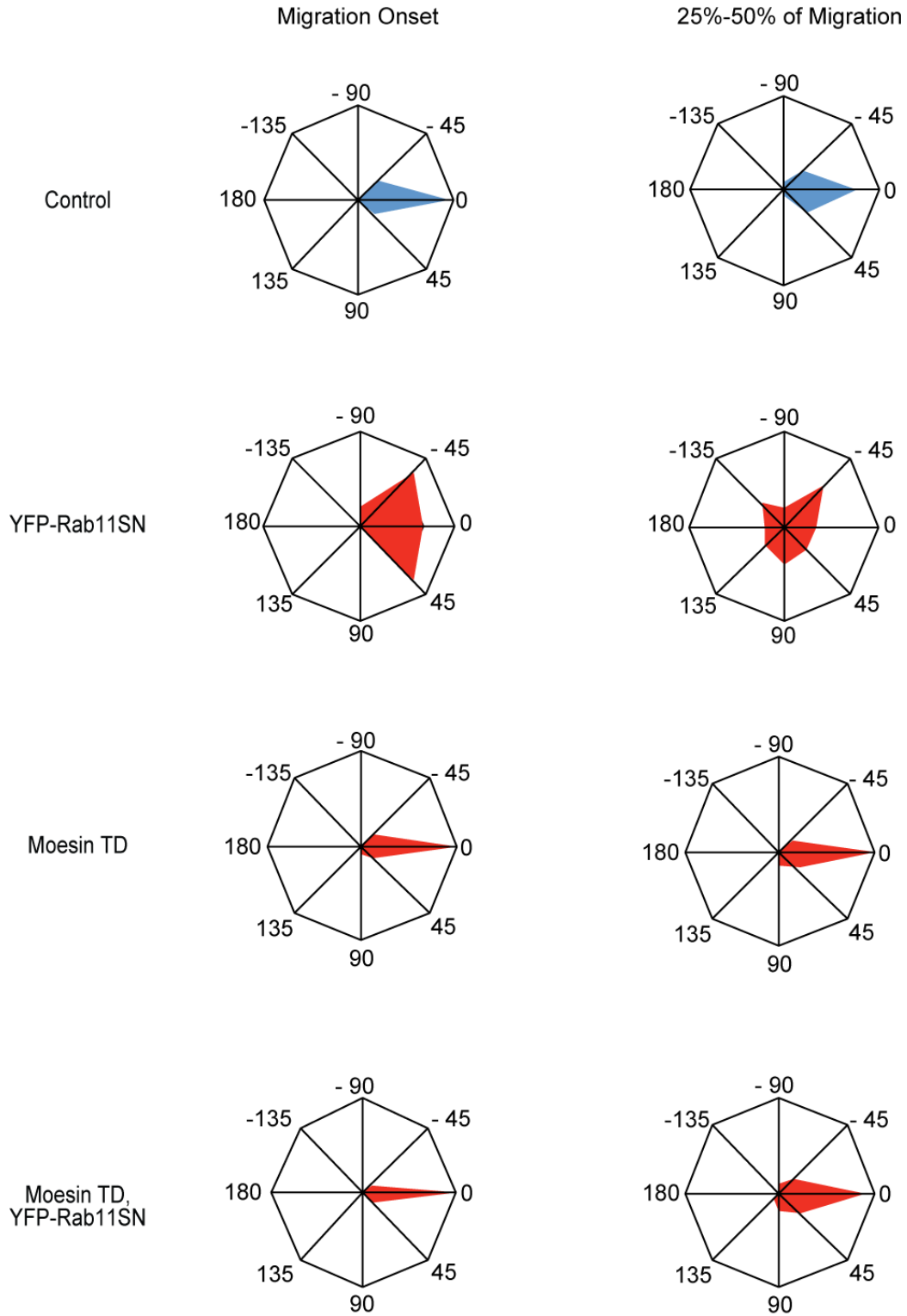


Figure 2.10 (supp.5): Moesin-TD rescues dispersion of protrusions induced by Rab11SN expression

Table 2.I : Table showing proteins related to vesicular trafficking or cytoskeleton regulation, identified by GST-pull down followed by mass spectrometry as interacting specifically with GTP-loaded (Rab11::GTP) or with GDP-loaded Rab11 (Rab11::GDP)

	<b>CG number</b>	<b>Name</b>	<b># peptide</b>	<b>Function</b>
Specific to Rab11::GDP	CG4422	GDI	5	GDP dissociation inhibitor
	CG10701	Moesin	4	Actin regulator
	CG8432	Rab escort protein	2	regulation of geranylgeranylation of Rab GTPases
	CG3937	Cheerio	2	Actin binding protein
	CG8309	Tango7	2	Golgi organization and protein secretion
	<b>CG number</b>	<b>Name</b>	<b># peptide</b>	<b>Function</b>
Specific to Rab11::GTP	CG6742	Centaurin b1	3	Arf6 GAP, ortholog of ACAP1
	CG11490	Tbc1d15-17	3	Rab GAP
	CG33991	Nuclear fallout	2	Ortholog of RAB11FIP3-4



## **CHAPITRE 3**

### ARTICLE

Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity

*Journal of Cell Biology, 2012*

### **3. Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity**

Carl Laflamme<sup>1</sup>, Gloria Assaker<sup>1</sup>, Damien Ramel<sup>1,2</sup>, Jonas F. Dorn<sup>1,2</sup>, Desmond She<sup>1</sup>, Paul S. Maddox<sup>1</sup> and Gregory Emery<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) and Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7

<sup>2</sup> These authors contributed equally to this work

Running title: Rab11-GAP Evi5 regulates border cell migration

### **3.1. Contribution des coauteurs**

Cet article démontre l'activité Rab11-GAP de la protéine Evi5 *in vivo* lors de la migration collective des cellules de bordure. J'ai conçu de pair avec le Dr Emery les expériences à faire et j'ai effectué 100% de la biologie moléculaire et de la biochimie et environ 95% des croisements de Drosophile. GA, DR et DS m'ont aidé à quantifier des index de migration et à effectuer certains marquages d'immunofluorescence. L'algorithme d'analyse des vésicules GFP-Sec15 et GFP-Rip11 a été développé par JFD du laboratoire de PSM. J'ai écrit la première version du manuscrit et GE a contribué activement à la correction de ce dernier.

### **3.2. Abstract**

Membrane trafficking has well-defined roles during cell migration. However, its regulation is poorly characterized. In this paper, we describe the first screen for putative Rab-GTPase-activating proteins (GAPs) during collective cell migration of *Drosophila melanogaster* border cells (BCs), identify the uncharacterized *Drosophila* protein Evi5 as an essential membrane trafficking regulator, and describe the molecular mechanism by which Evi5 regulates BC migration. Evi5 requires its Rab-GAP activity to fulfill its functions during migration and acts as a GAP protein for Rab11. Both loss and gain of Evi5 function blocked BC cell migration by disrupting the Rab11-dependent polarization of active guidance receptors. Altogether, our findings deepen our understanding of the molecular machinery regulating endocytosis and subsequently cell signalling during migration.

### 3.3. Introduction

Small GTPases from the Rab family are important regulators of vesicular trafficking (Zerial and McBride 2001). They control many cellular and developmental processes such as proliferation, differentiation and cell migration. In particular, they play a fundamental role in regulating cell signalling since they control the compartmentalization of signalling molecules (Scita and Di Fiore 2010).

Like every GTPase, Rab proteins cycle between a GTP-bound active state and a GDP-bound inactive state. In the active state, they recruit specific effectors necessary for their function. Guanine nucleotide exchange factor (GEF) proteins are responsible for the exchange of GDP to GTP by catalyzing GDP release, whereas GTPase-activating proteins (GAPs) catalyze GTP hydrolysis. Diverse Rab-GEF domains have been identified (Barr and Lambright 2010). In contrast, the Tre-2, Bub2 and Cdc16 (TBC) domain is the only Rab-GAP domain identified (Fukuda 2011). The TBC domain supplies a catalytic arginine finger characterized by the consensus sequence IXXDXXR responsible for GAP activity (Pan, Eathiraj et al. 2006).

Many questions about the regulators of Rab proteins are still unanswered. In particular, very few GAPs and GEFs have been attributed to specific Rab proteins. Furthermore, most of the work performed so far was done in cultured cells or *in vitro*. Although this approach is efficient to demonstrate a GAP/GEF activity and to measure catalytic activity, the specificity of the interaction between a Rab and its regulator might be lost *in vitro*, as well as the compartmentalization of the interaction and possible post-translational regulations. Hence, it is fundamental to study *in vivo* the regulation of Rab proteins (Frasa, Koessmeier et al. 2012). Recent work in *Drosophila* and in *C.elegans* has provided the first descriptions of *in vivo* regulation of Rab proteins by GAPs (Chotard, Mishra et al. 2010, Houalla, Shi et al. 2010, Uytterhoeven, Kuenen et al. 2011). But no systematic analysis of all the GAPs has been performed so far.

In this study, we examined the implication of Rab-GAP proteins during border cells (BC) migration in the *Drosophila* ovary. Since membrane trafficking has been shown to be an essential regulator of BC migration (Figure 3.1A, schematic representation) (Assaker, Ramel

et al. 2010, Janssens, Sung et al. 2010) it is a potent model to study the *in vivo* regulation of vesicular trafficking. BCs allow the combination of *in vivo* cell biology techniques, high resolution imaging and *Drosophila* genetics, such as gene knockdown and overexpression. Thus, we screened for GAP proteins necessary for normal BC migration and identified Evi5 as an essential regulator of cell migration.

Here, we demonstrate that Evi5 acts as a Rab11-GAP since it fulfills various predictions that can be attributed to a GAP: (a) Evi5 physically and genetically interacts with Rab11 (b) overexpressing *Evi5* increases the fraction of the GDP-bound Rab11 and mimics the expression of a *Rab11* dominant negative (DN) form both *in vivo* and *in vitro* and (c) knocking down *Evi5* increases the fraction of the GTP-bound Rab11 and mimics the expression of a *Rab11* constitutive active (CA) form *in vivo*. We found that Evi5 is the critical Rab11-GAP essential for BC migration by maintaining active RTKs at the leading edge of the BC cluster.

### 3.4. Results

#### Analysis of potential Rab-GAP proteins during BC migration

In *Drosophila*, there are at least 27 potential Rab-GAP proteins: 26 containing a TBC domain and the ortholog of human RAB3GAP2 (*CG7061*), a Rab-GAP devoid of a TBC domain (Nagano, Sasaki et al. 1998). To identify Rab-GAP proteins regulating BC migration, we depleted by RNAi each of the 27 putative Rab-GAP proteins specifically in BCs and determined the consequence on BC migration (Table 3.1). We then calculated the migration index (M.I.) and the complementation index (C.I.) (see material and methods for details) to compare migration phenotypes. The strongest hit was *CG11727* (Table 3.1, Figure 3.1C, D). Also, we observed that RNAi lines against other candidates (*RN-tre*, *CG4552*, *CG7061* and *CG8155*) induce BCs migration defect (Table 3.1). Although we did not pursue their characterization, it is interesting to note that mammalian *RN-tre* acts as a GAP for Rab5 (Lanzetti, Rybin et al. 2000), which is also involved in BC migration (Assaker, Ramel et al. 2010).

*CG11727* encodes a protein with a predicted size of 89-93 KDa containing a TBC and a coiled-coil domain. Blast analysis reveals two well conserved *CG11727* orthologs in humans: EVI5 and EVI5-like (Figure 3.1B). Therefore, we refer to *CG11727* as *Evi5*. In human, the functions of EVI5 and EVI5-like are controversial since they were shown to target *in vitro* either Rab11 (Dabbekeh, Faitar et al. 2007) or Rab35 (Fuchs, Haas et al. 2007) and either Rab10 (Itoh, Satoh et al. 2006) or Rab23 (Yoshimura, Egerer et al. 2007), respectively (Figure 3.1B).

To demonstrate that the observed phenotypes induced by *Evi5* knockdown are not due to artefacts such as off-target effects, we performed rescue experiments. We observed that *Evi5* depleted BCs expressing a *Evi5-mcherry* transgene migrated in a similar fashion as the control (Figure 3.1E, G), indicating that the RNAi(*Evi5*) targets endogenous *Evi5* and that the *Evi5* tagged transgene used is functional. However, we could not rescue the *Evi5* knockdown phenotype by expressing a catalytically-dead form of *Evi5* (*Evi5<sup>RA</sup>*, Figure 3.1F, G, see material and methods), indicating that the Rab-GAP activity of *Evi5* is required for its

function during BCs migration. We next aimed at identifying the molecular target of Evi5 during BC migration.

### **Evi5 is recruited to the recycling endosome by the active form of Rab11**

To narrow down the potential substrates of Evi5, we screened for Rab proteins which colocalize with Evi5. We co-expressed Evi5-mcherry with candidate GFP or YFP-tagged Rabs in *Drosophila* S2 cells. The distribution of Evi5-mCherry is cytoplasmic and vesicular (Figure 3.2A). We tested whether Evi5 colocalizes in these vesicular structures with endocytic Rab proteins or with Rabs previously proposed to be targets of its orthologs. We expressed Rab5, 7, 10, 11, 23 and Rab35 in their GTP-locked forms (constitutive active - CA), which should increase their interaction with their GAP. The expression of *Rab11<sup>CA</sup>* drastically changed Evi5 distribution, as Evi5 was recruited to Rab11<sup>CA</sup> positive vesicles and disappeared from the cytoplasm (Figure 3.2E). Evi5 was not recruited to Rab5<sup>CA</sup> or Rab7<sup>CA</sup> enlarged endosomes (Figure 3.2B, C). Rab10<sup>CA</sup> formed vesicles that are often closely juxtaposed to Evi5 punctae, without overlapping (Figure 3.2D). In accordance, we saw a partial colocalization between Rab11 and Rab10 in S2 cells (unpublished observations). Rab23<sup>CA</sup> was mainly cytoplasmic and did not colocalize with Evi5 (Figure 3.2F). Finally, Rab35<sup>CA</sup> formed vesicles that rarely localized with Evi5 (Figure 3.2G).

Since Evi5 colocalizes preferentially with Rab11<sup>CA</sup>, we tested whether Evi5 colocalizes with Rab11<sup>WT</sup>, and found them on the same vesicles (Figure 3.2H). Altogether, our data show that Evi5 colocalizes with Rab11 and is recruited to vesicles by active Rab11.

### **Evi5 interacts with- and inactivates Rab11**

We tested whether Evi5 binds to GTP-bound Rab11 by coexpressing GST-Rab11 with other GFP-tagged proteins in S2 cell. GST pulled down experiments were performed on lysates followed by western blotting. We expressed wildtype, GDP-locked (dominant negative – DN) or CA mutant form of Rab11. As a positive control, we expressed a GFP-fusion of the Rab11 effector Rip11 known to interact preferentially with Rab11-GTP (Li, Satoh et al. 2007). As expected, GFP-Rip11 can be pulled down efficiently with Rab11<sup>CA</sup> and to a lesser extent with Rab11<sup>WT</sup> (Figure 3.2I, left panel). As a negative control, we expressed RN-tre together



with GST-Rab11 since RN-tre should not bind Rab11 (Haas, Fuchs et al. 2005). Indeed, RN-tre was not pulled down by any form of Rab11 (Figure 3.2I, middle left panel). In contrary, Evi5 was pulled down with Rab11<sup>CA</sup> (Figure 3.2I middle right panel). The catalytic dead mutant form of Evi5, Evi5<sup>RA</sup>, colocalizes (Figure 3.2J) and interacts with Rab11<sup>CA</sup> to the same extent as Evi5<sup>WT</sup> (Figure 3.2I, right panel). The interaction between Rab11 and Evi5 is thus independent of the catalytic arginine finger.

Next, to test whether Evi5 provides GAP activity to Rab11, we developed an effector pull-down assay based on the preferential binding of Rip11 to active Rab11 (Figure 3.2I). Here, GST-Rab11 is co-expressed in S2 cells together with GFP-Rip11, in presence or in absence of HA-Evi5. The activity of Rab11 is determined by measuring the amount of Rip11 that can be co-precipitated with GST-Rab11 from S2 cell lysates. If Evi5 is a Rab11-GAP, overexpressing Evi5<sup>WT</sup> should decrease the amount of Rip11 co-precipitated with Rab11 as the Rab11-GTP pool will decrease. Accordingly, the amount of GFP-Rip11 bound to Rab11 dropped when Evi5<sup>WT</sup> was expressed compared to the situation where Evi5 was not expressed (Figure 3.2K, left panel, first and second column). As expected, expressing Evi5<sup>RA</sup> did not inactivate Rab11 (Figure 3.2K, left panel, last column) as the amount of Rip11 co-precipitated was similar to the control. Moreover, expressing Evi5<sup>WT</sup> did not affect the general binding profile of Rip11 bound to Rab11<sup>CA</sup> (Figure 3.2K, right panel, L). This last experiment demonstrates that the decrease of Rip11 co-precipitated with Rab11<sup>WT</sup> in the presence of Evi5 is not due to a steric effect. Overall, the data presented thus far demonstrate that Evi5 is a GAP for Rab11.

### ***Evi5* genetically interacts with *Rab11* during BC migration**

Overexpression of a specific Rab-GAP protein is expected to inhibit a particular membrane trafficking step since it increases the rate of inactivation of its Rab target thus mimicking the expression of a dominant negative form of the Rab (Fukuda 2011). As the expression of *Rab11*<sup>DN</sup> leads to a strong migration block (Figure 3.3D and (Assaker, Ramel et al. 2010)), we asked whether overexpressing *Evi5* phenocopies *Rab11*<sup>DN</sup>. We observed a strong migration block in BCs expressing *Evi5* (Figure 3.3A, D). Expression of *Evi5*<sup>RA</sup> did not affect BC migration confirming that Evi5 requires its Rab-GAP activity to fulfil its function

(Figure 3.3B). Then, we performed the converse experiment and showed that knocking-down *Evi5* mimics the phenotype induced by expressing *Rab11<sup>CA</sup>* (Figure 3.3C, D).

To further explore the relationship between *Evi5* and *Rab11*, we tested for a potential genetic interaction between the two genes by measuring normalized M.I. (nM.I.) as in (Assaker, Ramel et al. 2010). Flies heterozygous for the null allele *Rab11<sup>ex1</sup>* (Dollar, Struckhoff et al. 2002) show no significant BC migration defect (nM.I. of 0.98 - Figure 3.3E, H). While expression of *Evi5* using *c306-Gal4* affected slightly migration in a control background (nM.I. of 0.79 - Figure 3.3F, H), the *Rab11<sup>ex1</sup>* heterozygous background enhanced the phenotype (nM.I. of 0.57 - Figure 3.3G, H). Also, the number of clusters unable to initiate migration is strongly increased when *Evi5* is expressed and a copy of *Rab11* is removed (Figure 3.3I). Taken together these results show a synergistic interaction between *Rab11* and *Evi5*, suggesting that *Evi5* collaborates with *Rab11* during BC migration.

### **Evi5 acts as a Rab11-GAP during BC migration**

We next wanted to demonstrate that *Evi5* acts as a Rab11-GAP during BC migration. Sec15 is an effector of Rab11 in *Drosophila* (Wu, Mehta et al. 2005) which forms vesicular-like structures at the leading edge of BCs (Figure 3.6 Suppl and 3.4A). We previously observed that expression of *Rab11<sup>DN</sup>* affects these structures (Assaker, Ramel et al. 2010). We rationalize that quantifying the Sec15 structure volume could serve as readout for Rab11 activity.

To determine the volume of GFP-Sec15 structures, we used high-resolution imaging combined with computational image analysis. To this end we developed an algorithm that segmented GFP-Sec15 structures from three-dimensionally reconstituted BC cluster images and quantified their volume. To confirm that our method could be used to monitor Rab11 activity, we expressed dominant negative forms of various endocytic Rabs and calculated the volume of GFP-Sec15 structures. Expression of *Rab4<sup>DN</sup>* and *Rab5<sup>DN</sup>* did not affect significantly the volume distribution of Sec15 structures, whereas *Rab7<sup>DN</sup>* reduces slightly their volume, but to a lesser extent than *Rab11<sup>DN</sup>*. *Rab11<sup>DN</sup>* reduced GFP-Sec15 structures to a volume lower than  $2\mu\text{m}^3$  and causes a cytoplasmic distribution of GFP-Sec15 (Figure 3.6

Supp1). To demonstrate that we can also detect gain of Rab11 activity, we expressed *Rab11<sup>CA</sup>* and found that it increases the size of Sec15 structures (Figure 3.4G and 3.6 Supp1C). These differences were significant both when comparing the volume distribution (KS test) or the median volume (ranksum test). Thus our method is highly sensitive to changes of Rab11 activity.

We next modulated *Evi5* expression and tested its effects on endogenous Rab11 activity in BCs. We expected that overexpressing *Evi5* would mimic a *Rab11* loss-of-function phenotype, and that knocking down *Evi5* would mimic a *Rab11* gain-of-function. Accordingly, we observed that overexpressing *Evi5* increases the cytoplasmic distribution of GFP-Sec15 whereas depleting *Evi5* increases the size of GFP-Sec15 structures (Figure 3.4D-F). Measured Sec15 structure volumes changed accordingly after modulating *Evi5* expression (Figure 3.4H, 3.6 Supp1C).

To confirm the data obtained with Sec15, we performed a similar analysis with Rip11, a specific Rab11 effector (Horgan and McCaffrey 2009). We expressed the Rab11 binding domain of Rip11 tagged to GFP (Li, Satoh et al. 2007) in BC clusters and performed the same analysis as for Sec15. Similarly, we found that expressing *Evi5* reduces the size of Rip11-GFP structures whereas depleting *Evi5* had the converse effect (Figure 3.7 Supp2). Overall, these results demonstrate that *Evi5* acts as a Rab11-GAP during BC migration.

## **Orthologs of other Rab11-GAPs do not regulate Rab11 during BC migration**

Two other Rab-GAPs have been demonstrated to accelerate the GTP hydrolysis of human Rab11 *in vitro*: GAPCENA (Fuchs, Haas et al. 2007) and TBC1D15 (Zhang, Walsh et al. 2005). Accordingly, both *CG7112* and *CG11490*, the orthologs of mammalian GAPCENA and TBC1D15, respectively (thereafter called *GapcenA* and *Tbc1d15-17*) colocalize with Rab11<sup>CA</sup> in S2 cells, although *Tbc1d15-17* colocalizes to a lesser degree (Figure 3.8 Supp3A). However, the RNAi screen results indicate that both *GapcenA* and *Tbc1d15-17* knockdown did not affect BC migration (Table 3.1). To further confirm that these two GAPs do not act on Rab11 during BC migration, we expressed *GapcenA* and *Tbc1d15-17* in BCs and did not

observe any migration block (Figure 3.8 Supp3 B-C). These results suggest that Evi5 is the critical Rab11-GAP involved in BCs migration.

### **Evi5 is essential to restrict locally the RTKs activity at the leading edge of BCs**

To achieve their directed collective cell migration toward the oocyte, BCs need to polarize their guidance receptors, which consist of receptor tyrosine kinases (RTKs), at their leading edge (Jekely, Sung et al. 2005). We have recently demonstrated that Rab11 is involved in restricting the activation of the RTKs at the front of the cell cluster (Assaker, Ramel et al. 2010). Thus, we hypothesize that Evi5 might also be important for the polarization of active RTKs. To test this, we assessed the distribution of phosphorylated Tyrosine (pTyr) that was previously used as a marker of RTK activity in BCs (Jekely, Sung et al. 2005, Assaker, Ramel et al. 2010). As previously published, we observed a strong polarization of the pTyr signal at the leading edge of control BCs, particularly within membrane protrusions (Figure 3.5A and C). Either overexpression or depletion of *Evi5* abolishes the enrichment of the pTyr signal at the leading edge (Figure 3.5B and D), as shown by the ratio of posterior over anterior pTyr signal in BCs (Figure 3.5E). These data demonstrate that a strict regulation of the recycling endosome is necessary for the proper spatial restriction of RTK activity.

Most of the previous studies focusing on GAP proteins were performed in cell culture or *in vitro*. Furthermore, only fragments of the proteins, such as the TBC domain, were used in most cases since GAP proteins are frequently large and insoluble. To circumvent these limitations, we have combined *in vitro* and *in vivo* approaches to demonstrate that the Rab-GAP Evi5 regulates Rab11 in *Drosophila*. Furthermore, our work identifies Evi5 as a new regulator of collective cell migration, necessary for the maintenance of active RTK at the leading edge.

### 3.6. Materials and methods

**Plasmid constructs.** Copper-inducible *pMET* vectors were used for GST pull down assay in S2 cells. *GST-Rab11<sup>WT</sup>*, *GST-Rab11<sup>DN</sup>*, *GST-Rab11<sup>CA</sup>* were cloned in pMet-picoblast-GFP (Gift from Vincent Archambault lab) and S2 stable cell lines expressing these constructs were generated.

The different Rab-GAP proteins were cloned in pUAS-Dest29 (Wirtz-Peitz, Nishimura et al. 2008) to be expressed in flies and in S2 cells. *Evi5(CG11727)* (EST GH14362), *GapcenA(CG7112)* (EST RE63030), *Tbc1d15-17(CG11490)* (EST LD27216) were first cloned in pDonor221 and transferred in pUAS-Dest29 using the Gateway system (Invitrogen).

To generate the constitutively active Rab proteins the following mutations were generated by quickchange mutagenesis (Zhang, Schulze et al. 2007): of *Rab5* (EST GH24702) Gln88 to Leu; *Rab7* (EST GH03685) Gln67 to Leu; *rab10* (EST LD39986) Gln68 to Leu; *Rab11* (EST LD14551) Gln70 to Leu; *rab23* (RH23273) Gln96 to Leu; *rab35* (LD21953) Gln67 to Leu. Using the Gateway System, Rab proteins were cloned in pAGW (EGFP in N-terminal), except *Rab11* which was cloned in pAVW (Venus in N-terminal). *Evi5* Arg160 to Ala (*Evi5<sup>RA</sup>*) was generated the same way. *Evi5<sup>WT</sup>* and *Evi5<sup>RA</sup>* were cloned in pDest29, pAWG (EGFP in C-terminal) and pAWH (HA-tag in C-terminal). *Rip11* (EST GH05001) was cloned in pAGW.

**Fly genetics.** Expression of proteins was driven specifically in the BCs using *slbo-Gal4*, *UAS-CD8-GFP* (Assaker, Ramel et al. 2010) at 29°C. dsRNA fly lines were from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) (Dietzl, Chen et al. 2007) or, when none were available for a certain gene, from the TRiP consortium at Harvard Medical School and were expressed using *c306-Gal4*, *UAS-GFP-Sec15* (Assaker, Ramel et al. 2010) at the indicated temperature. Both *CD8-GFP* and *GFP-Sec15* were expressed to facilitate the identification of the BCs inside the egg chamber. *Evi5* rescue experiments were done using *c306-Gal4*. Also, *slbo-Gal4*, *UAS-GFP-Sec15* was used for GFP-Sec15 analysis upon changes in Rab11 activity. Other stocks used include: *UAS-Rab11<sup>DN</sup>* (Assaker, Ramel et al. 2010), *UAS-Rab11<sup>CA</sup>* (Emery, Hutterer et al. 2005), *UAS-Rip11-GFP* (Li, Satoh et al. 2007), *Rab11<sup>ex1</sup>* (Dollar, Struckhoff et al. 2002). *Evi5*, *GapcenA* and *Tbc1d15-17* in pDest29 vector were injected into *Drosophila*

and insertion strains containing a single copy of each transgene were generated using standard methods. Transgenic flies expressing *Evi5<sup>RA</sup>* in pDest29 vector were generated by BestGene Inc.

**Indexes:** The migration index (M.I.) represents the mean distance migrated by the BCs, whereas the complementation index (C.I.) represents the percentage of clusters having completed migration and are calculated as previously described (Assaker, Ramel et al. 2010). Briefly, the M.I. was calculated with the formula

$$\text{M.I.} = (1*n(100\%) + 0.75*n(75\%) + 0.5*n(50\%) + 0.25*n(25\%) + 0*n(0\%) + 0.5*n(\text{split clusters}))/n(\text{total})$$

where  $n(100\%)$  correspond to the number of BC that reached the oocyte at stage 10, and  $n(75\%)$  correspond to the number of BC that reached 75% of the total distance, etc. The C.I. was calculated as follow  $\text{C.I.} = n(100\%)/n(\text{total})$ .

**Rab-GAP screen.** Identification of potential Rab-GAP proteins was done based on the presence of a TBC domain: Flymine Software was employed to identify genes containing the TBC domain and orthologs of previously described Rab-GAP proteins, revealing 27 proteins. Females were kept at 29°C for 2 days before ovaries were dissected. Variation in the penetrance of the phenotype between RNAi fly lines targeting the same gene can be explained by the strength of the dsRNA expression, the sequence of the dsRNA used and possible off-target effects.

**Details of Image Acquisition and Quantitative Analysis.** Images from fixed tissues were acquired using an LSM 510 META inverted confocal microscope (Zeiss), using either a 40× objective or a 63× objective and were processed as previously described (Assaker, Ramel et al. 2010). Quantifications of fluorescence intensities were performed on the original images using Image J (National Institutes of Health, Bethesda). Ratio of the pTyr signal at the leading and trailing edge (F(P)/F(A)) was determined as previously described (Assaker, Ramel et al. 2010). Note that we only quantified clusters that have not yet penetrated into the egg chamber, but were detached from other follicle cells.

**Reagents.** Glutathione-sepharose beads are from GE. Transfection reagent used in S2 cells is transit-L1 from Mirus. Antibodies used for immunostaining or immunoblotting were supplied from Cell signalling (GST), USBiological (GFP), the laboratory of Gerry Rubin (HA), and mouse monoclonal anti-phospho-Tyrosine (4G10). Secondary antibodies were purchased from Invitrogen and coupled to Alexa 555 or 647 dyes. Invitrogen Alexa fluor 555 and 647 – labelled phalloidin were used to visualize F-actin. DAPI (Sigma-Aldrich) was used to stain nuclei. Egg chambers were mounted in Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich). Concanavalin A (Sigma) and 96 wells are from Perkin-Elmer.

**GST pull-down analysis.** S2 cells were cultured in Schneider medium supplemented with 10% FBS and transfected with TransIT-LT1 (Mirus) on day 1. Protein expression was induced with 0,8mM of CuSO<sub>4</sub> on day 2. On day 4 cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer [20mM Tris (pH 8.0), 137mM NaCl, 1% Nonidet P40, 10% glycerol, 1mM EDTA] with protease inhibitors. For GST pull-down assays, 50µl of 50% slurry of glutathione Sepharose beads equilibrated in lysis buffer was added to protein lysates and rocked for 4h at 4°C. Beads were then washed three times with 1ml of lysis buffer. Total protein lysates or eluted proteins were resolved on an 8-10% SDS/Page, transferred to nitrocellulose membranes and immune-detected using specific antibodies.

**Imaging of S2 cells.** For fluorescence analysis, Rab and Rab-GAP proteins were cotransfected for 3 days and transferred for 1 hour on concanavalin A-coated 96-well plates and fixed in 4% formaldehyde for 30 minutes.

**Vesicle analysis.** Fluorescent images were analyzed using semi-automated software custom-written in MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA). Image analysis was performed in two steps: (1) BCs were identified by automated thresholding of the GFP-Sec15 channel. (2) Within the region of the BCs, fluorescent signals were detected in 3D by identifying connected groups of voxels that were significantly brighter than the local noise. Where nearby vesicles were close enough to one another so that their signals overlapped, the voxel groups were split into as many parts as they contained local maxima of intensity.

### **3.7. Acknowledgements**

We thank Donald F. Ready, Vincent Archambault, the Bloomington Stock Collection, the Vienna Drosophila RNAi Center, TRiP at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) and Bestgene for fly stocks and plasmids. We are grateful to Peter S. McPherson for critical reading of the manuscript and to Francis Barr for advices. We also thank Carole Iampietro for technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research to G.E. (MOP-114899). G.E. holds a Canada Research Chair (Tier II) in Vesicular Trafficking and Cell signalling. PSM is supported by grants from the CIHR (MOP 106548, MOP 115171), NSERC (355641) and the CCSRI (700824). PSM is the Canada Research Chair in Cell Division and Chromosomal Organization. C.L. holds a Canadian Institute for Health Research – Doctoral award.



### **3.8. Abbreviation list**

BC, border cell; C.I., completion index; EVI5, EVI5 ecotropic viral integration site 5; GAP, GTPase activating protein; RNAi, RNA interference; RTK, receptor tyrosine kinase; M.I., migration index; TBC, Tre-2/Bub2/Cdc16

### 3.9. Figure legends

**Figure 3.1: Rescue experiments demonstrate that CG11727 requires its GAP activity *in vivo***

(A) Schematic representation of *Drosophila melanogaster* egg chambers of stage 9 and 10. Red represents the actin staining, blue the nucleus, and green the BCs. BCs migrate from the anterior tip toward the posterior oocyte, left to the right in all images.

(B) Schematic representation of the *Evi5* gene and its human orthologs, EVI5 and EVI5-like. The sequence similarity in the TBC domain between *Evi5* and its human ortholog and the proposed targets of EVI5 and EVI5-like are depicted. The position of the catalytic arginine residue in *Evi5* mutated for an alanine is illustrated.

(C-F) Representative examples of BCs migration in a stage 10 egg chamber under the indicated conditions using C306-Gal4 driver. Control (C) or RNAi(*Evi5*) (D) are represented. Representative examples of BC expressing RNAi(*Evi5*) and where *Evi5* was reintroduced by expression of *Evi5-mcherry* (E) or *Evi5<sup>RA</sup>-mcherry* (F). BCs are stained with phalloidin (red) and DAPI (blue). Bar = 20µm.

(G) The percentage of migration is expressed as the Migration Index (M.I.) and Complementation Index (C.I.) for the indicated conditions above (35 < n < 161).

**Figure 3.2: *Evi5* acts as a Rab11-GAP *in vitro***

(A-H) Representative images of S2 cells transfected with *Evi5-mcherry* and the indicated GFP- or -YFP- tagged form of *rab*. Rab proteins are either expressed in their wildtype or constitutive active form. A grayscale image of both the green and red channel is shown for every images. Bar = 5µm.

(I) S2 cells were co-transfected with the wildtype, dominant negative or constitutive active forms of *GST-Rab11* together with the indicated GFP-constructs. Pull downs (Pd) using glutathione beads was performed on lysates. Proteins bound to GST-Rab11 were detected by western blot.

(J) *YFP-Rab11<sup>CA</sup>* was coexpressed with *Evi5<sup>RA</sup>-mcherry* in S2 cells. Bar = 5µm.

(K) Effector pull down assays performed with lysates from S2 cells co-transfected with *GST-Rab11<sup>WT</sup>* (left) or *GST-Rab11<sup>CA</sup>* (right) together with *GFP-Rip11* with or without *HA-Evi5*. Pull down of GST-Rab11 and protein analysis was done as in (I).

(L) Quantification of the total pulled down GFP-Rip11 normalized to the control on three (*GST-Rab11<sup>CA</sup>*) or four (*GST-Rab11<sup>WT</sup>*) independent experiments. (\*\*\*)  $p < 0,05$  t-test, N/S non-significant)

### **Figure 3.3: *Evi5* genetically interacts with *Rab11***

(A-C) Representative examples of egg chambers expressing *Evi5-mcherry* (A), *Evi5<sup>RA</sup>-mcherry* (B) and *Rab11<sup>CA</sup>* using *slbo-Gal4* driver. (The arrowhead indicates BCs).

(D) M.I. and C.I. for the indicated conditions. ( $51 < n < 161$ ).

(E-G) Representative images of *c306-Gal4, Rab11<sup>ex1/+</sup>* (E), *c306-Gal4, Evi5-mcherry/+* (F) and *c306-Gal4, Rab11<sup>ex1/+</sup>, Evi5-mcherry* (G) egg chambers.

(H) M.I. for the indicated conditions. The red bar represents the difference between the expected indexes if the phenotype were only additive. ( $46 < n < 188$ ).

(I) Percentage of BCs having completed 0, 25, 50, 75 and 100% of their migration at stage 10 for the indicated conditions.

### **Figure 3.4: *Evi5* regulates *Rab11* during BC migration**

(A-F) Representative images showing the distribution of GFP-Sec15 at the onset of migration (stage 9) for the indicated conditions. Bar = 5 $\mu$ m.

(G-H) Computational analysis of the conditions (A-F) as in Figure 3.S1F. ( $504 < n$  vesicles < 1682) (\*\*\*)  $p < 0,05$  KS-test and ranksum test, see Figure 3.S1G).

### **Figure 3.5: *Evi5* is necessary to properly localize active RTKs at the leading edge of BCs**

(A-D) Representative images showing the distribution of pTyr (red) at the onset of the migration process in stage 9 egg chambers in the indicated conditions. Nuclei are stained with DAPI (Blue). A grayscale image of the red channel is shown for every image. A dashed line delimits the BC cluster in the colored image. Bar = 5 $\mu$ m.

(E) Quantification of pTyr fluorescence ratio in the posterior half of the cluster [F(P)] to the anterior half [F(A)] at the onset of migration for the indicated conditions. ( $10 < n < 17$ ) (\*\* $P < 0.005$ , Student's t test).

(F) Schematic representation of the endocytic cycle regulating the polarization of RTKs during BC migration. Vesicle trafficking steps illustrated in green and in blue are regulated by Rab5 and Rab11, respectively. Moreover, Evi5 the Rab11-GAP protein identified in this study as novel regulator of BC migration, is shown in red. RN-tre is shown as the potential Rab5-GAP involved in BC, as it was found in RNAi screen as necessary for BC migration and its mammalian orthologs are known to act on Rab5.

### **Figure 3.6 (Supp.1): Analysis of GFP-Sec15 compartments volume**

(A-E) Representative images showing the distribution of GFP-Sec15 at the onset of migration (stage 9) for the indicated conditions. Bar =  $5\mu\text{m}$ .

(F) Computational analysis of the conditions (A-E). Computational analysis of the conditions (A-F). Violin plots are vertical, side-by-side displays of histograms that represent the relative distribution of vesicle counts for a given volume. To facilitate comparison of the histogram shapes, we normalized each histogram by its maximum bin size. Thus, within each histogram, relative bin size reflects relative numbers of vesicles, but bin sizes across histograms are not comparable. The distributions were thresholded at  $0.5\mu\text{m}^3$ . Green crosses indicate the median of the thresholded distribution. ( $458 < n \text{ vesicles} < 1472$ )

(G) Statistical analysis of the distribution (KS-test) and the median (ranksum test) of the GFP-Sec15 compartment population under different conditions. p-values are indicated for each described statistical test. p-values are significant when lower than 0,05.

### **Figure 3.7 (Supp.2): Analysis of the distribution of GFP-Rip11 after modulating Rab11 activity**

(A-C) Representative images showing the distribution of GFP-Rip11 at the onset of migration (stage 9) for the indicated conditions. Bar =  $5\mu\text{m}$ .

(D) Computational analysis of GFP-Rip11 vesicles of the conditions (A-C) as in Figure 3.S1F. The distributions were thresholded at  $0.1\mu\text{m}^3$ . ( $732 < n \text{ vesicles} < 1334$ ) (\*\*\*)  $p < 0,05$  (KS-test and ranksum test)

(E) Statistical analysis of the distribution (KS-test) and the median (ranksum test) of the GFP-Rip11 vesicle population under different conditions. p-values are indicated for each described statistical test. p-values are significant when lower than 0,05.

**Figure 3.8 (Supp.3): GapcenA and Tbc1d15-17 are not involved in BC migration**

(A) Representative images showing the distribution of Evi5, GapcenA and Tbc1d15-17 when co-expressed with *YFP-Rab11<sup>CA</sup>* in S2 cells. A grayscale image of both the green and red channel is shown for every image.

(B) M.I. and C.I. of BCs of different fly lines expressing *GapcenA-mcherry* and *Tbc1d15-mcherry* compared to the expression of *Evi5-mcherry*.

(C) Representative images of stage 10 egg chambers in which the BCs express the indicated constructs.

Table 3.I : M.I. and C.I. resulting from knockdown of every potential Rab-GAP protein during BC migration

<b>Drosophila identifier</b>	<b>Common name</b>	<b>dsRNA (VDRC#)</b>	<b>M.I.</b>	<b>C.I.</b>	<b>n</b>	<b>Human ortholog</b>
CG1093	pollux	27335	N/A	N/A	N/A	TBC1D1, TBC1D4
		106969	0,98	0,95	20	
CG1695	CG1695	20340	0,88	0,69	29	SGSM1-2
		48062	0,98	0,95	22	
		106947	0,875	0,74	34	
CG4041	CG4041	34780	0,83	0,67	3	TBCK
		108887	0,98	0,95	55	
CG4552	CG4552	40538	0,51	0,30	41	TBC1D23
		110700	0,98	0,96	47	
CG5337	CG5337	22070	0,99	0,94	17	TBC1D16
		22069	0,96	0,90	20	
		110067	1,00	1,00	20	
CG5344	whacked	22081	0,96	0,92	24	TBC1D10A-B-C
		22082	0,88	0,75	44	
CG5745	CG5745	35034	0,97	0,93	45	TBC1D22A-B
		35036	0,94	0,84	32	
		108659	1,00	1,00	21	
CG5916	CG5916	110561	0,95	0,90	20	TBC1D6
CG5978	CG5978	21000	0,98	0,94	72	TBC1D13
		21001	0,97	0,92	38	

		110396	0,97	0,93	28	
		14705	0,88	0,78	32	
CG6182	CG6182	14706	0,97	0,93	15	TBC1D7
		106667	0,98	0,94	34	
		27823	0,97	0,94	17	
CG7061 <sup>a</sup>	CG7061	27824	0,88	0,79	39	RAB3GAP2
		106905	0,54	0,41	39	
CG7112	GapcenA <sup>b</sup>	35174	0,92	0,82	91	RAB-GAP1(GAPCENA),
		103588	0,97	0,93	61	TBC1D18
CG7324	CG7324	32929 <sup>d</sup>	0,96	0,89	232	TBC1D8B-9B
		25535	1,00	1,00	16	
CG7742	CG7742	25536	0,99	0,97	32	TBC1D19
		100125	0,99	0,96	28	
		28192 <sup>c,e</sup>	0,56	0,36	96	
CG8085	RN-tre	28194 <sup>e</sup>	0,65	0,42	73	RNTRE (USP6NL),
		108670	0,87	0,75	60	TBC1D28, USP6,
						TBC1D3F-G-H
		24218	0,85	0,75	28	
CG8155	CG8155	24221	0,58	0,42	31	TBC1D25
		108444	0,99	0,95	22	
CG8449	CG8449	24102	1,00	1,00	17	TBC1D5
		44655	0,99	0,98	42	
CG9339	CG9339	108736	0,99	0,96	23	TBC1D24
CG11490	Tbc1d15-17 <sup>b</sup>	20040	0,95	0,90	66	TBC1D15-17

		1096668	0,94	0,84	51	
		17548	0,76	0,61	85	
CG11727	Evi5 <sup>b</sup>	17549 <sup>e</sup>	0,32	0,14	161	EVI5, EVI5L
		105146	0,88	0,73	49	
CG12241	CG12241	33729 <sup>d</sup>	0,95	0,90	201	SGSM3
		20315	0,82	0,76	17	
CG16896	CG16896	20316	0,97	0,88	18	WDR67
		107134	0,91	0,81	43	
CG17883	CG17883	30277	0,94	0,83	30	TBC1D20
CG32506	CG32506	28776 <sup>d</sup>	0,96	0,89	232	SGSM1-2
CG32580	CG32580	105591	0,99	0,96	24	MUC16
		25906	0,97	0,92	83	
		40143	1,00	1,00	12	
CG33715	Msp-300	40145	0,98	0,95	42	SYNE1-2, CLMN
		50192	0,71	0,58	19	
		107183	0,99	0,98	56	
		109023	0,97	0,93	29	
CG42795	CG42795	17314	0,95	0,90	73	TBC1D30
		108779	0,98	0,93	29	

N/A : This dsRNA line affects drastically the morphology of the egg chamber

<sup>a</sup>: This Rab-GAP proteins does not have a TBC domain

<sup>b</sup>: These common names have been introduce in this study

<sup>c</sup>: Crosses were performed at 25C to minimize morphological phenotypes

<sup>d</sup>: Lines from TRiP at Harvard Medical School

<sup>e</sup>: This RNAi fly line is used subsequently is this study



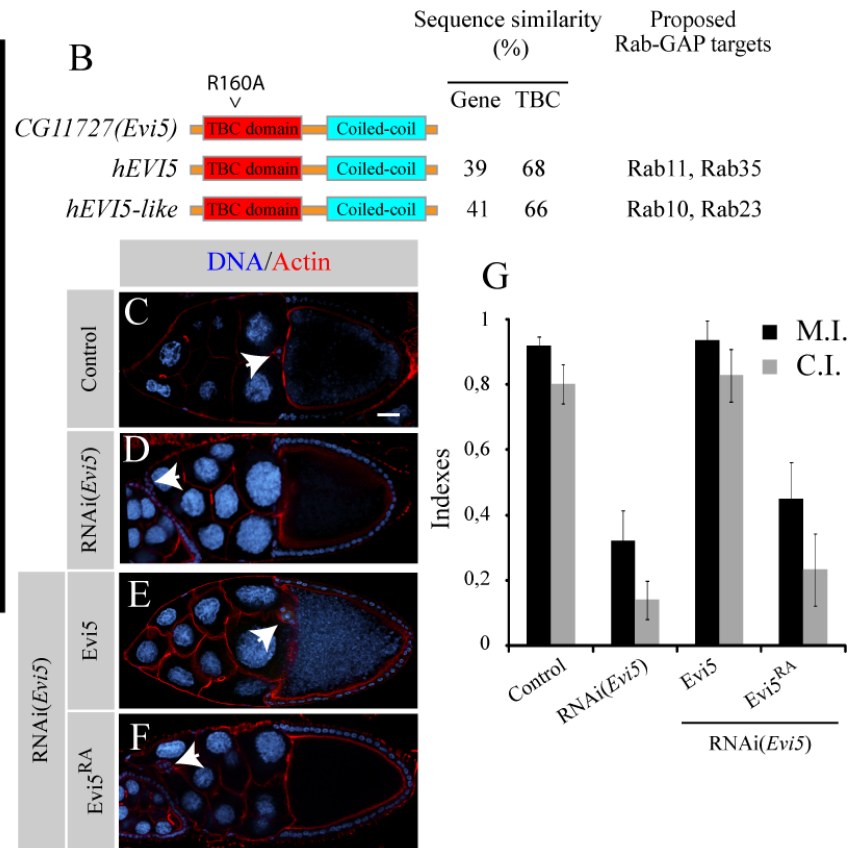
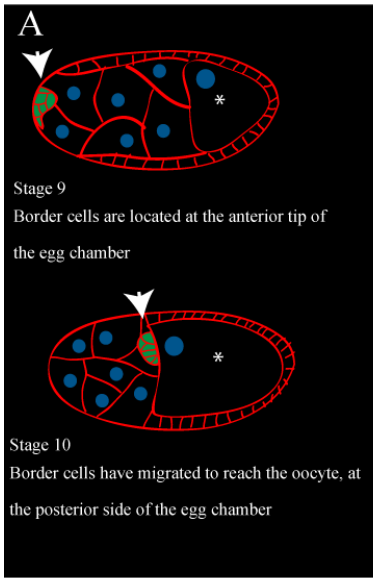


Figure 3.1 : Rescue experiments demonstrate that *CG11727* requires its GAP activity *in vivo*

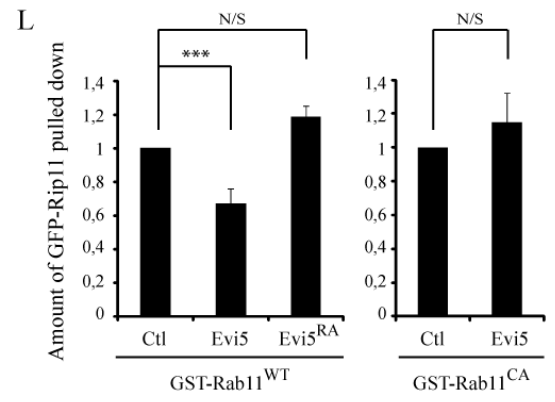
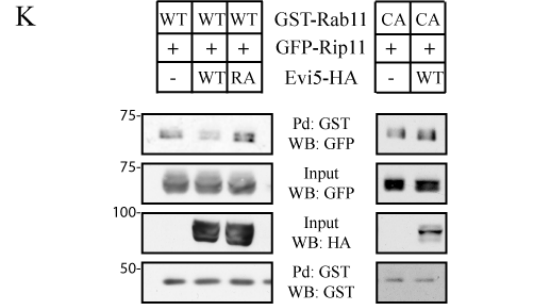
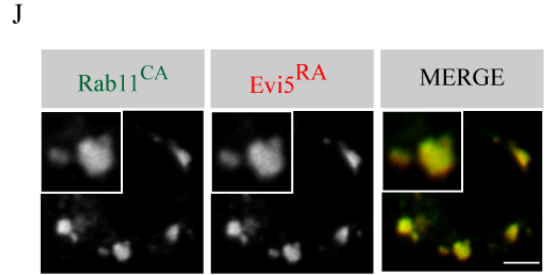
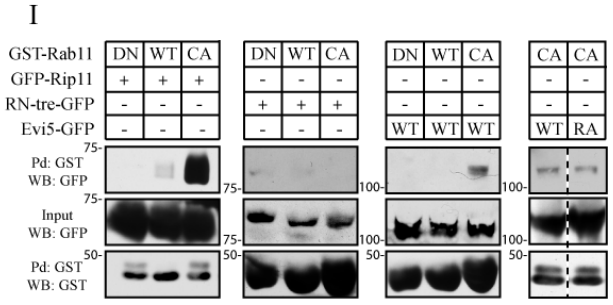
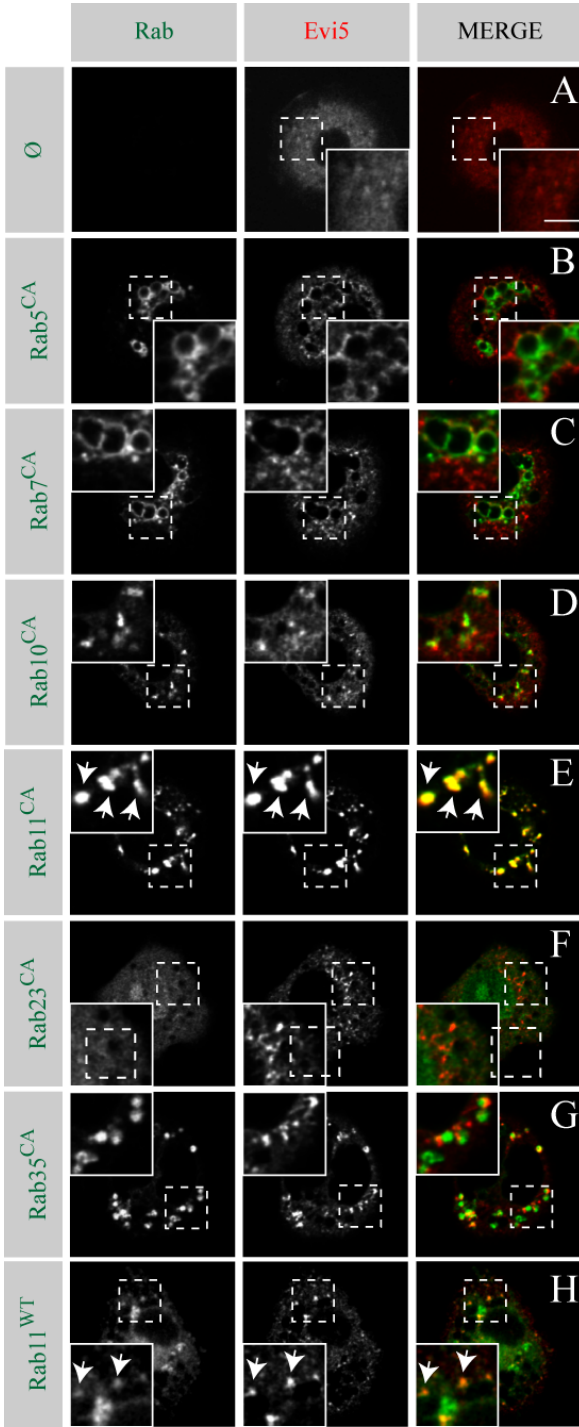


Figure 3.2 : Evi5 acts as a Rab11-GAP in vitro

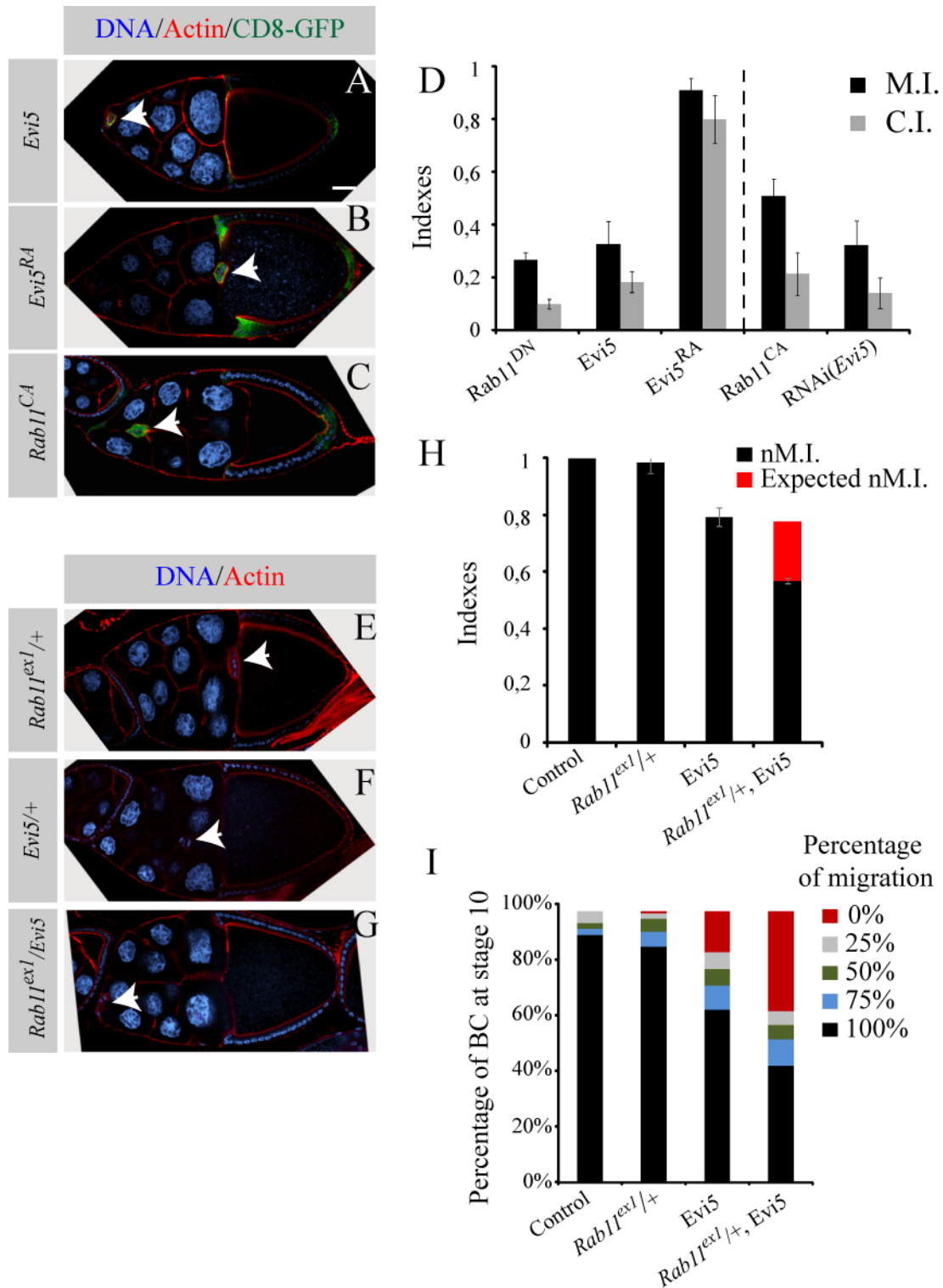


Figure 3.3 : *Evi5* genetically interacts with *Rab11*

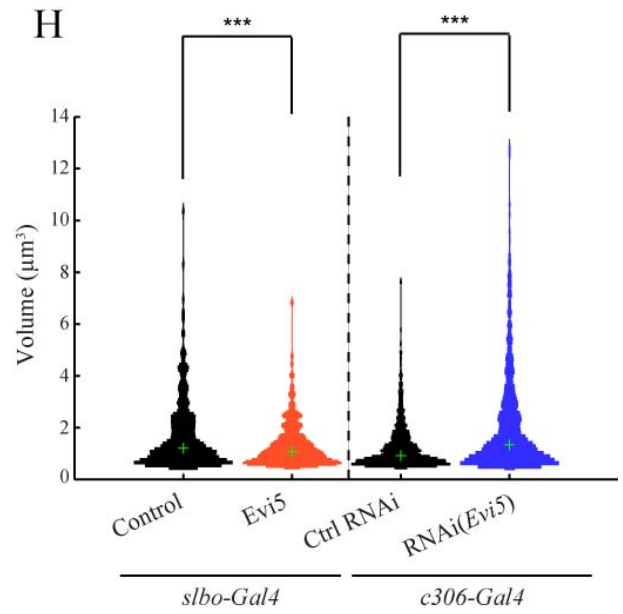
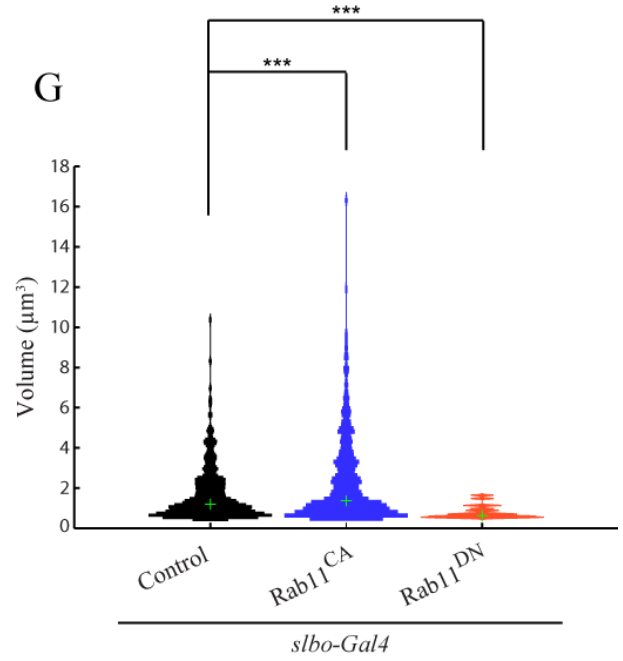
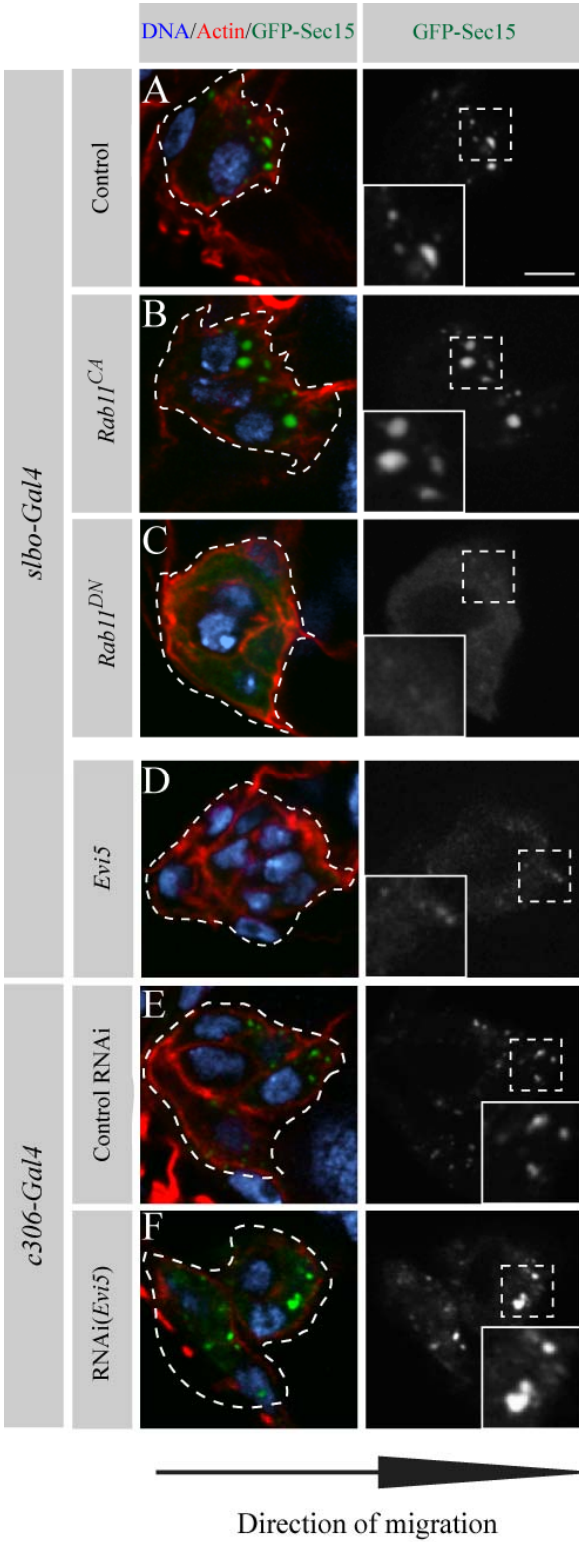


Figure 3.4 : Evi5 regulates Rab11 during BC migration

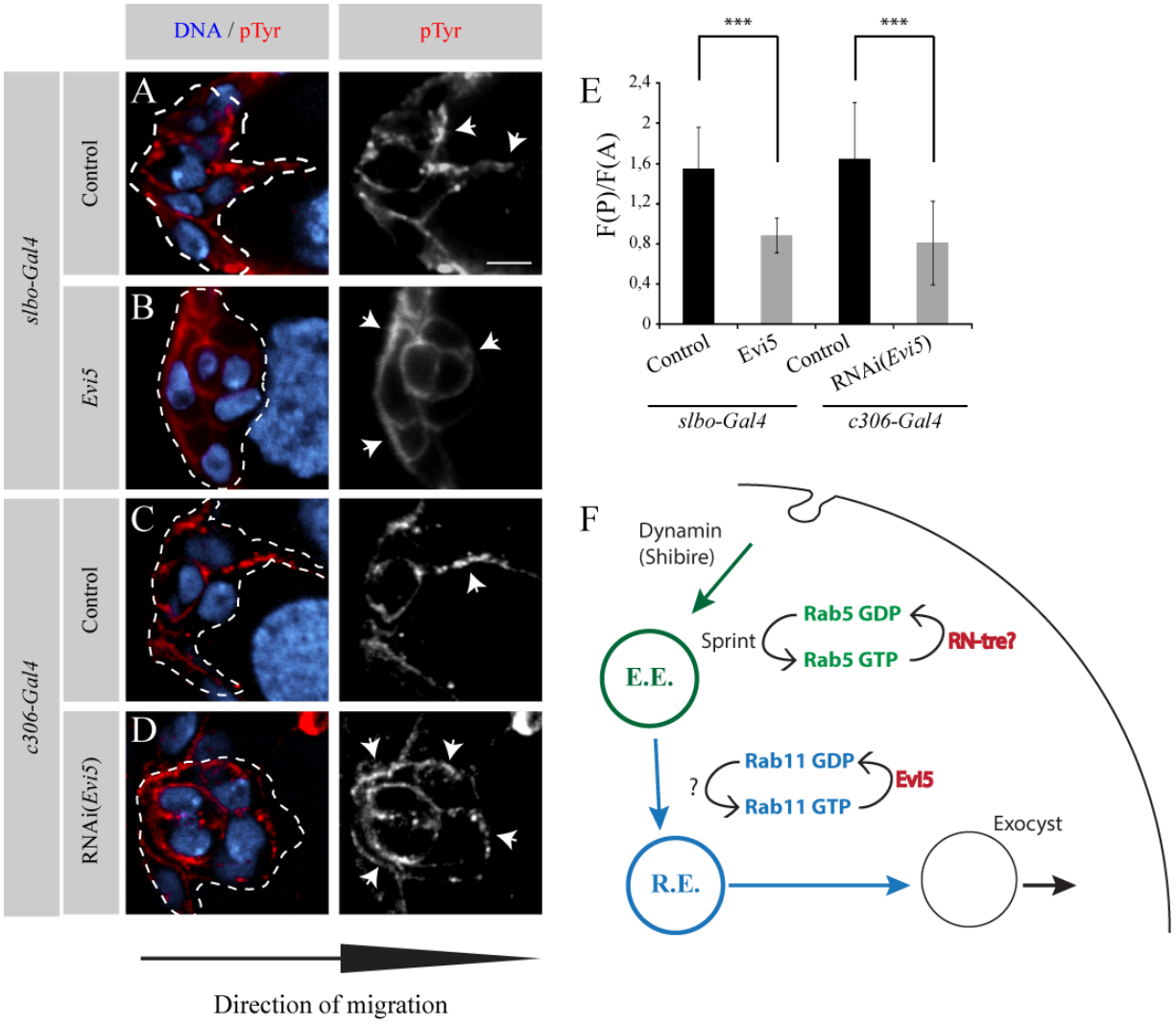
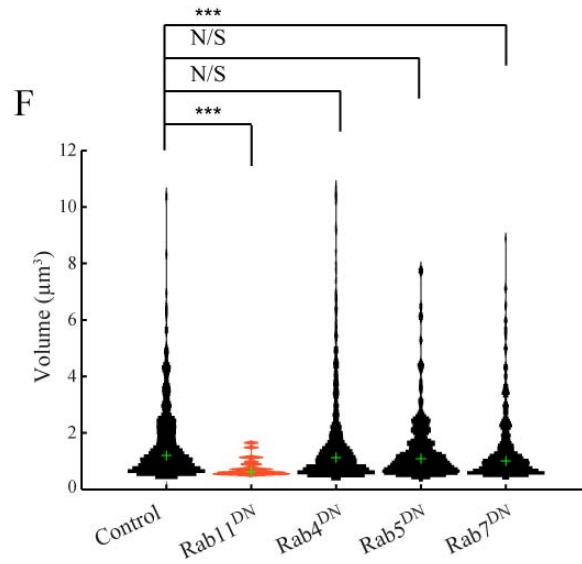
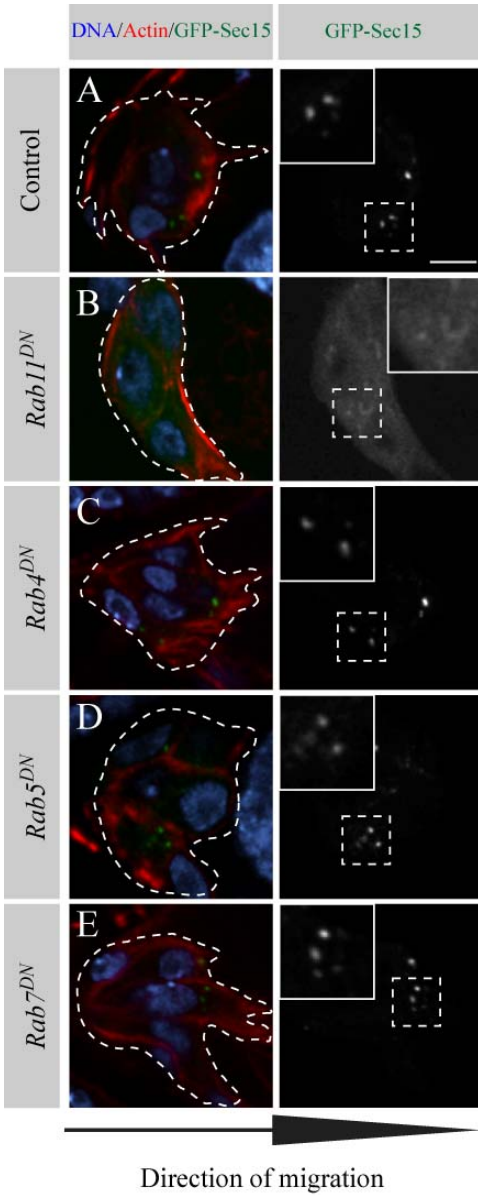


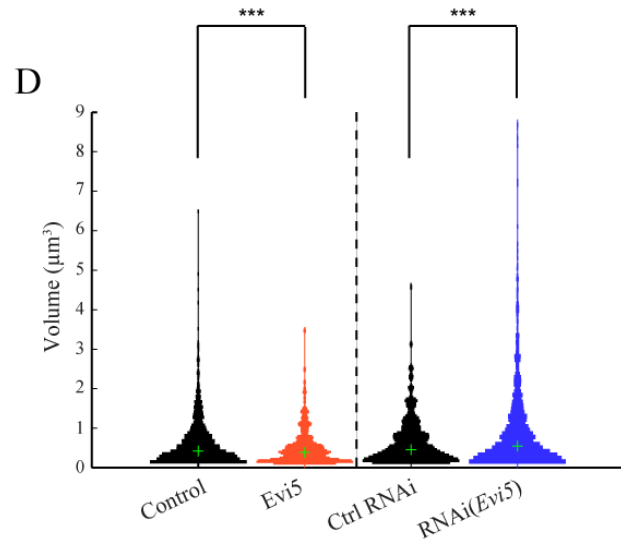
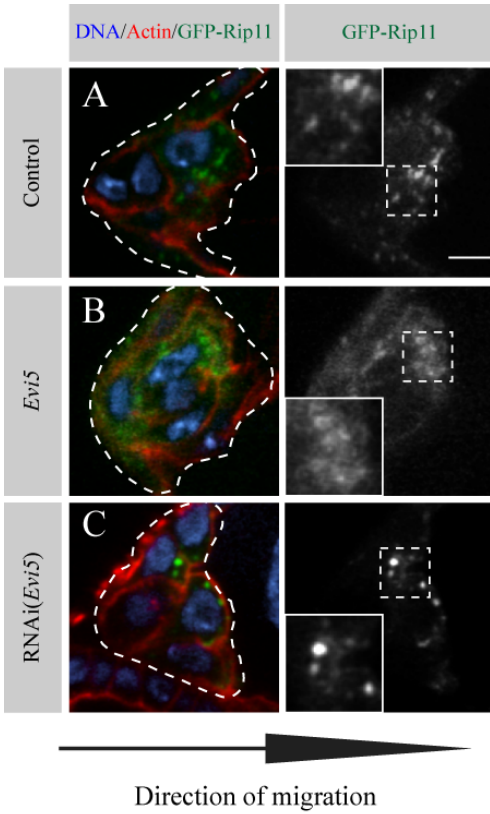
Figure 3.5 : Evi5 is necessary to properly localize active RTKs at the leading edge of BCs



**G**

Condition #1	Condition #2	KS-test >0.5 $\mu\text{m}^3$	Ranksum test >0.5 $\mu\text{m}^3$
Control	Rab11 <sup>CA</sup>	0,0031	0,0072
Control	Rab11 <sup>DN</sup>	6,9E-05	1,6E-06
Control	Evi5	0,0055	0,0050
Control	Rab4 <sup>DN</sup>	0,17	0,072
Control	Rab5 <sup>DN</sup>	0,13	0,054
Control	Rab7 <sup>DN</sup>	0,0024	0,00096
Control RNAi	RNAi( <i>evi5</i> )	2,7E-15	1,4E-20

Figure 3.6 (Supp.1) : Analysis of GFP-Sec15 compartments volume



E

Condition #1	Condition #2	KS-test >0.1μm <sup>3</sup>	Ranksum test >0.1μm <sup>3</sup>
Control	Evi5	0,0070	0,0011
Control RNAi	RNAi( <i>evi5</i> )	0,00093	0,00033

Figure 3.7 (Supp.2) : Analysis of the distribution of GFP-Rip11 after modulating Rab11 activity

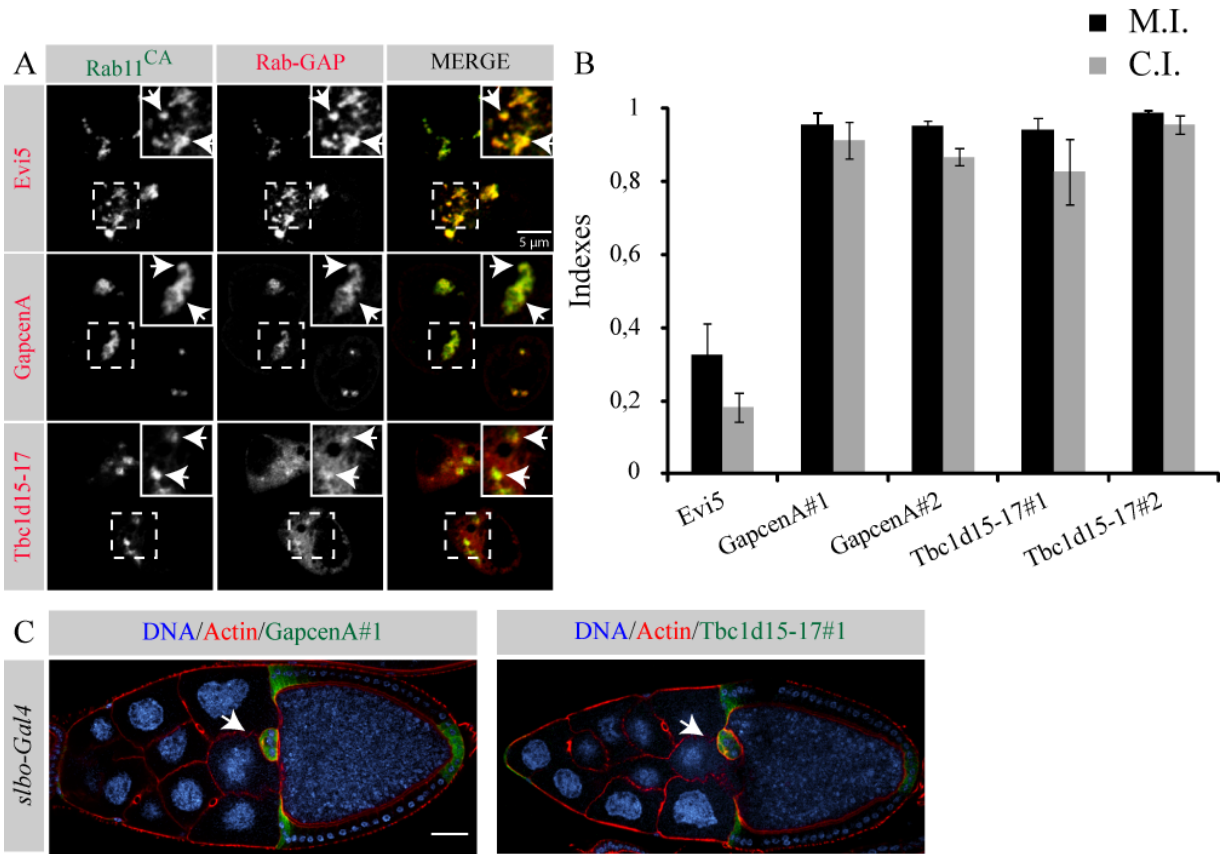


Figure 3.8 (Supp.3) : GapcenA and Tbc1d15-17 are not involved in BC migration



## CHAPITRE 4

### ARTICLE

*Drosophila* and mammalian proteomic analysis of the 14-3-3 interactome reveals a functional interplay with Rip11/Rab11-FIP5 during cytokinesis

*In preparation, 2015*

## **4. *Drosophila* and mammalian proteomic analysis of the 14-3-3 interactome reveals a functional interplay with Rip11/Rab11-FIP5 during cytokinesis**

Carl Laflamme<sup>1</sup>, Jacob Galan<sup>1</sup>, Khaled Ben El Kadhi<sup>1</sup>, Carlos Zeledon<sup>1</sup>, Arturo Papaluca<sup>1</sup>, Pierre Thibault<sup>1</sup> Sebastien Carreno<sup>1</sup>, Philippe Roux<sup>1</sup> and Gregory Emery<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) and Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7

## 4.1. Contribution des coauteurs

Cet article lève le voile sur une nouvelle interaction entre les protéines d'échafaudage 14-3-3 et les membres de la famille des Rab11-FIPs de classe I. Cet article a évolué grâce à plusieurs collaborations fructueuses entre différents laboratoires de l'IRIC.

JG, du groupe de PR, a développé et exécuté les *GST pull down* de 14-3-3 suivi de spectrométrie de masse et a identifié, avec l'aide de PT, les FIPs de classe I comme nouveaux régulateurs de 14-3-3 (Figure 4.1). JG a aussi réalisé tous les *GST pull down* de 14-3-3 de la Figure 4.2. JG a développé et exécuté les *Farwestern blots* (Figure 4.2G, F).

Pour ma part, j'ai généré toutes les constructions et j'ai généré toutes les lignées cellulaires S2 stables utilisées lors de cette étude (Figure 4.2 à 4-7, 4-8 (Supp.1), sauf exception, voir *Materiel and methods*). J'ai optimisé et exprimé GFP-Rip11 à partir de S2 pour tous les *GST pull down*. J'ai développé et exécuté les immunoprécipitations de Rip11, de Rab11 et de 14-3-3 (Figure 4.3E à H, Annexe II). J'ai caractérisé la distribution de Rip11 (avec l'aide de AP) et de celle de Rab11 lors de la cytokinèse et j'ai quantifié la distribution de Rip11 (Figure 4.4). J'ai décelé un rôle pour Rip11 lors de la cytokinèse. KK, du labo de SC, a quantifié les défauts de cytokinèse lors de la déplétion de Rip11 et lors des expériences de sauvetage (*rescue*) et a caractérisé les défauts de cytokinèse tardif lors de la déplétion de Rip11 (Figure 4.5A, 4-6A). CZ a caractérisé le mutant Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18 (Figure 4.6C, D). J'ai par la suite criblé plusieurs régulateurs de la cytokinèse (Figure 4.8 (Supp.1)) et j'ai effectué un pull down de Rip11 suivi de spectrométrie de masse afin d'identifier des régulateurs de la cytokinèse qui sont distribués dépendamment de Rip11 (Annexe II, Figure 4.7 et Figure 4.8 (Supp.1)). J'ai quantifié la distribution de Scamp (Annexe II), Rab35 et de Pav (Figure 4.7) dans différentes conditions.

Le manuscrit a été écrit par JG et moi-même.

*Notes : Les expériences des Figures 4-6(C-D) et 4-7 n'ont été réalisées que deux fois, alors que celles de la Figure 4.8 (Supp.1) n'ont été réalisées qu'une seule fois et demeurent donc préliminaires.*

## 4.2. Abstract

The 14-3-3 family of phospho-Ser/Thr binding proteins orchestrates a complex network of molecular interactions that affect various biological functions, such as cell growth, cell cycle progression, apoptosis and differentiation. 14-3-3 is expressed in all eukaryotic cells and thus likely regulates core cellular processes through evolutionarily conserved protein interactions. To address this, we used affinity-based chromatography combined with tandem mass spectrometry to identify 14-3-3 client proteins common to human and fly cells. This approach led to the identification of 145 conserved 14-3-3 binding proteins, including the class I Rab11-FIPs (Rip11 in *Drosophila*) which are Rab11 effector molecules. Interestingly, we identified that the interplay between Rip11 and 14-3-3 is necessary for completion of cytokinesis in *Drosophila* S2 cells. We further found that the polarized distribution of Rip11 during cytokinesis is dependent on 14-3-3 binding. We later identify the small GTPase Rab35 and Pavarotti [(the *Drosophila* ortholog of human mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1))] as being distributed to the cleavage furrow/midbody through Rip11-dependent trafficking. Taken together, this novel and conserved class I Rab11-FIPs interaction with 14-3-3 highlights the necessity for more protein-protein interaction screens across different species and deepens our understanding of the role of 14-3-3 and Rip11 during cell division.

### 4.3. Introduction

The evolutionary conserved 14-3-3 family of pSer/Thr-binding proteins dynamically regulates the activities of various client proteins involved in diverse biological processes (Zhao, Meyerkord et al. 2011). 14-3-3 proteins form homo- and/or hetero-dimers that can influence cell-signaling events through binding a wide-variety of proteins and regulates a complex network of molecular interactions to achieve well-controlled physiological outputs, such as apoptosis, cell growth and proliferation (Gardino and Yaffe 2011). The three-dimensional structural analysis of mammalian 14-3-3 revealed that the dimeric protein has a U-shaped configuration, forming a groove that can accommodate two peptides from binding partners (Liu, Bienkowska et al. 1995). Additionally, many 14-3-3-binding proteins contain a general consensus motif, which consist in of RSXpS/TXP (mode1) or RXXS/TXP (mode 2) (Gardino and Yaffe 2011). The molecular functions of 14-3-3-substrate binding are diverse and can result in but is not limited to client protein stabilization, regulation of protein localization, active/inactivation of activity and inhibition or requirement of protein complex assembly (reviewed in Reinhardt HC and Yaffe MB 2013). The diversity of the 14-3-3 family is highlighted in mammals which contain seven isoforms ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ , and  $\tau$ ), and *Arabidopsis thalia* which has thirteen 14-3-3 isoforms (Rosenquist, Sehnke et al. 2000, Zhao, Meyerkord et al. 2011); however, only two orthologs are present in *Drosophila* ( $\epsilon$  and  $\zeta$ ) and *C. elegans* (PAR-5 and FTT2).

One critical question is to what extent 14-3-3 clients are conserved across species and how their binding could represent core and fundamental properties for cellular function. Therefore, we propose that identification of common 14-3-3 interactors across species will reveal protein-protein interactions essential to cellular function and help understand the role of 14-3-3 in diverse biological processes. Herein, we present an unbiased mass spectrometry-based proteomic approach to identify novel phospho-dependent 14-3-3 binding proteins conserved in *Drosophila* and mammalian cells, which identified class I Rab11-FIPs (mammalian FIPs 1-2-5 and *Drosophila* Rip11) as 14-3-3 clients.

Class I Rab11-FIPs are effectors of the small GTPase Rab11 that contain a C2 domain which targets those proteins to the cell membrane (Prekeris, Klumperman et al. 2000, Lindsay

and McCaffrey 2004) and a Rab11-binding domain (RBD) (Prekeris, Davies et al. 2001, Jagoe, Lindsay et al. 2006, Shiba, Koga et al. 2006, Burke, Inglis et al. 2014). Class I Rab11-FIPs are involved in polarized transport of cargos during epithelial cell polarity and are known to be regulated through phosphorylation. For example, phosphorylation of FIP2 by MARK2 regulates the distribution of various adherent and tight junction proteins (Ducharme, Hales et al. 2006, Lapierre, Avant et al. 2012). Similarly, ERK (Su, Bryant et al. 2010) and GSK3 (Li, Mangan et al. 2014) are known to phosphorylate FIP5 and to regulate its function in immunoglobulin A transcytosis and in apical lumen formation, respectively. *Drosophila* Rip11, the sole class I Rab11-FIP in flies, is involved in rhodopsin transport to the apical surface of photoreceptor cells (Li, Satoh et al. 2007) and in E-cadherin trafficking during trachea formation (Shaye, Casanova et al. 2008). In photoreceptors cells, a ternary complex between Rip11/myosin motor (myosin V)/Rab11 is suggested and both myosin V and Rip11 loss of function leads to rhodopsin trafficking defects (Li, Satoh et al. 2007), indicating that Rip11 spatial and temporal distribution is necessary for its function in cargo trafficking.

Our results show that Rip11 and 14-3-3 functional interplay is essential during *Drosophila* S2 cell cytokinesis. Cytokinesis is the last step of cell division which partitions the cytoplasm of the two daughter cells in two distinct domains. The contraction of the equatorial acto-myosin ring forms the cleavage furrow which results in the ingression of the plasma membrane and later on forms the intercellular bridge. Compaction of the central spindle by the cleavage furrow leads to the formation of the midbody, which is important for final abscission of the plasma membrane (cytokinesis is reviewed in (Green, Paluch et al. 2012, D'Avino, Giansanti et al. 2015). Rab11 (Skop, Bergmann et al. 2001, Cheng, Sugiura et al. 2002, Riggs, Rothwell et al. 2003, Wilson, Fielding et al. 2005, Giansanti, Belloni et al. 2007) and class II Rab11-FIPs (Riggs, Rothwell et al. 2003, Fielding, Schonteich et al. 2005, Wilson, Fielding et al. 2005, Riggs, Fasulo et al. 2007, Cao, Albertson et al. 2008, Schiel, Simon et al. 2012) are among the numerous identified cytokinesis regulators. However, to our knowledge, class I Rab11-FIPs function during cytokinesis has never been addressed. Here we provide evidence that Rip11 is involved in the recruitment of the small GTPase Rab35 and Pavarotti [(the *Drosophila* ortholog of human mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1)] at the midbody. We demonstrate that Rip11 function during cytokinesis is dependent on its interaction with 14-3-3

mediated by the phosphorylation of residues T391 and S405, but not on its binding to Rab11. Altogether, these results cast light on the diverse roles of 14-3-3 and Rip11 in cell division.

## 4.4. Results

### A Proteomic Strategy for Characterizing the Phospho-Dependent 14-3-3 interactome

To characterize the phospho-dependent 14-3-3 interactome, we devised a comprehensive and unbiased mass spectrometry based-proteomic strategy. As biological models, we used *Drosophila* S2 cells and HEK293 cells treated with the phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) to acutely stimulate the MAPK pathway. We used a pull-down approach that takes advantage of a mutation in 14-3-3 (K49E) preventing phospho-dependent substrate binding and included two subtractive fractionation steps in which nonspecific (GST alone) and non-phospho-dependent (GST-14-3-3<sup>K49E</sup>) interactions were removed (Figure 4.1A). Cell lysates were then subjected to 14-3-3 binding purification (WT or K49E) and bound proteins were eluted using 2M MgCl<sub>2</sub>, precipitated with 15% TCA and resolved on SDS/PAGE (Figure 4.1A). This method efficiently enriched proteins that are specifically phosphorylated on 14-3-3 binding motifs (Figure 4.1B and Material and methods).

Notably, we identified over 300 specific proteins in the 14-3-3<sup>WT</sup> elution in *Drosophila* S2 cells, many of which were known 14-3-3 clients such as Cheerio and Par-1. Furthermore, we identified over 1700 proteins in mammalian HEK293 cell extracts and used this to compare the common identifications with *Drosophila* S2 cells (Figure 4.1C). Interestingly, we found 145 proteins that were conserved between mammalian and *Drosophila* cell lines. It is worth noting that approximately 50% of the mammalian client proteins we identified do not have a *Drosophila* ortholog, limiting our net total of potentially conserved 14-3-3 client proteins. To characterize the global network of the 14-3-3 interactome, we used DAVID bioinformatic software. We found a statistically significant enrichment in GO terms related to cell division in both mammalian and *Drosophila* data-sets (Figure 4.1D). Taken together, these data reveal many conserved 14-3-3 interactions and shed new light on many unexplored 14-3-3 clients having roles in fundamental biological processes.



## **Rip11 and Rab11-FIP5 are conserved 14-3-3 binding proteins**

Interestingly, our analysis revealed the enrichment of mammalian and *Drosophila* class I FIPs (mammalian FIPs1-2-5; Rip11 in *Drosophila*) but not class II (FIPs 3-4; Nuf in *Drosophila*) (Table 4.1E and 4-2A). To confirm this we overexpressed human class I and II FIPs and using a GST pulldown assay found that only class I FIPs bound to 14-3-3 (Figure 4.2B). We also found that Rip11 bound to 14-3-3 (Figure 4.2C). To determine if this interaction was mediated by phosphorylation, we used a 14-3-3 (K49E) mutant in a GST pulldown assay and found that FIP5 binding to 14-3-3 was abrogated compared to WT (Figure 4.2D). Similarly, we expressed GFP::Rip11<sup>WT</sup> from *Drosophila* S2 cells and in the same GST assay format using the K49E mutant, found that GFP::Rip11<sup>WT</sup> binding was inhibited (Figure 4.2E).

We next asked if FIP5 and Rip11 binding to 14-3-3 was direct and mediated by phosphorylation. To address this question, we overexpressed GFP::Rip11<sup>WT</sup> or myc::FIP5, immunopurified the proteins and treated them with  $\lambda$ -phosphatase. The samples were then subjected to GST::14-3-3 Farwestern blot analysis which showed that Rip11 and FIP5 bind directly to 14-3-3 and this interactions is phosphorylation dependent (Figure 4.2F and 4-2G). We also took advantage of an inhibitory peptide called R18, which will bind in the aliphatic groove of 14-3-3 and inhibit client protein binding (Petosa, Masters et al. 1998). As expected, increasing concentration of R18 peptide spiked into cell lysates followed by GST pulldown assay inhibited Rip11 and FIP5 binding to 14-3-3 (Figure 4.2H and 4-2I). Together, these data validate our proteomic data and confirm that Rip11 and FIP5 are novel 14-3-3 interacting proteins.

## **Rip11 residues T391 and S405 within the RBD are required for 14-3-3 binding**

We next sought to determine the amino acids within Rip11 that mediate 14-3-3 binding. Analysis of Rip11 sequence for 14-3-3 binding revealed several high confidence amino acid sites (T90, S111, S137, S149 and S332). Interestingly, mutation of serine or threonine to non-phosphorylatable alanine by site-directed mutagenesis of all high confidence

sites did not abrogate Rip11 binding to 14-3-3 (data not shown). To address which Rip11 domains were mediating 14-3-3 binding we generated Rip11 deletion mutants and assayed Rip11 binding to 14-3-3 (Figure 4.3A). To determine which deletion mutant were responsible for 14-3-3 interaction, we overexpressed GFP::Rip11<sup>WT</sup>, and deletion mutants GFP::Rip11<sup>Δ352-409</sup>, GFP::Rip11<sup>Δ1-130</sup>, GFP::Rip11<sup>Δ1-130/352-409</sup> in *Drosophila* S2 cells and binding was assessed by GST 14-3-3 pulldown assay (Figure 4.3B). We found that both mutants harboring the Rab11 binding domain (RBD) deletion (Δ352-409 and Δ1-130/352-409) failed to bind 14-3-3 (Figure 4.3B). Analysis of the Rip11 sequence revealed RVMET<sup>391</sup>HP and RTTS<sup>405</sup> as two potential 14-3-3 binding sites, with T391 and S405 as the potential phosphorylated sites (Figure 4.3C). We mutagenized T391 and S405 for non-phosphorylated alanine and we addressed whether those single point mutants or the combination of both mutations abrogate 14-3-3 binding. We overexpressed GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>T391A</sup>, GFP::Rip11<sup>S405A</sup> and the double mutant GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> and assessed 14-3-3 interaction by GST 14-3-3 pulldown assay (Figure 4.3D). Only the GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> double mutant was greatly inhibited from binding to 14-3-3, indicating that both T391 and S405 of Rip11's RBD are involved in binding 14-3-3. To address 14-3-3 binding *in vivo*, we overexpressed myc::14-3-3, GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> and GFP::Rip11<sup>TS/ED</sup> phosphomimetic mutant in S2 cells (Figure 4.3E). By coimmunoprecipitation experiments using a myc antibody, we found that GFP::Rip11<sup>WT</sup>, as expected, strongly bound to 14-3-3::myc in comparison to GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>. Similarly, Rip11<sup>TS/ED</sup> mutant binding to 14-3-3 was inhibited.

We next addressed whether T391 and S405 residues within Rip11's RBD also bind Rab11. To test this, we overexpressed the GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> double mutant and GFP::Rip11<sup>TS/ED</sup> in S2 cells and performed GST pulldown assays using a GST tagged GTP-locked Rab11 mutant (constitutive active) called GST::Rab11<sup>CA</sup> (Figure 4.3F). We already showed a strong binding between GFP::Rip11<sup>WT</sup> and GST::Rab11<sup>CA</sup> in S2 cells (Laflamme, Assaker et al. 2012). Our results indicated that the GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> and the GFP::Rip11<sup>TS/ED</sup> bound Rab11<sup>CA</sup> to the same extent as GFP::Rip11<sup>WT</sup>, suggesting that T391A and S405A mutations did not affect the RBD's overall structure and residues T391 and S405 are not required for binding to Rab11.

We next investigated whether Rab11 binding to Rip11 is necessary for Rip11 binding to 14-3-3. To address this, we mutated the conserved Tyr<sup>380</sup> in Rip11 to a serine to make a deficient Rab11/Rip11 binding mutant (Jago, Lindsay et al. 2006, Shiba, Koga et al. 2006) and tested whether this mutation abrogates Rip11 binding to 14-3-3. We co-expressed in S2 cells GST::Rab11<sup>CA</sup> and GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> or GFP::Rip11<sup>Y380S</sup> and we proceeded to GST pull down as in Figure 4.3F. As expected, the Y380S mutation abolished Rip11 binding to Rab11 (Figure 4.3G). We next addressed whether the deficient Rab11/Rip11 binding mutant could still interact with 14-3-3. To do this, we co-expressed in S2 cells myc::14-3-3 epsilon together with the Rip11 constructs as for Figure 4.3G and we proceeded to 14-3-3 immunoprecipitation. As expected, Rip11<sup>WT</sup> binds to 14-3-3, where the TS/AA mutation abolishes binding to 14-3-3. Interestingly, we observed that Rip11<sup>Y380S</sup> can also bind to 14-3-3 (Figure 4.3H). Altogether, these results indicate and suggest that 14-3-3 binds phosphorylated T391 and S405 located within the RBD of Rip11 and Rip11/14-3-3 interaction is independent of Rab11 binding to Rip11.

### **Rip11 polarized distribution during *Drosophila* S2 cells cytokinesis is dependent on T391 and S405 residues**

*Drosophila* and mammalian class I FIPs spatial and temporal distribution is crucial for their cellular function in cell polarity. We addressed Rip11/14-3-3 interaction in S2 cells since we know that this interaction is occurring and those cells have the advantage to be easily amenable to live imaging. We first investigated the endogenous distribution of Rip11 in S2 cells, and we observed a striking polarized distribution of Rip11 during cytokinesis (Figure 4.4A). Notably, we observed that endogenous Rip11 is recruited on vesicles and those vesicles seem restricted close to the plasma membrane during metaphase. During early telophase, Rip11 positive vesicles started to polarize toward the future site of ingression of the cleavage furrow and are enriched on the central spindle. During mid- to late telophase, Rip11 vesicles are enriched on the microtubule network toward the cleavage furrow, and Rip11 signal is seen at the midbody. The dark central region revealed by the tubulin staining corresponds to the midbody. Indeed, the tightly bundled microtubules are inaccessible for the antibody since they

are covered by the midbody ring proteins. Later during cytokinesis, we did not observe Rip11 in the intercellular bridge (Figure 4.4A).

To better characterize Rip11 vesicles, we sought to explore the Rip11/Rab11 relationship during S2 cells cytokinesis (Figure 4.4B, C). We first examined the Rab11 distribution by live imaging using cells stably expressing mCherry::Rab11 and GFP::tubulin. From metaphase to late telophase, mCherry::Rab11 *i)* displayed larger compartments that followed the centrosome of each daughter cell (yellow arrowhead), and *ii)* showed plasma membrane distribution slightly enriched close to the cleavage furrow (white arrowhead) (Figure 4.4B). It is noteworthy that Rip11 and Rab11 displayed different vesicular or cortical distribution during cytokinesis.

To investigate whether Rip11 is recruited on vesicles through the action of Rab11, we depleted Rab11 by using two distinct dsRNA sequences targeting specifically Rab11 mRNA. Interestingly, we observed partial redistribution of Rip11 to the cytoplasm during the cell cycle (Figure 4.4C and data not shown). Some Rip11 positive vesicles remain after Rab11 depletion (Figure 4.4C). This observation suggests that Rab11 protein remaining after Rab11 depletion is sufficient to recruit Rip11 on few vesicles, or Rip11 could be recruited on vesicles through binding to another protein than Rab11.

We next investigated whether 14-3-3 could influence Rip11 distribution during cytokinesis. We followed Rip11 distribution during the cell cycle by time-lapse microscopy using S2 cells stably expressing GFP::Rip11<sup>WT</sup> or GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> together with mCherry::tubulin (Figure 4.4D). We found that GFP::Rip11<sup>WT</sup> follows the already described endogenous Rip11 distribution (compare Figure 4.4A to 4D). GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> is recruited on vesicles and displayed a polarized distribution toward the cleavage furrow during cytokinesis. However, we observed numerous GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> vesicles which remain unpolarized toward the cleavage furrow during cell division (Figure 4.4D). To quantify the difference between GFP::Rip11<sup>WT</sup> and GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> polarized distribution during cytokinesis, we measured the Rip11 polarization index that we defined as the GFP fluorescence ratio in the inside half of the cell (close to the cleavage furrow, CF) to the outside half of the cell (the pole region, P) during mid- and late telophase, for both daughter cells (Figure 4.4E). We showed that

GFP::Rip11<sup>WT</sup> had a polarized index of 4,0 and 4,3 during both mid- and late telophase respectively, whereas GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> showed a significant reduction of polarity with an index of 2,0 and 2,2 during both mid- and late telophase, respectively (Figure 4.4E). Those results indicate that amino acid residues T391 and S405 involved in binding 14-3-3 are critical for Rip11 polarized distribution during cytokinesis.

### **Rip11 is essential for late cytokinesis**

Rip11's robust polarized distribution during cytokinesis suggests that it plays a functional role during this cellular event. To examine whether Rip11 is required for proper cytokinesis, we depleted Rip11 using various dsRNAs sequences (both in the coding sequence (CDS) and in the untranslated region (UTR)) and we observed a rate of multi-nucleated cells in the total cell population of 24,4% and 18,8%, respectively (Figure 4.5A-B). We next confirmed that the Rip11 5' UTR dsRNA was targeting both Rip11 transcripts (Rip11-PA and Rip11-PB) by western blotting of S2 cells protein lysate that were treated with no dsRNA, control dsRNA or Rip11 5'UTR dsRNA (Figure 4.5C).

To identify the signaling pathway regulated by Rip11 during cytokinesis, we sought to investigate the timing of failure of cytokinesis after Rip11 depletion. To do this, we used S2 cells expressing both mCherry::Anillin and the regulatory light chain of myosin II, Sqh::GFP (Figure 4.6D) (Kechad, Jananji et al. 2012). As already reported, in control cells, Anillin became uniformly cortical in metaphase, accumulated at the cytokinetic furrow and at the midbody. Sqh::GFP followed Anillin distribution during cytokinesis. In Rip11 depleted cells that fail cytokinesis, Anillin and Sqh are well distributed at the plasma membrane at metaphase and at the cytokinesis ring and at the midbody on during cytokinesis. However, after Rip11 depletion, we observed that the cytokinetic furrow regressed  $46 \pm 29$  minutes after formation of the midbody (for 49 cells which failed cytokinesis) leading to bi- or multi-nucleated cells. Those data suggest that Rip11 is required at a late stage of cytokinesis.

### **Rip11 function during cytokinesis requires 14-3-3 binding**

To address the function of 14-3-3 and Rab11 binding to Rip11 during cytokinesis, we performed rescue experiments by stably expressing the different GFP::tagged Rip11 wild type

and mutant constructs in Rip11 5' UTR dsRNA treated cells (Figure 4.6A, 6B). Those GFP::Rip11 constructs are insensitive to the 5'UTR dsRNA since they don't harbor the dsRNA sequence. The expression of GFP::Rip11<sup>WT</sup> and the single point mutant GFP::Rip11<sup>S405A</sup> restored cytokinesis in Rip11 depleted cells to levels of control cells. The single point mutant GFP::Rip11<sup>T391A</sup> restored partially normal cytokinesis. Interestingly, expression of the 14-3-3 binding-deficient Rip11 GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> failed to restore cytokinesis (Figure 4.6A, 6B). To determine whether Rip11 binding to 14-3-3 is crucial for Rip11 function during cytokinesis, we restored GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> capacity to bind 14-3-3 through fusion of Rip11<sup>TS/AA</sup> to the strong 14-3-3 antagonist peptide R18 (GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18). Indeed, this fusion restored binding to 14-3-3 as seen by 14-3-3::myc immunoprecipitation (Figure 4.6C). Strikingly, Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18 abrogated Rab11 binding as seen by GST::Rab11<sup>CA</sup> pull down (Figure 4.6D). The expression of GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18 partially rescued cytokinesis after Rip11 knockdown (Figure 4.6A, 6B). Those results indicate that Rip11 binding to 14-3-3 is crucial for Rip11 proper function during cytokinesis and suggest that Rab11 binding to Rip11 is not required.

To further investigate whether Rip11 function during cytokinesis also requires Rab11 binding, we expressed the Rab11 binding-deficient Rip11 mutant (Y380S) and we observed similar cytokinesis rescue as the expression of Rip11<sup>WT</sup> and Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18 (Figure 4.6A). These data revealed that Rip11 function is independent of Rab11 binding. We next investigated whether 14-3-3 needs to remove Rab11 from binding Rip11's RBD to allow proper Rip11 function during cytokinesis. To test this hypothesis, we expressed a deficient Rab11/14-3-3 binding mutant called GFP::Rip11<sup>YTS/SAA</sup> (Figure 4.6C, 6D) and we observed that this mutant failed to rescue cytokinesis, similarly to GFP::Rip11<sup>ΔRBD</sup> (Figure 4.6A). Altogether, rescue experiments showed that Rip11 function during cytokinesis requires 14-3-3 binding and is independent of Rab11 binding.

## **Rab35 and Pavarotti distribution during late telophase are dependent on Rip11 trafficking**

We next sought to identify cytokinesis regulators that could be trafficked in a Rip11-dependent manner during late telophase. We looked at different candidate proteins which

show similar Rip11 distribution, have connection with Rab11 or Rab11-FIPs or regulate late cytokinesis. We addressed the distribution of those proteins by immunofluorescence or by generating stable cell lines expressing a tagged-version of the protein of interest in control or Rip11 depleted cells (Figure 4.8 (Supp.1) A-B-C). We looked at F-actin distribution whose dynamic was shown to be modulated by Nuf during *Drosophila* oogenesis (Cao, Albertson et al. 2008) (Figure 4.8 (Supp.1) A). In both control and Rip11 depleted cells, F-actin is cortical and enriched at the cleavage furrow during cytokinesis as seen with phalloidin staining (Figure 4.8 (Supp.1) A). We next looked at Nuf distribution and we did not observe any difference between Nuf midbody distribution in both control of Rip11 depleted cells *Drosophila* S2 cell (Figure 4.8 (Supp.1) A). Moesin, which was shown to bind Rab11 in *Drosophila* (Ramel, Wang et al. 2013) and to regulate *Drosophila* S2 cell shape during cytokinesis (Carreno, Kouranti et al. 2008) showed a cortical staining all around the daughter cells in both control and Rip11 depleted cells (Figure 4.8 (Supp.1) A). Rab11 was also showed to regulate the phosphorylated status of Moesin during *Drosophila* border cell migration (Ramel, Wang et al. 2013). We thus looked at Moesin phosphorylation (pMoesin) by immuno-staining and we observed enrichment of signal at the cleavage furrow in both control and Rip11 depleted cells (Figure 4.8 (Supp.1) A). We next looked at Arf51F (Arf6 in mammals) distribution since Arf6 is a known cytokinesis regulator (Joseph, Hutterer et al. 2012) and was shown to associate with class 2 Rab11-FIPs proteins (Fielding, Schonteich et al. 2005). We generated stable S2 cell lines expressing Arf51::GST and we observed cortical staining and enrichment of Arf51 at the cleavage furrow in both control and Rip11 depleted cells (Figure 4.8 (Supp.1) B).

Beside Rab11, Rab35 is the sole other Rab protein regulating S2 cell cytokinesis and Rab35 depletion leads to similar strength of cytokinesis failure as Rip11 (Kouranti, Sachse et al. 2006). We thus generated mCherry::Rab35/GFP::tubulin S2 stable cell lines and we observed that mCherry::Rab35 displayed cortical distribution and is enriched at the cleavage furrow/midbody during late cytokinesis (Figure 4.7A). We also observed colocalisation between Rab35 and Rip11 adjacent to the midbody (Figure 4.7A). After Rip11 depletion, the cleavage furrow and midbody enrichment of mCherry::Rab35 was decreased (Figure 4.7A). We quantified the mCherry::Rab35 fluorescence signal intensity at the midbody compared to the plasma membrane signal at the pole. Ratio of the fluorescence intensity at the midbody

over the pole revealed and enrichment of 2.5x for control and 1,6x for Rip11 depleted cells (Figure 4.7B).

Since endogenous and GFP::Rip11<sup>WT</sup> displayed puncta on the central spindle during early telophase (Figure 4.4A and 4E), we also investigated whether Rip11 could regulate the distribution of central spindle components Pavarotti (Pav) and Nessun dorma (Nesd) (Montembault, Zhang et al. 2010). We generated S2 cell lines expressing Pav::myc and Nesd::mCherry/GFP::tubulin. Nesd::mCherry displayed a midbody localization in control cells as previously reported (Montembault, Zhang et al. 2010) and Rip11 depletion did not affect Nesd distribution (Figure 4.8 (Supp.1) C). Pav::myc is distributed as expected at the midbody during late telophase (Figure 4.7C) (Adams, Tavares et al. 1998, Bassi, Audusseau et al. 2013). Pav::myc showed an abnormal distribution in 40% of Rip11 depleted cells, compared to 9% in control cells (Figure 4.7D). We could rescue this abnormal Pav::myc distribution by expressing GFP::Rip11<sup>WT</sup>, in contrast to GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> (Figure 4.7E-F). Altogether, these results showed that Rip11 is important for proper distribution of Rab35 and Pav during cytokinesis and Pav distribution at the midbody is dependent on the Rip11/14-3-3 interaction.

In conclusion, starting from an unbiased 14-3-3 proteomic approach to identify novel 14-3-3 phospho-dependent substrates, our work provides a working model in which Rip11/14-3-3 interaction is crucial for the proper recruitment of important cytokinetic regulators to the cleavage furrow/midbody. Phosphorylation of Rip11 on T391 and S405 triggers 14-3-3 binding essential for the polarized distribution of Rip11 vesicles during cytokinesis. This polarized Rip11 trafficking is essential for the proper distribution of Rab35 and Pav during cytokinesis, which account for Rip11 cytokinesis failure upon Rip11 depletion.



## 4.5. Discussion

While the requirement for 14-3-3 signaling in modulating protein function is well characterized, relatively little is known regarding the conserved binding of 14-3-3, its conserved targets, and how it regulates various biological processes. Herein, we describe a 14-3-3 screen to identify novel 14-3-3 phosphorylation-dependent interacting proteins in *Drosophila* and mammalian cells. We identified class I FIPs Fip5/Rip11 as novel 14-3-3 phospho-dependent interacting protein. Using deletion and site-directed mutagenesis, we found that 14-3-3 binds to T391 and S405 residues within Rip11's RBD and Rip11 binding to 14-3-3 is independent of Rab11 binding. Furthermore, we found that amino acid residues T391 and S405 modulate the Rip11 polarized distribution during cytokinesis. More importantly, Rip11 binding to 14-3-3 is required for proper cytokinesis and their binding is essential for proper distribution of Rab35 and Pavarotti. We describe the function of *Drosophila* class I Rab11-FIP during cytokinesis and we suggest a novel mechanism by which 14-3-3 integrates upstream cell signaling and coordinates Rip11 polarized vesicle trafficking.

To better understand how 14-3-3 functions at the cellular level, we have characterized a 14-3-3 phosphorylation-dependent binding in two different biological systems. In the first, HEK293 cells were stimulated with PMA to identify 14-3-3 substrates that are phosphorylated in response to an acute stimulation of the Ras/MAPK pathway. In the second, we used growing *Drosophila* S2 cells. Our results will be helpful in the identification and characterization of the critical 14-3-3 substrates operating in these two systems to explore and identify novel and conserved 14-3-3 binding proteins. Notably, this approach has led to the identification of ~ 145 conserved 14-3-3 binding proteins from both biological systems and are involved in a wide range of cellular functions. Our data show that 14-3-3 appears to play a significant role in diverse biological processes, such as cell cycle progression, and cell growth and proliferation, consistent with our current knowledge about 14-3-3 signaling (Gardino and Yaffe 2011). However, our data also reveals molecular functions for 14-3-3 that have much less been explored, including mRNA translation and mitosis. We believe that our proteomic data will provide the framework to address the role of 14-3-3 in these biological processes and

help assess the underlying molecular mechanisms, which may be highly relevant to cell signaling.

Several 14-3-3 substrates we identified have been previously reported (Benton and St Johnston 2003, Nurmi, Gahmberg et al. 2006). Our data indicate that 14-3-3 plays a major role in class I FIPs-dependent signaling, but more experimentation will be required to determine which 14-3-3 isoform(s) contributes the most to these cellular functions. Our proteomic data indicates upstream signaling regulate Fip5/Rip11 phosphorylation at key residues that facilitate 14-3-3 binding, which we confirmed using several complementary approaches.

Our data suggest that Rip11 function during cytokinesis is dependent on 14-3-3 binding, and independent of Rab11 binding. Other observations of Rab11-FIPs function or distribution independent of Rab11 binding have been made during regulation of cell polarity (Lapierre, Avant et al. 2012) and cytokinesis (Wilson, Fielding et al. 2005). During *Drosophila* S2 cell cytokinesis, endogenous Rip11 does not resemble Rab11 distribution. Rip11 is polarized toward the cleavage furrow and is associated with plasma membrane, spindle midzone and the midbody, whereas Rab11 vesicles are not observed on the spindle midzone or at the midbody. Moreover, Rip11 binding to Rab11 is unnecessary for cytokinesis completion and Rip11 can still be recruited on some vesicles after Rab11 depletion. Those observations suggest the presence of Rip11/Rab11(-) vesicles during cytokinesis. Moreover, conceptually, Rab11 and 14-3-3 proteins can hardly bind Rip11 at the same time since residues Y380 (binds Rab11), T391 and S405 (bind 14-3-3) are closely located. Altogether, we suggest that Rip11/14-3-3 could be recruited on vesicles through binding to another small GTPase independently of the Y380 residues.

One interesting small GTPase that could recruits Rip11/14-3-3 on vesicles during cytokinesis is Rab35. Among all the Rab, only Rab35, Rab11 and Rab5 depletion lead to cytokinesis failure as observed in a Rab dsRNA screen (Kouranti, Sachse et al. 2006). Rab5 role during cell division is more restricted during early mitosis (Capalbo, D'Avino et al. 2011). Rab35 has the more penetrant phenotype. Rab35 roles during cytokinesis is closely related to PtdIns(4,5) $P_2$  homeostasis at the cleavage furrow and midbody (Kouranti, Sachse et al. 2006, Dambournet, Machicoane et al. 2011). We observed colocalisation of Rip11 and Rab35 during

late telophase, Rip11 depletion affects Rab35 distribution and Rab35 and Rip11 depletion leads to similar cytokinesis defects in *Drosophila* S2 cells (Kouranti, Sachse et al. 2006). We thus hypothesize that Rip11/14-3-3 could be recruited on Rab35 vesicles and regulate trafficking of those vesicles during cytokinesis. Future experiments will be required to determine whether Rip11 or 14-3-3 interacts with Rab35 during cell division.

We observe upon Rip11 depletion that Pav distribution at the midbody appears diffuse and could account for the cytokinesis defects observed upon Rip11 depletion. Similar observations in S2 cells were made upon depletion of Sticky (the *Drosophila* ortholog of Citron kinase) during cytokinesis of S2 cells (Bassi, Audusseau et al. 2013). It is interesting to note that Pavarotti and Rab35 showed mild binding as observed in a GST::Rab35 pull down followed by mass spectrometry to identified binding partners (Gillingham, Sinka et al. 2014). It is tempting to speculate that Rip11/14-3-3 mediate Rab35 trafficking of Pav to the midbody.

We show for the first time dissection of class I Rab11-FIP roles during cytokinesis and our data suggest specific functions for class I Rab11-FIPs when compared to class II Rab11-FIPs. During cytokinesis, FIP3 displays a distribution highly reminiscent of Rab11, with vesicles trafficking from compartments close to the centrosome to the cleavage furrow/midbody (Wilson, Fielding et al. 2005). In contrast to FIP3, Rip11 is enriched at the plasma membrane during metaphase and gets polarized toward the cleavage furrow during telophase. The dissimilar distribution of those two classes of vesicles suggests different protein composition (cargo) and different functions.

Altogether, these findings provide a deeper understanding of the regulation of polarized vesicle trafficking during cytokinesis. Further work may elucidate how 14-3-3 achieves to integrate upstream signal to polarized vesicle movement.

## 4.6. Material and methods

### Plasmid constructs

Cloning of the different *Drosophila* constructs was done using the Gateway technology (Invitrogen). We generated the different mutant forms of Rip11 by mutagenesis (QuickChange; Agilent) directly on Rip11<sup>WT</sup> subcloned in the pDonor vector that we had already generated (Laflamme, Assaker et al. 2012). We mutated the following Rip11 residues: threonine 391 for both alanine (T391A) and glutamic acid (T391E), serine 405 for both alanine (S405A) and aspartic acid (S405D) and tyrosine 380 for a serine (Y380S). Combinations of mutation were also made by mutagenesis. The R18 peptide was fused directly after the last 409<sup>th</sup> amino acid of Rip11<sup>TS/AA</sup>. All Rip11 constructs were recombined in copper-inducible pMET vector with a GFP-tag in N-term allowing expressing in *Drosophila* S2 cells (pMet-picoblast-GFP vector, gift from V. Archambault laboratory (Université de Montréal, Montréal, Canada). 14-3-3 epsilon was subcloned in pDonor and further recombined in pAMW vector (actin promoter, myc tag in N-terminal). GST::Rab11<sup>CA</sup>, Rab11, GST::Rab35 and Rab35 subcloned in pDonor vector were made as previously described (Laflamme, Assaker et al. 2012). Rab11 and Rab35 were recombined in pDest28 plasmid (UAS promoter and mCherry-tag in N-terminal). Pavarotti::myc in pAWM plasmid is also a gift from V. Archambault laboratory. GST::Arf51F EST (RE16882) was subcloned in pDonor and further cloned pMT plasmid. Nescd in pDonor was a gift from P.P. D'Avino laboratory (University of Cambridge, Cambridge, UK) and Nescd was further recombined in pDest29 (mCherry tag in C-terminal, under UAS promoter). GFP::tubulin is a gift from G. Hickson laboratory (Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada).

The human FIP1, FIP2, FIP3 and FIP4 cloned in p-EGFP-C1 plasmid for N-terminal GFP-tag were kind gifts from J. Goldenring laboratory (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA) whereas human FIP5 cloned in p-EGFP-C1 plasmid was a gift from M.W. McCaffrey laboratory (University College Cork, Cork, Ireland). FIP5 was cloned in pcDNA3 plasmid to introduce a myc-tag in N-terminal.

## ***Drosophila* S2 cell culture and dsRNA treatment**

*Drosophila* S2 cell were grown in Schneider's medium supplemented with 10% fetal bovine serum supplemented with antibiotics. Stable cell lines of GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>T391A</sup>, GFP::Rip11<sup>S405A</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18, GFP::Rip11<sup>Y380S</sup>, GFP::Rip11<sup>YTS/SAA</sup> cloned in pMet vectors, Pav::myc, Nesd::mCherry/GFP::tubulin, Rab35::mCherry/GFP::tubulin were generated using transit-LT1 transfection agent (Mirus) and blasticidin was used as a selection agent. mCherry::Anillin and Sqh::GFP stable cell line was from G. Hickson laboratory. For Rip11 and Rab11 depletion, dsRNAs were produced and used as previously described (Ben El Kadhi, Roubinet et al. 2011). We used at least two non-overlapping regions to rule out off-target effects.

### *Rip11 primer sequences:*

CDS: Forward, CCGGCAAGGAGAAGAAGAAC  
Reverse, GTTGCCGATGGACAACAGAC  
5' UTR Forward, CTACACTACGTTCTCCTGGCG;  
Reverse, CCTTTCGTTTCTTCTTCTTTGC

### *Rab11 primer sequences*

5' UTR Forward, GTAAAGTGTGTGAGCCGACG  
Reverse, TACTCGTCTTCTCTTGCACCC  
3' UTR Forward, GACTGTCACCGCCGATGT  
Reverse, GCTGCTCCTGATCTTGGTGT

### *Gal4 control dsRNA:*

Gal4 Forward, AGAAGTAAGGCGGTCGGGATAGT  
Reverse, AGACACCAGCGAAATGGATTTTT

For fixed sample microscopy, cells were cultured on 96 well glass bottom plate (Greiner) for 4 (Rab11 depletion) or 6 days (Rip11 depletion) and were treated with 3.5µg of dsRNA at day 0 and day 3. For time-lapse microscopy of control or Rip11 depleted cells, cells were cultured in the same 96 well plate and treated with 3.5µg of dsRNA at day 0 and 1µg of dsRNA at day 3 and filmed at day 5.

## **Mammalian Cell culture, Treatments, and Immunoprecipitation**

HEK293 were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/liter glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. HEK293 cells were transfected using calcium phosphate precipitation as described previously (Roux, Ballif et al. 2004). Cells were grown for 24 hrs after transfection and serum-starved using serum-free DMEM where indicated for an additional 16-18 hrs. Starved cells were treated with PMA (25-100 ng/ml) for 30 min before being harvested.

Cell lysates were prepared as previously described. Briefly, cells were washed three times with ice-cold PBS and lysed in BLB (10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, mM β-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a Complete Protease Inhibitor Cocktail tablet (Roche)). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 hrs, followed by a 1 hr incubation with Protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer and beads were eluted and boiled in 2X reducing sample buffer (5X: 60 mM Tris-HCl, pH6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue). Immunoblotting was performed using a submersible transfer apparatus, and nitrocellulose membranes. Blocking was performed in 5% milk/TBST (0.05% Tween-20, 8 mM Tris-Base, 25 mM Tris-HCL, 154 mM NaCl). Primary antibodies were incubated with the membranes in 5% BSA or 5% milk in TBST and washes were done with TBST. Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were from Chemicon/Millipore (Billerica, MA) and visualization was done using enhanced chemiluminescence and exposure to X-ray film.

### **Imaging of fixed samples, time-lapse recording and quantifications**

For immuno-fluorescence analysis, *Drosophila* S2 cells were fixed at day 6 in 4% formaldehyde then we proceeded with immune-staining (Ben El Kadhi, Roubinet et al. 2011). We used: mouse (Sigma) 1/200 or rat (AbD Serotec) 1/50 anti-α-tubulin, anti-Rip11 1/2000, anti-Nuf (rabbit-generated in Emery laboratory), rabbit anti-Moesin (1/100), rabbit anti-pMoesin (1/100), mouse anti-myc (9E10, 1/100), Alexa fluor 488 phalloidin (Cell signaling) at 1/100 for F-actin staining. Dapi (Sigma) was used to stain nuclei. The anti-Rip11 (rabbit)

was a kind gift from J. Casanova laboratory (Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, Barcelona, Spain).

Images were acquired using a Deltavision microscope (Applied Precision) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and both 63x (numerical aperture 1.4) and 100x (numerical aperture 1.42) planApo objectives were used. Deconvolution was carried out using the SoftWoRx software version 5.5. For time-lapse imaging, cells were incubated in an environmental chamber at 25°C.

All images were prepared for publication using Adobe Photoshop to adjust contrast, Gaussian blur and levels and Adobe Illustrator to prepare the figures. For quantification, images were analyzed as followed:

- *Rip11 polarized index*: Using ImageJ software (NIH), the mean fluorescence intensity of GFP::*Rip11* (F) for the half of the cell toward the cleavage furrow (CF) and the half of the cell toward the pole region (P) were measured for both daughters' cells in mid- or late telophase. Background value of fluorescence were than subtracted from those F(CF) and F(P) values and a ratio of F(CF) over F(P) was performed.

- *Rab35 enrichment at the midbody*: Using SoftWoRx software, we measured the mean fluorescence intensity of mCherry::*Rab35* (F) at the midbody ring (M) and at the plasma membrane at the pole region (P) for late telophase cells. Background value of fluorescence were than subtracted from those F(M) and F(P) values and a ratio of F(M) over F(P) was performed.

- *Pavarotti distribution at the midbody*: The number of cells showing Pavarotti distribution defect at late telophase within a *Drosophila* S2 cell population were counted and plotted.

#### *Rescue experiments*

*Drosophila* S2 stable cell lines expressing the different GFP::*Rip11* construct under pMET promotor were treated with *Rip11* 5' UTR dsRNA at day 0 and day 3 and were incubated with 0.5mM CuSO<sub>4</sub> at day 4 of treatment. At day 6, cells were fixed and tubulin staining was performed. The number of normal, bi or –multi nucleated cells were counted and

the percentage of bi or multi-nucleated cells among the S2 cell population were expressed as percentage and further plotted in a histogram.

### **14-3-3 Immunoprecipitation and GST-Rab11 pull down in *Drosophila* S2 cells**

*Drosophila* S2 cells were co-transfected using transit-LT1 transfection agent (Mirus) with both GFP::Rip11 and myc::14-3-3 or GFP::Rip11 and GST::Rab11 constructs. GFP::Rip11 expression was induced by adding 0.5mM of CuSO<sub>4</sub> for 16hrs, cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer (20mM Tris, pH 8.0, 137mM NaCl, 1% Nonidet P-49, 10% glycerol, and 1mM EDTA) with protease and phosphatase inhibitor (Laflamme and Emery 2015). For GST::Rab11<sup>CA</sup> pull down assay, 50µl of 50% slurry of glutathione-Sepharase beads equilibrated in lysis buffer was added to protein lysates and rocked for 2 hours at 4°C. For myc::14-3-3 immunoprecipitation, 1µl of myc antibody (9E10, made in house) was added to the protein lysate and rocked for 2 hrs at 4°C. 50µl of A/G beads (Santacruz) was added to the protein lysate for another 1 hr rocked at 4°C. Beads were washed four times with lysis buffer. Total protein lysates and eluted proteins were resolved on a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immune detected using specific antibodies. Anti-GFP (Invitrogen) 1/1000, anti-GST (Cell signaling) 1/1000 and anti-myc (9E10, made in house) 1/50000 were used.

### **14-3-3 GST-pull down**

Stable *Drosophila* S2 cell lines expressing GFP::Rip11(wt), GFP::Rip11(T391A), GFP::Rip11(S405A), GFP::Rip11(T391A, S405A) and GFP::Rip11(Y380S) were generated by transfecting *Drosophila* S2 cells with the appropriate pMet vector containing Rip11, then selection of transfected cells by adding 20µg/ml of blasticidine. Cells were plated on day 1. GFP-Rip11 was induced by adding 0.5mM of CuSO<sub>4</sub> for 8hrs. Cells were lysed as previously described.

### **GST-14-3-3 Fusion Proteins, Subtractive Fractionation and Pull-Down Assays.**

Fifty milliliters of overnight cultures of BL21 *E. Coli* transformed with pGEX-4T-14-3-3ε wild type or K49E mutant (Kindly provided by Dr. Bryan Ballif) (Ballif, Cao et al. 2006) and were diluted into 500 ml and culture was induced with 1mM IPTG overnight at 25°C.



Cells were pelleted and resuspended in 40 ml of bacterial lysis buffer (1X PBS/10 mM EDTA/0.1% Triton X; 1 mM PMSF, 1X protease inhibitor cocktail). Extracts were placed in a 50 ml conical tube on ice and sonicated using a probe sonicator six times for 30 sec with 30 sec delays between blasts. After sonication, the extracts were centrifuged at  $13,000 \times g$  for 30 min, and aliquoted into 1 ml tubes to be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. For subtractive fractionation, we used a method previously described (Ballif, Cao et al. 2006). Briefly, serum-starved cells were lysed as described above. Cellular debris were removed by centrifugation for 10 min at  $13,000 \times g$ . The supernatant, corresponding to 20 mg of protein, was pre-cleared by pouring it sequentially over glutathione-sepharose (GE/Amersham/Pharmacia, Piscataway, NJ), glutathione-sepharose bound to 500  $\mu\text{g}$  of GST, and glutathione-sepharose bound to 250  $\mu\text{g}$  of GST::14-3-3 $\epsilon$  K49E. The flow-through was divided equally and poured over GST::14-3-3 $\epsilon$  K49E (250  $\mu\text{g}$ ) or GST-14-3-3 $\epsilon$  wild-type (250  $\mu\text{g}$ ) (as shown in the schematic of Figure 1A). The beads were then washed 2 times with 2 ml lysis buffer, and a final wash of 2 ml of lysis buffer lacking Nonidet P-40 and Brij 35. Cellular proteins bound to each column were eluted stepwise with 400  $\mu\text{l}$  of 400 mM  $\text{MgCl}_2$  in 50 mM HEPES, 400  $\mu\text{l}$  of 800 mM  $\text{MgCl}_2$  in 50 mM HEPES, and finally chased with 200  $\mu\text{l}$  of 50 mM HEPES. Eluates were combined and precipitated with 15% trichloroacetic acid. Precipitated proteins were pelleted, washed with acetone, resuspended in reducing sample buffer, pH-adjusted with 1/6 volume of 1 M Tris-base, boiled, and subjected to SDS-PAGE for Coomassie staining or immunoblotting. For smaller scale GST pull-downs, cell lysates were incubated with 10  $\mu\text{g}$  of GST-14-3-3 $\epsilon$  wild-type or K49E for 2 hrs, washed four times with lysis buffer prior to elution with reducing sample buffer, SDS-PAGE and immunoblotting.

### **Sample Preparation and Trypsin Digestion.**

Coomassie stained gels of proteins were cut into molecular weight fractions. Gel slices were then treated with 10 mM DTT and incubated for 1 hr at  $56^{\circ}\text{C}$ , followed by alkylation with 15 mM iodoacetamide for 1 hr at  $25^{\circ}\text{C}$  in the dark. Proteins were digested overnight with sequencing grade modified trypsin (enzyme:protein ratio of 1:50) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Digested peptides from gels were extracted and the volume was reduce to using a rotor speed vacuum. All peptide samples were resuspended in 0.2% formic acid.

### *Nanoflow LC-MS/MS.*

The fractionation were analyzed by online reverse phase chromatography coupled with an electrospray ionization interface to acquire MS (measuring intensity and m/z ratio for peptides) and MS/MS (fragmentation spectra of peptides) scans. A nanoflow HPLC system (Eksigent, Thermo Fisher Scientific) was used for online reversed-phase chromatographic separation; peptides were loaded on 5 mm long trap column (inner diameter 300  $\mu\text{m}$ ) in buffer A (0.2% FA) and separated on 18 cm long fused silica capillary analytical column (inner diameter 150  $\mu\text{m}$ ), both packed with 3 $\mu\text{m}$  200A Magic AQ C18 reverse-phase material (Michrom). Peptides were eluted by an increasing concentration of buffer B (0.2% FA in ACN) – from 5 to 40% in 100 min. Following the gradient elution, the column was washed with 80% buffer B and re-equilibrated with 5% buffer B. Peptides were eluted into the mass spectrometer at a flow rate of 600 nl/min. The total run time was approximately 125 min, including sample loading and column conditioning. Peptides were analyzed using an automated data-dependent acquisition on a LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer. Each MS scan was acquired at a resolution of 240,000 fwhm (at 400 m/z) for mass range 300-2,000 Th with the lock mass option enabled (m/z: 445.120025) and was followed by up to 12 MS/MS data dependent scans on the most intense ions using collision induced activation (CID). AGC target values for MS and MS/MS scans were set to 1e6 (max fill time 500 ms) and 1e5 (max fill time 50 ms) respectively. The precursor isolation window was set to 2 Th with CID normalized collision energy of 35; the dynamic exclusion window was set to 60 seconds.

### **Data Acquisition, Quantitation Analysis, and Bioinformatics.**

MS data were analyzed using MASCOT software version and searched against the Uniprot/SwissProt subset of the *Drosophila* (Drome) release 2014 database Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>). Search criteria included a static modification of cysteine residues of +57.0214 Da; a variable modification of +15.9949 Da to include potential oxidation of methionines. Searches were performed with semi-tryptic digestion and allowed a maximum of two missed cleavages on the peptides analyzed from the sequence database. The false discovery rate (FDR) for peptide, protein, and site identification was set to 1%. Bioinformatics analysis was done with DAVID software.

## 4.7. Figure legends

### **Figure 4.1: A Proteomic Strategy to Characterize the Phospho-14-3-3 interactome**

(A) Subtractive fractionation proteomic scheme for enrichment of phosphorylation-dependent 14-3-3 binding proteins.

(B) Following the protocol shown in (A), eluates were resolved by SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie or subjected to immunoblotting using the 14-3-3-binding motif antibody (RXXpS/TXP).

(C) Venn comparison of proteomic identifications between fly and mammalian datasets (from Table 4.I).

(D) Gene Ontology (GO) term enrichment of common fly and mammalian identifications.

(E) Partial list known and unknown conserved 14-3-3 client proteins identified in this study.

### **Figure 4.2: Rip11 and FIP5 are conserved class1 14-3-3 binding proteins**

(A) Table of Class I and Class II FIPS identified in this study.

(B) HEK293 cells were transfected with (Class I) GFP-Fip1, Fip2 Fip5 and (Class2) Fip3 and Fip4, 14-3-3 binding was analyzed in a pull-down assay.

(C) *Drosophila* S2 cells were transfected with (Class I) GFP-Rip11, 14-3-3 binding was analyzed as in (B).

(D) HEK293 cells were transfected with GFP-Fip5, phosphor-dependent 14-3-3 was assayed in a pull-down assay using a K49E 14-3-3 mutant.

(E) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP-Rip11, 14-3-3 binding was analyzed as in (D).

(F) HEK293 cells were transfected with Myc-Fip5 and immunoprecipitates were treated with or without lambda phosphatase, 14-3-3 binding was analyzed in a farwestern assay (G) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP-Rip11, immunoprecipitates were treated with or without lambda phosphatase, 14-3-3 binding was analyzed in (F).

(H) HEK293 cells were transfected with GFP-Fip5 and lysates were treated with increasing concentrations of R18 peptide, 14-3-3 binding was analyzed as in (B)

(I) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP-Rip11 and lysates were treated with increasing concentrations of R18 peptide, 14-3-3 binding was analyzed as in (B).

**Figure 4.3: Residues T391 and S405 in the RBD of Rip11 are required for 14-3-3 interaction but not for Rab11 binding**

(A) Schematic diagram of Rip11 deletion mutants.

(B) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>Δ352-409</sup>, GFP::Rip11<sup>Δ1-130</sup> and GFP::Rip11<sup>Δ1-130 Δ 352-409</sup>. 14-3-3 binding was analyzed using a GST 14-3-3 pull-down assay as previously reported. Rip11 binding to 14-3-3 was analyzed using western blot probed with anti-GFP.

(C) Amino acid sequence of Rip11's RBD.

(D) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>T391A</sup>, GFP::Rip11<sup>S405A</sup> and GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>. 14-3-3 binding was analyzed as described in B.

(E) S2 cells were co-transfected with GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/ED</sup> and myc::14-3-3. 14-3-3 binding was assessed by immunoprecipitation of myc. Rip11 binding to 14-3-3 was analyzed using western blot probed with anti-GFP.

(F) *Drosophila* S2 cells were transfected as described in E. Rab11 binding was analyzed using a GST-tag catalytically active Rab11 (GST::Rab11<sup>CA</sup>) pull-down assay. Rip11 binding to 14-3-3 was analyzed using western blot probed with anti-GFP.

(G) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> and GFP::Rip11<sup>Y380S</sup>, Rab11 binding was analyzed as in (F).

(H) *Drosophila* S2 cells were transfected as described in (G). 14-3-3 was analyzed as described in (E).

**Figure 4.4: Rip11 displays a polarized distribution towards the cleavage furrow during cytokinesis that depends on T391 and S405 residues**

(A) Representative examples of endogenous Rip11 (green) localization during S2 cells mitotic cycle. Immunofluorescence of alpha-tubulin (red) and staining for nucleus (cyan) was performed to better identify the cell cycle. Grayscale images of Rip11 are shown. White arrowheads point polarized Rip11 vesicles.

(B) Selected frames of dividing S2 cells expressing both  $\alpha$ -tubulin::GFP and mCherry::Rab11. Grayscale images of  $\alpha$ -tubulin::GFP and cherry::Rab11 alone are shown.

(C) *Drosophila* S2 cells were treated with dsRNAs directed against Rab11 and then immunostained for Rip11 (green), alpha-tubulin (red) and stained for nucleus (cyan). Representative examples are presented and grayscale images of Rip11 are shown.

(D) Selected frames of dividing S2 cells expressing  $\alpha$ -tubulin::mCherry together with either GFP::Rip11<sup>WT</sup> (upper panel) or GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> (lower panel). Grayscale images of GFP::Rip11 are shown.

(E) Quantification of Rip11 polarization index. Measure of GFP::Rip11 fluorescence intensity ratio in the inside half of the cell (close to the cleavage furrow, CF) to the outside half of the cell (the pole region, P) during mid- and late telophase. Numbers in each column represents the number of cells quantified.

**Figure 4.5. Rip11 is required for late cytokinesis in S2 cells**

(A) *Drosophila* S2 cells were treated with the indicated dsRNA and polyploidy was scored (minimum of 3 independent experiments, error bar represents standard deviation, a minimum of 600 cells per condition were scored).

CDS: coding sequence; UTR: untranslated region.

(B) Representative example of control or Rip11-depleted *Drosophila* S2 cells labelled with both F-actin (red) and DNA (cyan).

(C) Western blot of *Drosophila* S2 cells lysates without dsRNA or treated with the indicated dsRNA. Endogenous protein level of Rip11, Nuf and Rab11 was revealed by immunoblotting.

(D) Selected frames of representative dividing control or Rip11-depleted *Drosophila* S2 cells stably expressing mCherry::Anillin (red) and Sqh::GFP (green). Yellow arrowhead indicates the midbody formation.

**Figure 4.6. Rip11 binding to both Rab11 and 14-3-3 is required for completion of cytokinesis**

(A) *Drosophila* S2 cells stably expressing the indicated GFP::Rip11 transgene were treated with Rip11 5' UTR dsRNA and polyploidy was scored. The red full-line indicates the percentage of multi-nucleated cells observed upon Rip11 5' UTR dsRNA depletion (18,8%), where the red dotted line indicates the percentage of multi-nucleated cells observed upon control depletion (2.2%). Minimum of 3 independent experiments, error bar represents standard deviation, a minimum of 600 cells per condition were scored, white numbers indicated p-value, \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001, ns: non-significant.

(B) Representative examples of S2 cells labelled with F-actin (red) and DNA (cyan) depleted of Rip11 expressing the indicated GFP-tagged Rip11 transgene.

(C) *Drosophila* S2 stable cell were treated without plasmid (none) or transfected with GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>Y380S</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA::R18</sup> and GFP::Rip11<sup>YTS/SAA</sup> and myc::14-3-3 epsilon. 14-3-3 binding was analyzed as described in Figure 4.3B.

(D) *Drosophila* S2 cells were transfected with GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA::R18</sup> and GFP::Rip11<sup>YTS/SAA</sup> and GST::Rab11<sup>CA</sup>. Rab11 binding was analyzed as described in Figure 4.3C.

**Figure 4.7. Rab35 and Pavarotti are distributed through Rip11 trafficking**

(A) Representative examples from mCherry::Rab35 (red)/GFP::tubulin (cyan) S2 stable cell lines treated with control or Rip11 dsRNAs during late telophase. Immunostaining of endogenous Rip11 (green) and staining of nucleus (blue) was performed. Grayscale images of both Rip11 and mCherry::Rab35 are shown.

(B) Quantification of mCherry:Rab35 fluorescence ratio at the midbody (F(m)) to the cortical pole region (F(p)) during both mid- and late cytokinesis. Numbers of cell counted for each

condition are indicated in white. Minimum of 3 independent experiments, error bar represents standard error of the mean, p-value \*\*\* < 0.001.

C) Representative examples from Pav::myc S2 stable cell lines treated with control or Rip11 dsRNAs during late telophase. Immunostaining of endogenous Rip11 (green), myc (red),  $\alpha$ -tubulin (cyan) and stained for nucleus (blue) was performed.

D) Percentage of abnormal myc::Pav distribution among total cell counted is plot for both control and Rip11 depleted cells. Numbers of cell counted for each condition are indicated in white. Minimum of 3 independent experiments, error bar represents standard error of the mean, p-value \*\* < 0.01.

E) Representative examples from stable *Drosophila* S2 cells line expressing Pav::myc together with GFP::Rip11<sup>WT</sup> or GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> (green) treated with Rip11 5' UTR dsRNA. Immunostaining of myc (red),  $\alpha$ -tubulin (cyan) and stained for nucleus (blue) was performed. Grayscale images of GFP::Rip11 and Pav::myc are showed.

F) Percentage of abnormal myc::Pav distribution among total cell counted is plot for both condition in (E). Numbers of cell counted for each condition are indicated in white. Minimum of 2 independent experiments, error bar represents standard error of the mean p-value \* < 0.05.

G) Working model suggested from the biochemical and cellular biology of the 14-3-3/Rip11 interaction.

**Figure 4.8 (Supp.1): Cytokinetic regulators which are distributed in a non Rip11-dependent manner during *Drosophila* S2 cells cytokinesis**

(A) Representative examples from S2 cell treated with control or Rip11 dsRNAs (Rip11 KD). Immunostaining of the protein of interest (green),  $\alpha$ -tubulin (red) and staining for nucleus (blue) were performed. Grayscale images of the indicated proteins in the green channel are shown. *Experiment was done once.*

(B) Representative examples from S2 stable cell lines treated with control or Rip11 dsRNAs (Rip11 KD) expressing Arf51F::GST. Immunostaining of the GST (red) Rip11 (green),  $\alpha$ -

tubulin (cyan) and staining for nucleus (blue) were performed. Grayscale images of Rip11 and Arf51F::GST channels are shown. *Experiment was done once.*

(C) Representative examples from S2 stable cell lines treated with control or Rip11 dsRNAs (Rip11 KD) expressing mCherry::Nesd (red)/GFP::tubulin (cyan). Immunostaining of Rip11 (green) and staining for nucleus (blue) were performed. Grayscale images of Rip11 and mCherry::Nesd channels are shown. *Experiment was done once.*



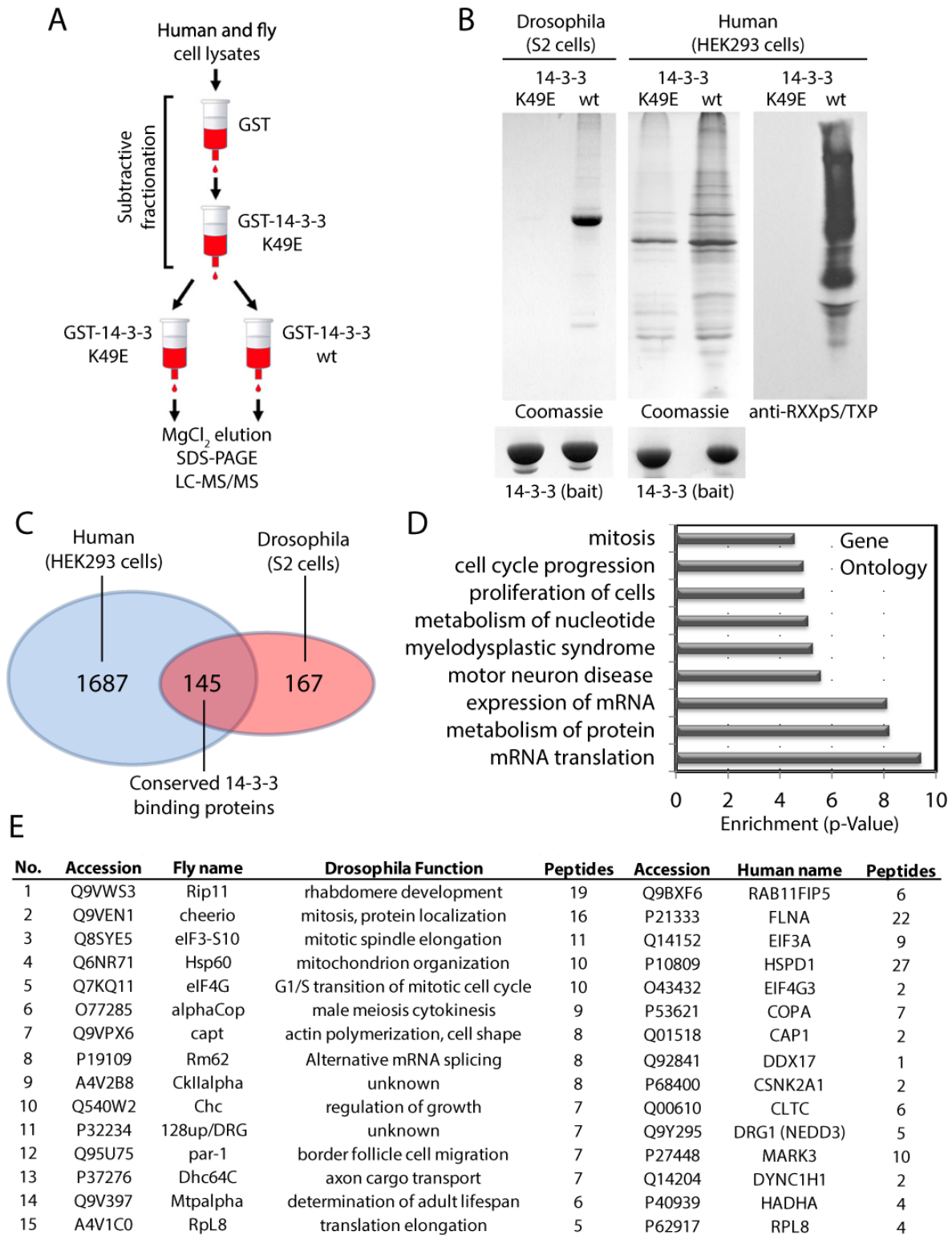


Figure 4.1 : A Proteomic Strategy to Characterize the Phospho-14-3-3 interactome

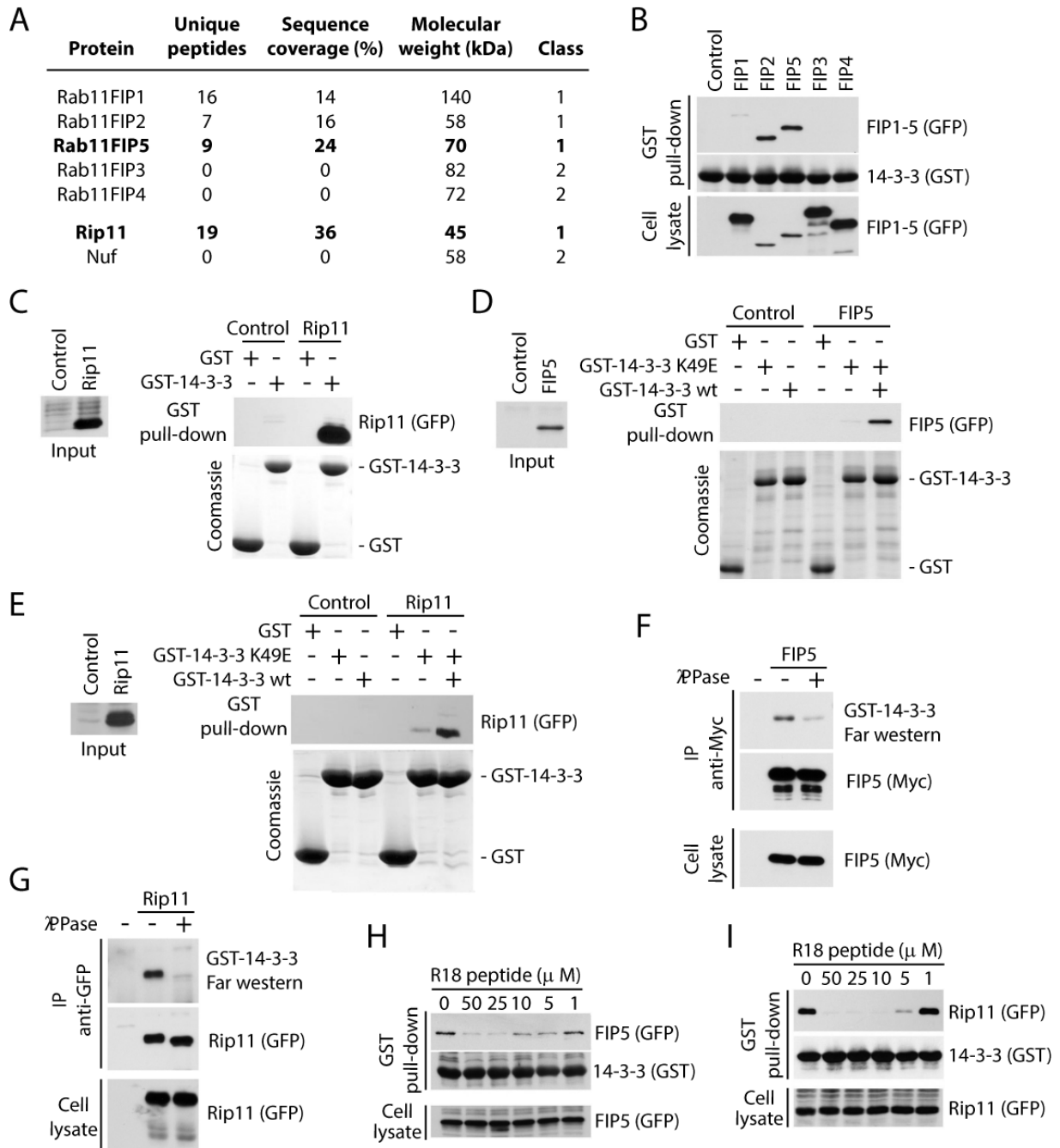


Figure 4.2 : Rip11 and FIP5 are conserved class1 14-3-3 binding proteins

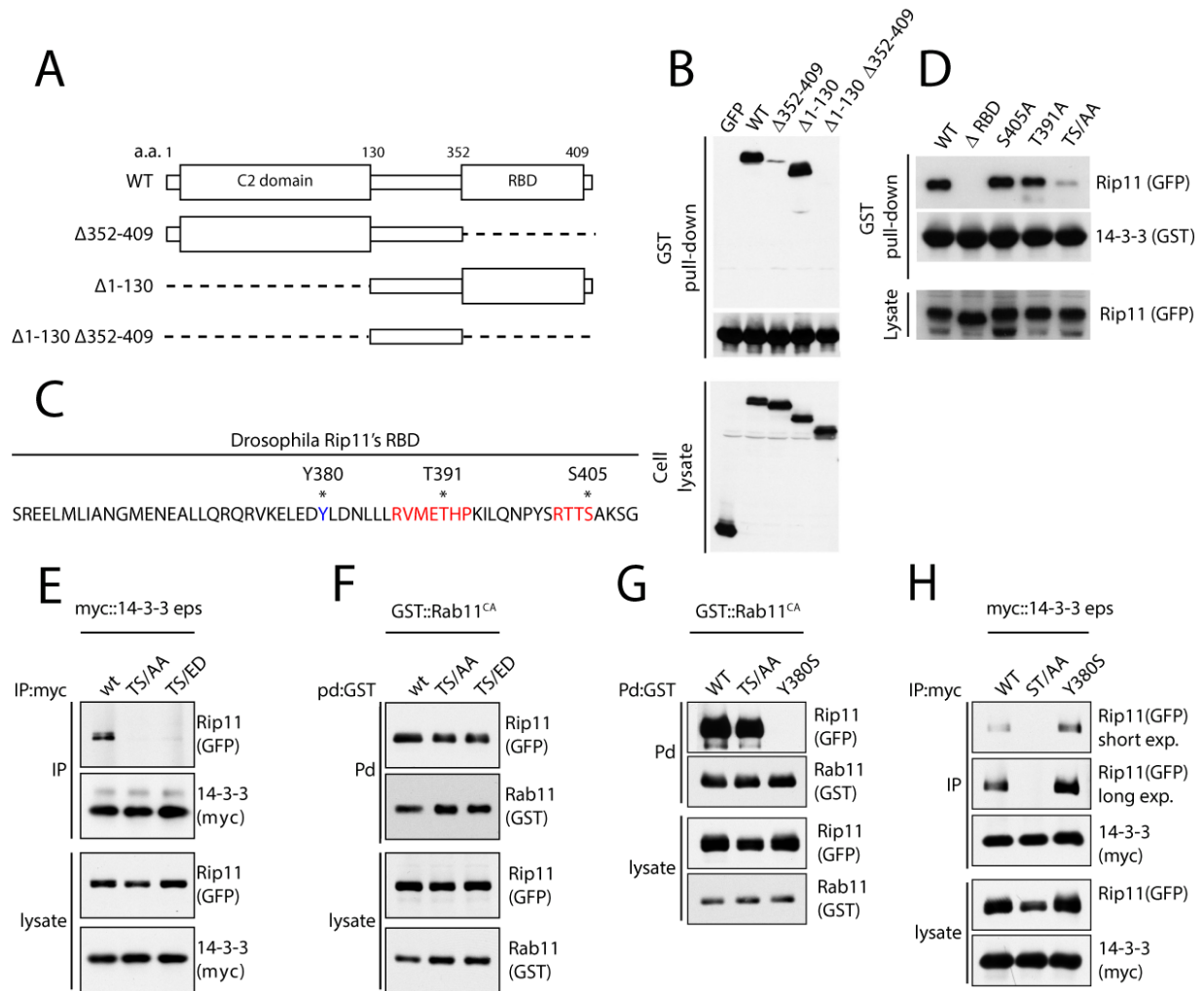
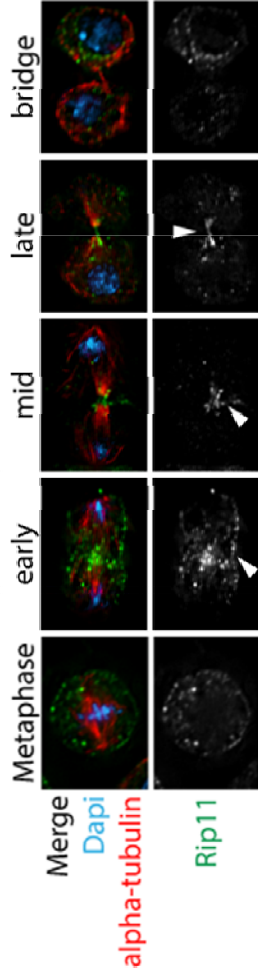
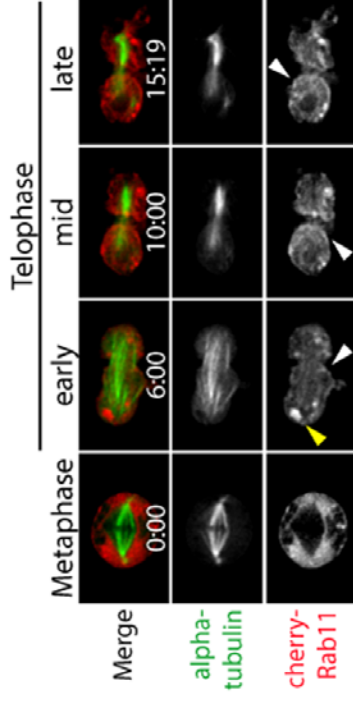


Figure 4.3 : Residues T391 and S405 in the RBD of Rip11 are required for 14-3-3 interaction but not for Rab11 binding

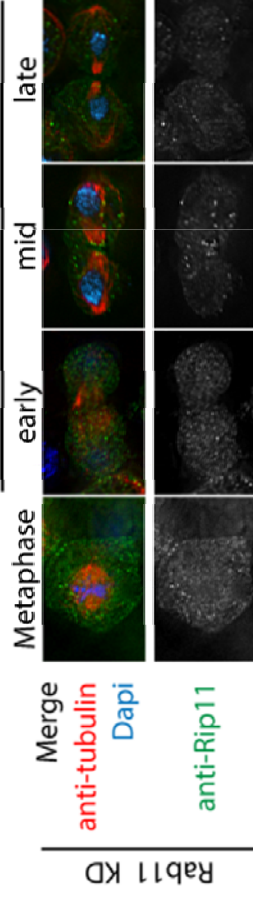
### A



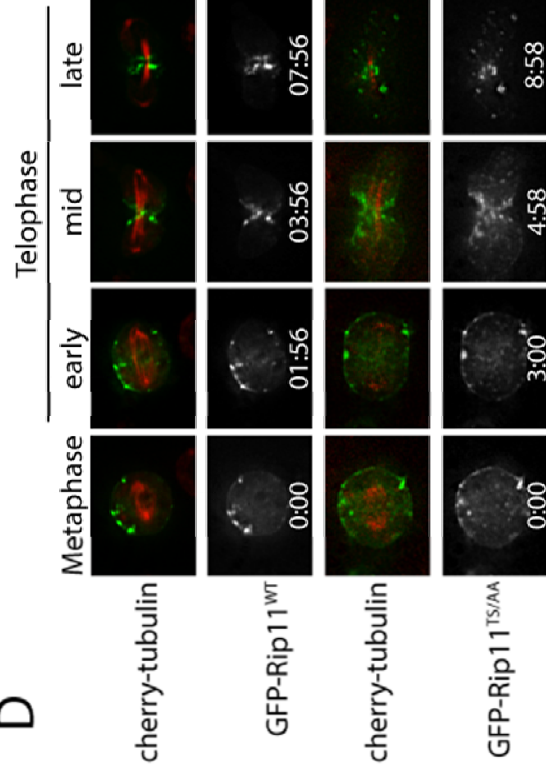
### B



### C



### D



### E

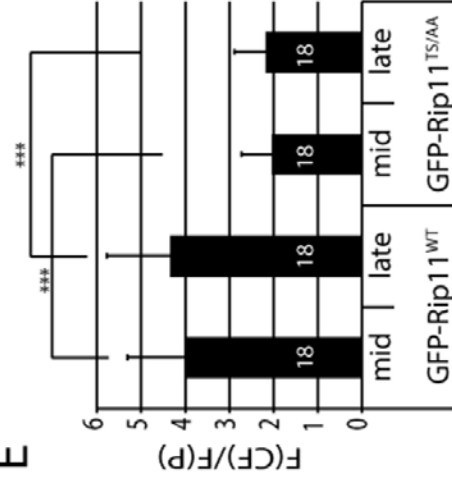


Figure 4.4 : Rip11 display a polarized distribution toward the cleavage furrow during cytokinesis that depends on T391 and S405 residues

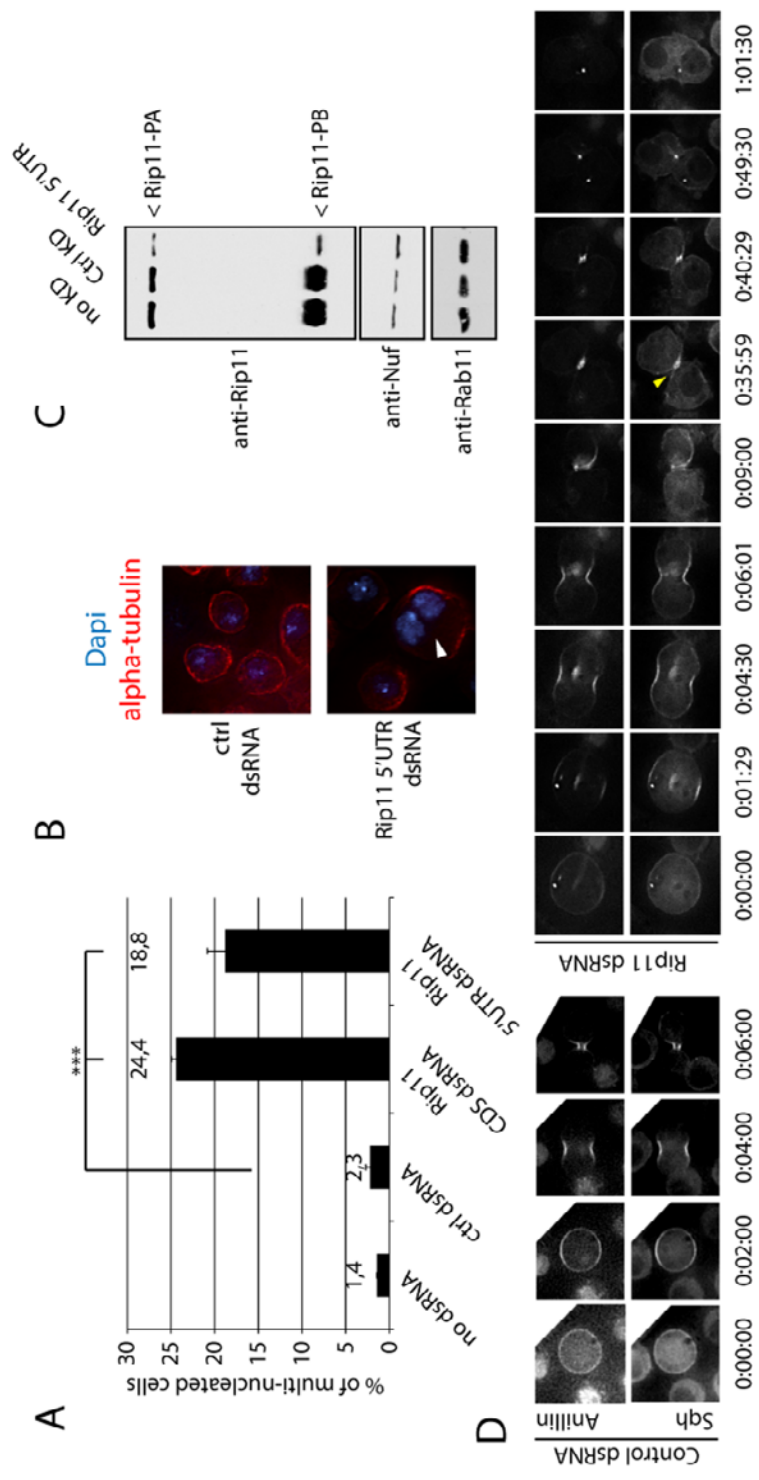


Figure 4.5 : Rip11 is required for late cytokinesis in S2 cells

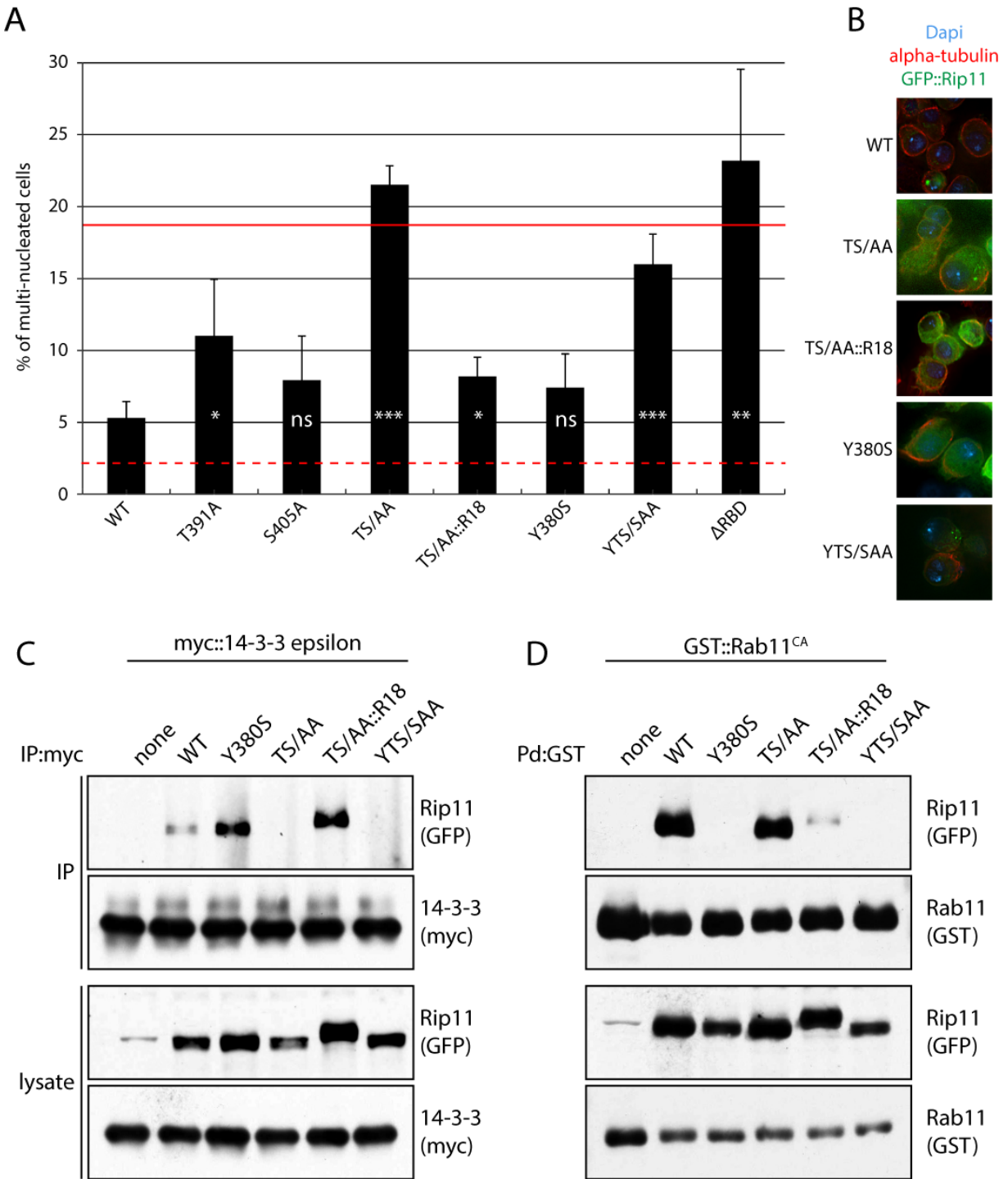


Figure 4.6 : Rip11 binding to both Rab11 and 14-3-3 is required for completion of cytokinesis



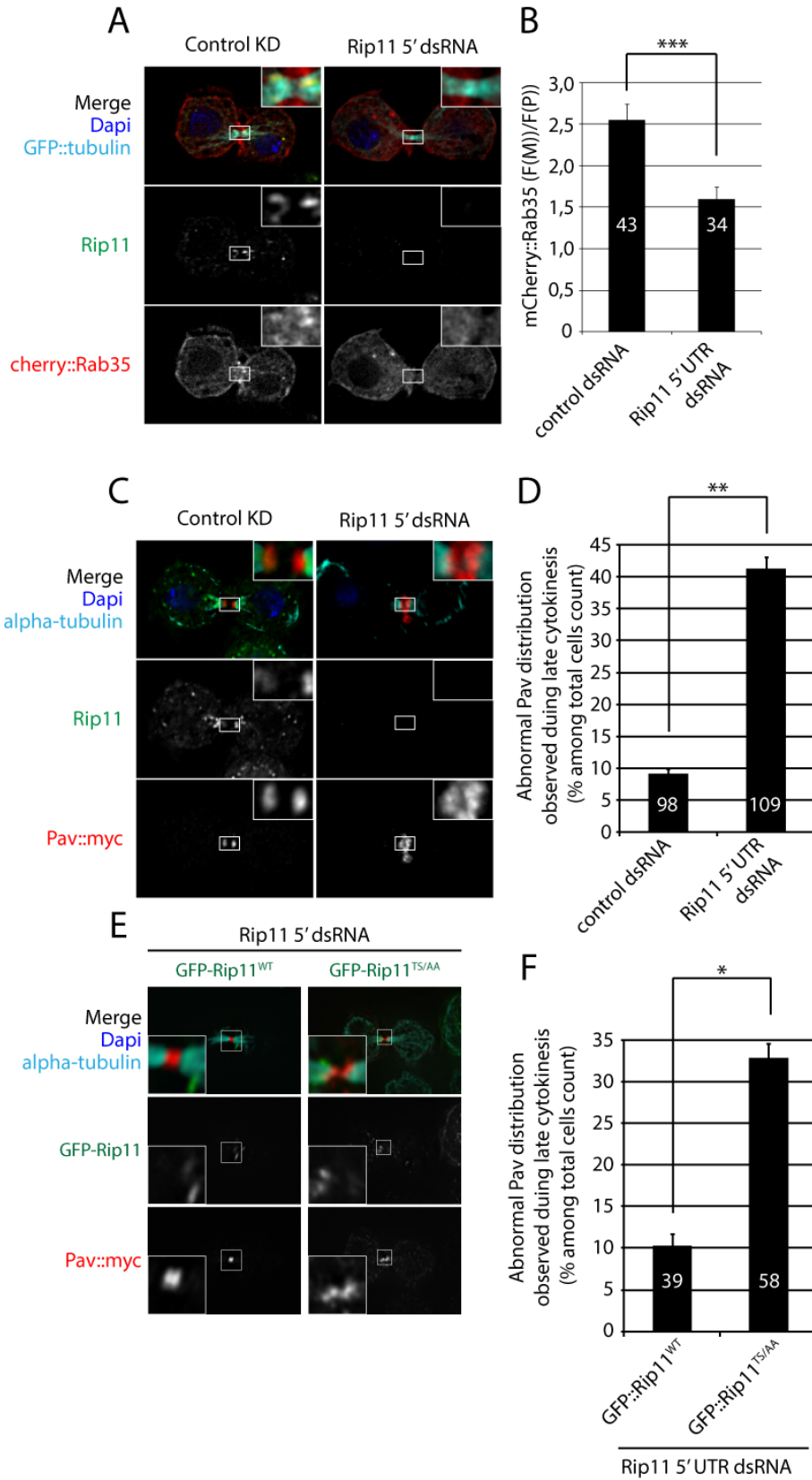


Figure 4.7 : Rab35 and Pavarotti are distributed through Rip11 trafficking

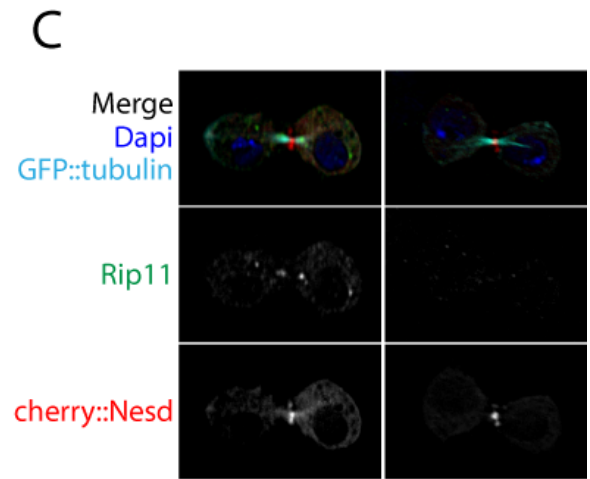
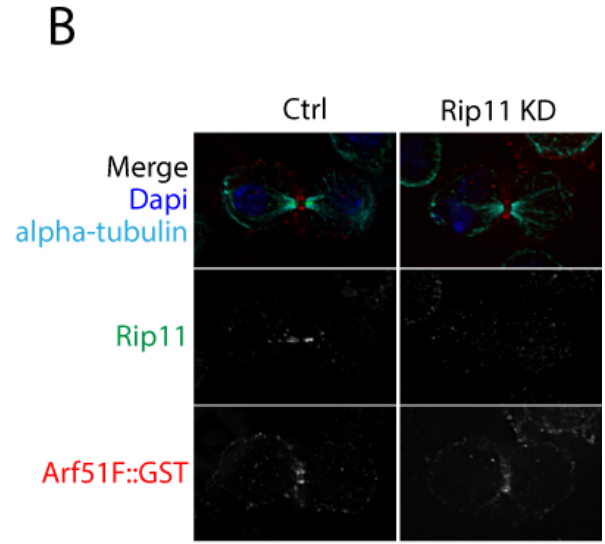
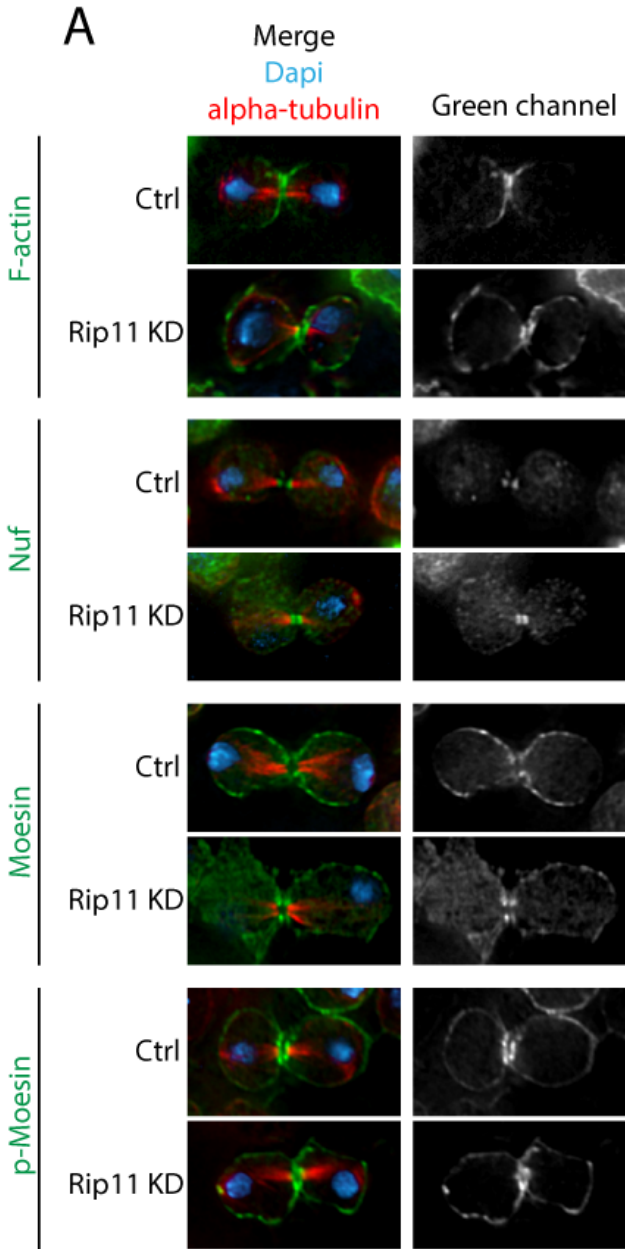


Figure 4.8 (Supp.1) : Cytokinetic regulators which are distributed in a non Rip11-dependent manner during *Drosophila* S2 cells cytokinesis

# **CHAPITRE 5**

## **DISCUSSION**

## 5. Discussion

Ce chapitre fait l'exercice de mettre les résultats présentés aux chapitres 2, 3 et 4 dans le contexte des défis de la recherche actuelle. Ces nouvelles connaissances nous aideront à identifier les mécanismes moléculaires qui régulent le cycle d'activation et d'inactivation de Rab11 afin de coordonner la liaison de Rab11 à son effecteur approprié.

### 5.1. Identification de nouveaux interacteurs (régulateurs) de Rab11

Dès le début de mon doctorat, nous avons entrepris d'identifier les interacteurs de Rab11 chez la Drosophile par *GST pull down* de Rab11 suivi de spectrométrie de masse et par criblage *in vivo* par ARN interférent (ARNi).

#### 5.1.1. Identification des partenaires protéiques de Rab11 par spectrométrie de masse

Nous avons utilisé des extraits d'embryons de Drosophile comme source de protéines et avons purifié GST-Rab11 à partir de bactérie que nous avons fait lier à GTP ou GDP. Une liste partielle des interacteurs identifiés a déjà été présentée (*Table 2.I*) et la liste complète se trouve dans le tableau suivant (*Table 5.I*). Récemment, Gillingham et al. ont effectué des *GST-pull down* sur la majorité des Rabs de Drosophile dans leur état CA afin d'identifier les effecteurs de chacune d'entre elles (Gillingham, Sinka et al. 2014). Ils ont utilisé des lysats de cellules S2 comme source de protéine. La 4<sup>e</sup> colonne du tableau (*Table 5.I*) indique si les interacteurs de Rab11 que nous avons identifiés ont aussi été observés par Gillingham et al. Sur les 10 interacteurs de Rab11 que nous avons identifiés, Gillingham et al. en ont identifié 5, dont la Moésine que nous avons caractérisée dans le chapitre 2.

Table 5.I : Protéines identifiées par spectrométrie de masse suivant l'exécution de deux *GST pull down* de Rab11 indépendants. L'affinité d'un partenaire protéique pour Rab11::GDP ou Rab11::GTP est indiquée. Si l'interacteur a été identifié dans chacune des deux colonnes, ce partenaire n'est donc pas spécifique pour un état de Rab11 particulier et se retrouve dans le groupe « aucune préférence ». Le nombre de chiffres dans la colonne « #peptide » indique si cette protéine a été retrouvée lors d'une ou lors des deux expériences.

	Interacteur	# peptide	Identifié dans l'article de Gillingham et al.	Fonction cellulaire
<b>Rab11::GDP spécifique</b>	Arf102F	3	Non	Membre de la famille des Arfs
	Rab escort protein	2	Non	Cible les Rabs pour leur <i>geranylgeranylation</i>
	Clathrin heavy chain	2	Oui	Protéine de type manteau protéique
	Par-1	1,2	Oui	Kinase, impliquée dans la polarité cellulaire
<b>Rab11::GTPyS spécifique</b>	Centaurin $\beta$ 1	2,3	Non	Arf6 GAP, orthologue de ACAP1
	Tbc1d15-17	3	Non	Rab-GAP
	Nuclear fallout	2	Oui	Orthologue des Rab11-FIP 3 et 4
<b>Aucune préférence</b>	14-3-3 epsilon	11,3	Non	Lie des protéines phosphorylée
	Moesin	1,4	Oui	Ancre le cytosquelette d'actine à la memb. plasm.
	GDI	5,7	Oui	<i>GDP dissociation inhibitor</i>

#### 5.1.1.1. Rab11 et la Moésine

La Moésine lie Rab11 dans sa conformation active et inactive, avec une préférence pour Rab11::GDP, et cette interaction est nécessaire pour établir une communication entre les BCs. Cette préférence de la Moésine pour Rab11::GDP (Figure 2.4a) est surprenante en sachant que les Rab::GDP sont en complexe avec la GDI. Un autre exemple d'une protéine liant Rab11::GDP est la Protrudine. Des indications suggèrent que la liaison de la Protrudine inhibe l'activation de Rab11 (Shirane and Nakayama 2006) et promeut le déplacement de Rab11::GDP par son interaction avec Kif5 (Matsuzaki, Shirane et al. 2011). De son côté, la liaison de la Moésine à Rab11 n'affecte pas l'activité globale de Rab11 et la fonction de la Moésine est en aval du trafic par Rab11. La Moésine est distribuée à la membrane plasmique des BCs qui entre en contact avec les cellules nourricières (Figure 2.4c). La surexpression de Rab11<sup>DN</sup> relocalise la Moésine sur les membranes aux jonctions BCs-BCs et empêche la

Moésine d'être phosphorylée adéquatement (Figure 2.4c). Il est donc possible que la liaison entre Rab11 et la Moésine affecte directement la distribution de cette dernière. Il serait intéressant d'identifier les sites de liaison à Rab11 sur la Moésine et de caractériser la distribution d'un mutant de la Moésine qui ne peut plus interagir avec Rab11. Aussi, l'expression de Rab11<sup>DN</sup> pourrait perturber le cytosquelette d'actine et/ou la localisation du Ptdln(4,5) $P_2$  et ainsi affecter indirectement la localisation de la Moésine.

Une difficulté inhérente survenant lors de la caractérisation *in vitro* des petites GTPases consiste à forcer la liaison des GTPases au GDP ou au GTP. La liaison entre une GTPase et un nucléotide n'est généralement que partiellement accomplie et cet inconvénient peut entraîner des conclusions erronées concernant l'affinité d'un partenaire protéique pour la forme active ou inactive d'une GTPase. Par exemple, nous avons identifié la GDI comme liant Rab11::GTP et Rab11::GDP, alors que la GDI ne peut lier les Rab::GDP (Rak, Pylypenko et al. 2003). Bien que les *GST pull down* menés dans l'article de Gillingham et al. aient été effectué avec des Rabs<sup>CA</sup> (liant un analogue de GTP non hydrolysable), la protéine GDI a été identifié comme liant chacune des Rabs<sup>CA</sup> testées (Gillingham, Sinka et al. 2014). Ainsi, une caractérisation biochimique plus approfondie de l'interaction entre Rab11 et la Moésine est nécessaire afin de conclure sur l'affinité de liaison entre la Moésine et Rab11. Comme les structures tridimensionnelles de Rab11 sous la forme ::GDP et ::GTP sont connues, l'identification des résidus interagissant directement avec la Moésine nous indiquerait si seule la forme ::GDP peut présenter adéquatement ces résidus afin d'interagir avec cette dernière.

#### **5.1.1.2. La phosphorylation des effecteurs de Rab11 permettrait de coordonner le trafic vésiculaire**

Des études précédentes indiquent que les FIPs (Su, Bryant et al. 2010, Lapierre, Avant et al. 2012, Li, Mangan et al. 2014) et la Protrudine (Shirane and Nakayama 2006) sont phosphorylées et ces phosphorylations affectent soit leur activité, soit leur affinité pour Rab11, respectivement. Les mécanismes moléculaires qui intègrent les signaux en aval de ces phosphorylations afin de spécifier une voie de transport restent méconnus. Nous montrons que les phosphorylations de Rip11 sont nécessaires pour son interaction avec 14-3-3 et 14-3-3 coordonne sa distribution subcellulaire lors de la cytokinèse.



### *Par-1 pourrait phosphoryler Rip11*

L'identification de la (les) kinase(s) qui phosphoryle(nt) Rip11 est nécessaire pour déceler les cascades d'évènement cellulaire en amont de la liaison entre Rip11 de 14-3-3. Une kinase candidate est Par-1. En effet, Par-1 et Rab11 interagissent (*Table 5.I*) et (Gillingham, Sinka et al. 2014), Rip11<sup>TS/AA</sup> interagit avec Par-1 (*Table 7.I*), Par-1 lie directement 14-3-3 (*Figure 4.1*) et (Benton, Palacios et al. 2002, Brajenovic, Joberty et al. 2004, Jin, Smith et al. 2004, Kusakabe and Nishida 2004, Al-Hakim, Goransson et al. 2005) et Par-1 phosphoryle FIP2 dans les cellules MDCK (Ducharme, Hales et al. 2006).

Afin d'évaluer si Par-1 phosphoryle Rip11 au site T391 et S405 et influence ainsi la liaison de Rip11 à 14-3-3, il serait intéressant d'évaluer la capacité de Rip11<sup>WT</sup> à lier 14-3-3 dans une situation où Par-1 est déplétée. Une difficulté vient du fait que la liaison de Rip11 à 14-3-3 est abolie entièrement que lorsque les deux sites de phosphorylation sont mutés. Si Par-1 ne phosphoryle qu'un des deux sites, nous ne verrons pas de modification importante dans la liaison entre Rip11 à 14-3-3. L'utilisation des simples mutants Rip11<sup>T391A</sup> et Rip11<sup>S405A</sup> permettrait de surmonter ce problème. Il serait aussi intéressant de comparer la distribution des vésicules Rip11 dans un contexte de déplétion de Par-1 avec la distribution des vésicules marquée par le mutant Rip11<sup>TS/AA</sup> dont l'interaction avec 14-3-3 est abolie. Si Rip11 est un substrat de Par-1, la distribution des vésicules Rip11 dans une situation de perte de fonction de Par-1 devrait corrélérer avec celle des vésicules Rip11<sup>TS/AA</sup> dont l'enrichissement au sillon de clivage est moindre comparativement à une situation contrôle.

### **5.1.2. Identification d'Evi5 comme la GAP de Rab11 par crible ARNi**

#### *in vivo*

Les Rab-GAPs limitent l'activité des Rabs dans l'espace et dans le temps. Ainsi, elles sont recrutées à la fin d'une voie de transport par un cofacteur (cascade des GAPs), ou sont présentes sur des membranes afin de prévenir l'activation inappropriée d'une Rab (Barr and Lambright 2010). Lorsque nous avons commencé nos recherches sur Evi5, la majorité des études publiées concernant les GAPs portaient sur la caractérisation *in vitro* de celles-ci et menaient régulièrement à des contradictions sur la spécificité d'un couple Rab/GAP. Le

criblage non biaisé des Rab-GAPs par ARNi lors de la migration des BCs, puis l'identification et la caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'Evi5 permet d'établir avec un haut degré de confiance l'activité Rab11-GAP d'Evi5 lors de la migration collective.

#### **5.1.2.1. Choix des BCs pour effectuer un crible *in vivo* des Rab-GAPs**

Un crible non exhaustif de surexpression de différentes Rab<sup>DN</sup> impliquées dans la voie d'endocytose nous a fait constater que Rab5 et Rab11 influencent dramatiquement la migration des BCs (Assaker, Ramel et al. 2010). L'implication de Rab5 et de Rab11 fait des BCs un modèle approprié pour conduire un crible ARNi sur les 27 Rab-GAPs potentielles chez la Drosophile. Nous n'avons trouvé que deux GAPs qui sont nécessaires pour la migration, soit RN-tre, une GAP connue pour Rab5 chez les mammifères (Lanzetti, Rybin et al. 2000) et qui interagit génétiquement avec Rab5 chez la Drosophile (Houalla, Shi et al. 2010), et Evi5 (Table 3.I). Ces résultats supportent nos observations que le trafic vésiculaire régulé par Rab5 et Rab11 est essentiel pour la migration des BCs. Il est ensuite notable la surexpression et la déplétion d'Evi5 mènent à des défauts de migration, démontrant l'importance de Rab11 de cycliser entre un état actif et inactif.

#### **5.1.2.2. Mesurer l'activité *in vivo* d'une GAP**

Nous profitons de la propriété des Rabs à cycliser entre un état actif lié aux membranes et un état inactif soluble afin de mesurer l'activité de Rab11 *in vivo*. Sec15, un effecteur de Rab11, perd sa distribution vésiculaire au profit d'une distribution cytoplasmique soluble lors de la surexpression de Rab11<sup>DN</sup> (Assaker, Ramel et al. 2010). Nous montrons que Sec15 est davantage recrutée sur les vésicules lors de l'expression de Rab11<sup>CA</sup> et forme des vésicules de plus grande taille que dans une situation contrôle (Figure 3.4B et G). Nous pouvons ainsi utiliser Sec15 comme sonde de l'activité de Rab11. Afin de quantifier le volume des vésicules Sec15, nous avons développé un algorithme de segmentation avec l'aide du Dr Jonas Dorn. Nous avons ainsi pu déterminer que la surexpression d'Evi5 résultait en une solubilisation de GFP::Sec15, phénocopiant une perte de fonction de Rab11, alors que la déplétion d'Evi5 menait à une augmentation de la taille des vésicules, phénocopiant une situation de gain de

fonction de Rab11 (Figure 3.4). Nous avons d'ailleurs confirmé ces résultats en utilisant le RBD de Rip11 fusionné à la GFP (Figure 3.7(Supp.2)).

#### *Application de l'algorithme de segmentation des vésicules*

L'algorithme de segmentation des vésicules Sec15 pourrait être utilisé pour identifier d'autres régulateurs de Rab11 dans les BCs, dont la GEF de Rab11. Bien sûr, la protéine CRAG qui démontre une activité Rab11-GEF dans les cellules photoréceptrices de l'œil serait une candidate intéressante (Xiong, Bayat et al. 2012). Cet outil pourrait aussi être utilisé dans d'autres tissus pour mesurer l'activité de Rab11. Lors du développement de la trachée de l'embryon de *Drosophile*, j'ai confirmé les résultats d'un autre laboratoire (Shaye, Casanova et al. 2008) montrant que Rab11 est essentiel pour la morphologie de ce tissu (données non montrées). Nous pourrions moduler l'expression d'Evi5 et quantifier la taille des vésicules Sec15 afin d'évaluer si Evi5 agit comme Rab11-GAP dans ce tissu.

Cet algorithme pourrait être adapté à d'autres couples Rab/effecteur. Il faudrait évidemment déterminer si la distribution de ces effecteurs varie selon l'activité de la Rab et évaluer la spécificité de cet effecteur pour la Rab en question. Il serait intéressant de tester si RN-tre affecte Rab5 lors de la migration des BC en utilisant un effecteur pour Rab5, tel que la protéine Rabenosyn-5 (Nielsen, Christoforidis et al. 2000, Morrison, Dionne et al. 2008).

L'activité des petites GTPases est généralement mesurée à l'aide de sonde intramoléculaire FRET. Cependant, la biologie moléculaire derrière la génération de ces sondes est complexe et le développement de ces sondes requiert souvent plusieurs mois/années. Contrairement aux sondes FRET, la mesure de la distribution d'un effecteur d'une Rab se fait rapidement et ne nécessite que peu de clonage.

#### **5.1.2.3. Identification d'Evi5 comme interagissant avec Rab11, Rab6 et Rab14 par Gillingham et al.**

Evi5 interagit avec Rab6 et Rab14 en plus de Rab11 (Gillingham, Sinka et al. 2014). La capacité d'Evi5 à promouvoir l'activité GTPase de Rab14 et Rab6 n'a pas été étudié. Evi5 pourrait être impliquée dans une cascade d'inactivation de Rab. Rab14 et Rab11 sont toutes deux impliquées dans le processus de recyclage (Ullrich, Reinsch et al. 1996, Linford,

Yoshimura et al. 2012). Il serait tentant de spéculer qu'Evi5 soit recrutée par Rab14 afin d'inhiber Rab11 sur certains compartiments endosomaux et ainsi permettre à un cargo de suivre la voie de recyclage régulée par Rab14.

#### **5.1.2.4. Régulation post-traductionnelle d'Evi5**

Une simple modulation dans l'expression d'Evi5 mène à des défauts majeurs de migration des BCs. Cette observation suggère que l'activité d'Evi5 doit être finement régulée pour maintenir une activité de Rab11 adéquate lors de la migration. La détection d'Evi5 après immunobuvardage révèle aussi plusieurs bandes avec des poids moléculaires différents suggérant la présence de modifications post-traductionnelles (Figure 3.2I et K, et observations par Carlos Zeledon au laboratoire). Il serait donc intéressant d'investiguer si l'activité d'Evi5 est régulée par une ou des modifications post-traductionnelle(s) à l'instar de la GAP AS160 (Sano, Kane et al. 2003).

## **5.2. Importance de Rab11 lors de la migration collective**

Rab11 est essentielle pour maintenir les récepteurs tyrosine kinases (RTKs) actifs polarisés au front de migration au début de la migration des BCs (Assaker, Ramel et al. 2010). La perte de fonction de Rab11 et une modulation de l'expression d'Evi5 abolit cette polarisation des RTKs actifs. Ces observations suggèrent que les RTK sont eux-mêmes recyclés au front de migration par un trafic dépendent de Rab11, ou alors qu'une protéine qui limiterait la diffusion des RTKs est elle-même transportée par Rab11 (Assaker, Ramel et al. 2010).

Une autre possibilité est que Rab11, en contrôlant la localisation de la Moésine, régule indirectement le cytosquelette d'actine et la diffusion des RTKs actifs. Le cytosquelette d'actine, avec l'intermédiaire de protéines transmembranaires, est connu pour former des « compartiments membranaires » à la membrane plasmique qui limitent la diffusion de plusieurs récepteurs membranaires (Sako, Nagafuchi et al. 1998, Tomishige, Sako et al. 1998, Suzuki, Ritchie et al. 2005). De façon imagée, l'actine formerait la clôture, alors que les protéines transmembranaires formeraient les piquets (Kusumi, Suzuki et al. 2011), retenant les molécules membranaires à l'intérieur d'un « enclos ». La restriction de la diffusion du

récepteur des cellules B (BCR) au sein de la membrane plasmique est bien caractérisée. Par imagerie à haute résolution, différents groupes de recherche ont pu montrer que le cytosquelette d'actine confine spatialement le récepteur BCR (Treanor, Depoil et al. 2010, Treanor, Depoil et al. 2011, Freeman, Jaumouille et al. 2015) à la membrane plasmique, dépendamment de la protéine Ezrine (orthologue de la Moésine chez la Drosophile) (Treanor, Depoil et al. 2011). Il est donc tentant de spéculer que la Moésine régule le confinement des RTKs actifs en stimulant la formation d'un compartiment membranaire à la membrane plasmique au front de migration.

### **5.3. Rôle d'Evi5 lors de la migration chez les vertébrés**

La migration cellulaire est impliquée dans plusieurs pathologies et le gène Evi5 semble être muté dans deux cas précis de maladie impliquant la migration de cellule. Les neuroblastomes (NB) sont des tumeurs solides extra-crâniennes dont le développement reste énigmatique. La formation des NBs implique les cellules de la crête neuronales (CCNs), qui sont hautement migratoires et migrent collectivement. Des défauts de migration des CCNs mènent à une transformation cellulaire précoce, associés au développement de NB (Maris, Hogarty et al. 2007). Dans un même ordre d'idée, un dérèglement de la migration de lymphocytes T auxiliaires participe au développement de la sclérose en plaque (SP), une maladie auto-immune (Legroux and Arbour 2015). Une modulation dans l'expression d'Evi5 est associée au développement des NBs (Roberts, Chernova et al. 1998) et de la SP (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011, Martin, Pantoja et al. 2011).

La SP est une maladie très complexe associée à plusieurs facteurs cellulaires différents (Legroux and Arbour 2015). Il est donc difficile de suggérer un rôle d'Evi5 lors de la SP, sauf peut-être sur la migration des lymphocytes T. Une hypothèse intéressante concernant le NB est qu'une modulation de l'expression d'Evi5 bloque la migration cellulaire des CCNs de façon similaire aux BCs menant au développement de NB.

Afin d'évaluer si Evi5 régule la migration des CCNs chez les vertébrés, nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr David Travers, de l'Université de San Diego, afin

d'injecter lors du développement du poisson-zèbre l'ARNm d'Evi5 humain pour reproduire une surexpression de ce gène. La surexpression d'Evi5 n'a pas donné de retard de migration significatif des CCVs (données non montrées). Cependant, l'expérience peut ne pas avoir fonctionné pour les raisons suivantes : *i*) mauvaise qualité de l'ARN, *ii*) la protéine Evi5 humaine n'est pas fonctionnelle chez le poisson-zèbre *iii*) surexpression d'Evi5 nulle ou modeste. Il serait tout de même intéressant de reconduire ces expériences ainsi qu'adresser si une perte de fonction de Rab11 ou de Evi5 (par morpholino par exemple) affecte ou non la migration des CCVs.

## **5.4. Rip11 et 14-3-3 lors de la cytokinèse**

Au chapitre 4, nous avons montré que les vésicules Rip11 sont polarisées lors de la cytokinèse et que cette polarisation est dépendante de l'interaction entre Rip11 et 14-3-3. Nous avons montré que l'interaction Rip11/14-3-3 est essentielle lors de la cytokinèse, en particulier pour la distribution de Rab35 et Pav.

### **5.4.1. 14-3-3 interagit spécifiquement avec les FIPs de classe I**

Les motifs de liaison à 14-3-3 et les sites de phosphorylation de Rip11 ne sont pas conservés chez Nuf. Cependant, la tyrosine impliquée dans la liaison à Rab11 est conservée (Figure 5.1). Nous nous sommes demandés si les RBD des FIPs de classe I chez les mammifères sont impliqués dans la liaison avec 14-3-3. La troncation du RBD de FIP2 résulte en une réduction de l'affinité pour 14-3-3 d'environ 50% (donnée non montrée). Cette observation suggère que chez les protéines FIPs de mammifères, plusieurs sites de phosphorylation sont impliqués dans la liaison avec 14-3-3 et ces sites de phosphorylation ne sont pas situés qu'au RBD. Il serait intéressant de muter les sites de phosphorylation connus sur FIP2 par Par-1 (Lapierre, Avant et al. 2012) et sur FIP5 par Erk (Su, Bryant et al. 2010) et GSK3 (Li, Mangan et al. 2014) par des résidus non phosphorylables afin de voir si ces sites sont impliqués dans la liaison avec 14-3-3.

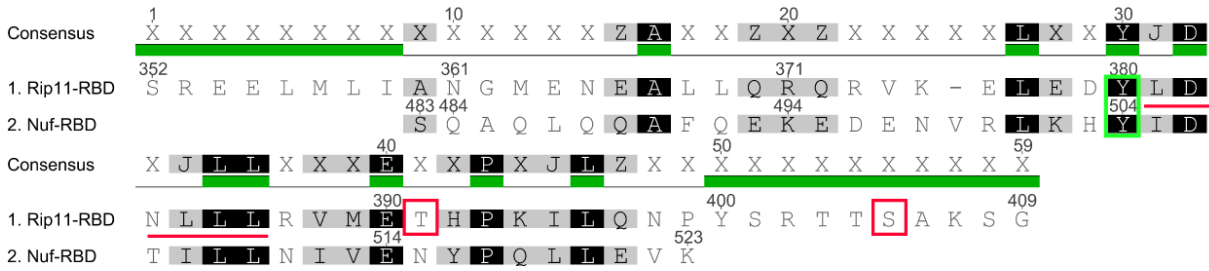


Figure 5.1 : Alignement de séquence entre les RBD de Rip11 et Nuf chez la Drosophile. Les résidus T<sup>391</sup> et S<sup>405</sup> impliqués dans la liaison entre Rip11 et 14-3-3 sont indiqués d'un carré rouge, alors que le résidu Y<sup>380</sup> impliqué dans la liaison à Rab11 est indiqué d'un carré vert. Un site potentiel de liaison à la Chc est surligné en rouge.

#### 5.4.2. L'interaction entre Rip11 et 14-3-3 serait une liaison stable

Nous avons démontré que la liaison entre 14-3-3 et Rip11 est nécessaire lors de la cytokinèse par l'entremise du mutant Rip11<sup>TS/AA</sup>::R18 lors d'expériences de *rescue* (Figure 4.6A). Comme le peptide R18 lie constitutivement 14-3-3 (Petosa, Masters et al. 1998), ceci suggère que l'interaction entre Rip11 et 14-3-3 lors de la cytokinèse n'est pas soumise à un cycle de phosphorylation/déphosphorylation. D'ailleurs, nous observons, après traitement avec la  $\lambda$ -phosphatase, que la majorité des protéines Rip11 se retrouve sous la forme phosphorylée (Figure 4.2G). Comme il n'y a environ que 2% des cellules en mitose dans une population de cellules S2, la phosphorylation de Rip11 ne semble pas être un événement unique à la division cellulaire. Ainsi, Rip11 se retrouve probablement constamment phosphorylée et la régulation de la liaison entre Rip11 et 14-3-3 se situe peut-être davantage au niveau de la déphosphorylation de Rip11, au niveau d'une compétition possible entre 14-3-3 et Rab11 pour la liaison avec Rip11, ou par la localisation de 14-3-3.

#### 5.4.3. Mécanismes d'action de 14-3-3

Les mécanismes d'action par lesquels 14-3-3 régule la fonction de Rip11 peuvent être divers. Une première hypothèse serait que 14-3-3 soit impliquée dans la stabilisation du dimère RBD/RBD de Rip11. La Figure 7.I montre que la capacité de dimérisation du mutant Rip11<sup>TS/AA</sup> est similaire à Rip11<sup>WT</sup>, suggérant que 14-3-3 n'affecte pas la dimérisation des RBD. Une autre hypothèse est que 14-3-3 compétitionne Rab11 pour la liaison du RBD, et

ainsi inhibe l'interaction Rip11/Rab11. En effet, il est conceptuellement difficile d'imaginer que 14-3-3 et Rab11 puissent interagir avec Rip11 en même temps puisque les résidus interagissant avec Rab11 et 14-3-3 sont rapprochés. Cependant, l'affinité de liaison de Rip11<sup>WT</sup> et de Rip11<sup>TS/AA</sup> pour Rab11 est comparable. Au contraire, il semble plutôt que Rab11 inhibe la liaison de 14-3-3 à Rip11. En effet, les mutants de Rip11 dont l'interaction avec Rab11 est abolie ont une affinité plus élevée envers 14-3-3 que Rip11 sauvage (Figure 4.3H et 4-6C).

La fonction de 14-3-3 est peut-être de favoriser la liaison de Rip11 à un autre régulateur du trafic vésiculaire, comme Rab35. Nous avons d'abord observé une collaboration fonctionnelle ainsi qu'une colocalisation entre Rip11 et Rab35 lors de la cytokinèse. Des expériences préliminaires de *GST pull down* de Rab35 montrent que Rab35 et Rip11 interagissent et que cette liaison est modulée par 14-3-3. En effet, le mutant de Rip11 dont l'interaction avec 14-3-3 est abolie (Rip11<sup>TS/AA</sup>) a une affinité réduite pour Rab35 (Figure 7.2). L'affinité de liaison de Rip11 pour Rab35 est bien moindre qu'envers Rab11. Une explication possible vient du fait que l'interaction entre Rip11 et Rab35 ne survient peut-être qu'en mitose.

Une autre protéine dont l'interaction avec Rip11 serait modulée par 14-3-3 est la chaîne lourde de la Clathrine (Chc) que nous avons identifiée par spectrométrie de masse (Table 7.I) comme interacteur de Rip11<sup>TS/AA</sup>. D'ailleurs, un site authentique de liaison à la Chc (Ramjaun and McPherson 1998, Drake, Downs et al. 2000) se situe entre les sites de liaison à Rab11 et à 14-3-3 (Figure 5.2), et semble conservé chez *Nuf*. Ces observations suggèrent que 14-3-3 est un inhibiteur de la liaison entre Rip11 et la Chc et le rôle potentiel d'une interaction entre Chc et Rip11 reste à découvrir.

#### **5.4.4. Rip11 régulerait la distribution du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>**

Nous montrons au chapitre 4 que Rip11 régule la distribution de Rab35 au *midbody*. Rab35 assure la distribution de OCRL au pont intercellulaire afin d'hydrolyser le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> lors de la cytokinèse (Kouranti, Sachse et al. 2006, Dambournet, Machicoane et al. 2011). Nous avons aussi observé que Rip11 régulerait la distribution d'un autre effecteur



potentiel du PtdIns(4,5) $P_2$ , soit la protéine transmembranaire Scamp. Nous avons examiné la distribution de Scamp lors de la cytokinèse et avons observé que Scamp localise sur des endosomes marqués par Rip11 et l'enrichissement de Scamp au *midbody* dépend de Rip11 (Figure 7.3A, B). Le taux de binucléation observé après la déplétion de *scamp* (~8%) ne corrèle pas avec le taux observé après déplétion de Rip11 (entre 18,8 et 24,4%), malgré une réduction marquée de l'ARNm de *scamp* (Figure 7.3C, D). Récemment, il a été montré qu'un peptide de la protéine humaine SCAMP (CWYRPIYKAFR) possède la propriété biochimique de lier et de séquestrer le PtdIns(4,5) $P_2$  (Ellena, Moulthrop et al. 2004). Nous avons donc émis l'hypothèse que Scamp pouvait restreindre la diffusion du PtdIns(4,5) $P_2$  durant l'ingression du sillon de clivage.

Comme l'expression de la sonde GFP::tubby qui permet de suivre la distribution du PtdIns(4,5) $P_2$  lors de la division des cellules S2 (Ben El Kadhi, Roubinet et al. 2011) génère de l'instabilité corticale (Figure 7.3E), nous avons plutôt regardé la distribution de l'effecteur du PtdIns(4,5) $P_2$  Anilline en utilisant une lignée cellulaire de S2 développée au laboratoire du Dr Gilles Hickson exprimant mCherry::Anilline et Sqh::GFP (spaghetti squash, orthologue de la Myosine II chez la Drosophile). Nous avons observé que 42,3% des cellules déplétées en Rip11 montrent une instabilité corticale résultant en diverses longueurs de domaine recrutant Anilline. Nous observons aussi une distribution ectopique d'Anilline sur des vésicules dans 11,5% des cellules déplétées pour Rip11. Nous montrons d'ailleurs que dans les situations où les cellules échouent la cytokinèse, Anilline est retrouvée sur les vésicules dans 92% de ces cellules (Figure 7.3F). Ensemble, ces données suggèrent que Scamp est distribuée dépendamment du trafic de Rip11 et que Scamp pourrait être impliquée dans la restriction du PtdIns(4,5) $P_2$  durant la cytokinèse. Rip11 régule la distribution de Rab35 et de Scamp lors de la cytokinèse et fait de Rip11 un régulateur potentiel du PtdIns(4,5) $P_2$ .

#### **5.4.5. La protéine Rip11 serait présente sur des vésicules distinctes des vésicules Rab11/FIP3(Nuf)**

Les vésicules Rab11/Nuf ont pour origine le TGN lors de la cytokinèse des spermatocytes de la Drosophile (Giansanti, Belloni et al. 2007, Poleyov, Wei et al. 2009, Sechi, Colotti et al. 2014). Lors de la cytokinèse des cellules humaines, les vésicules

Rab11/FIP3 proviennent du RE péricentriolaire (Fielding, Schonteich et al. 2005, Schiel, Simon et al. 2012). Les vésicules Rip11 sont plutôt restreintes à la membrane plasmique et ne semblent pas localiser au Golgi ou au RE péricentriolaire. La localisation des vésicules Rip11 est davantage similaire à la distribution des vésicules Rab35 (Kouranti, Sachse et al. 2006). D'ailleurs nous observons une colocalisation au pont intercellulaire et au *midbody* entre Rab35 et Rip11. Une caractérisation spatio-temporelle par imagerie en temps réel de la distribution de Rab35 et de Rip11 lors de la cytokinèse et une corrélation phénotypique sur la localisation de OCRL en situation de perte de fonction de Rip11 et de Rab35 nous permettrait d'affirmer ou non si ces deux protéines régulent les mêmes voies de transport.

#### 5.4.6. Modèle de travail proposé

Je propose que 14-3-3 favorise une interaction entre Rip11 et Rab35. Rip11 régulerait le trafic des vésicules Rab35 au *midbody* en faisant le pont entre Rab35 et des moteurs moléculaires. Comme une interaction entre Pav et Rab35 a déjà été observée (Gillingham, Sinka et al. 2014), Rab35 permettrait de localiser et de stabiliser Pav au *midbody*, par un mécanisme encore inconnu. De plus, Rip11 au *midbody* permettrait d'interagir et de séquestrer les molécules 14-3-3. La liaison précoce entre MKLP1 et 14-3-3 mène à la déstabilisation du *midbody* (Joseph, Hutterer et al. 2012). La distribution diffuse de Pav au *midbody* en absence de Rip11 suggère en effet que Rip11 régule indirectement la stabilité du *midbody* (Figure 5.2).

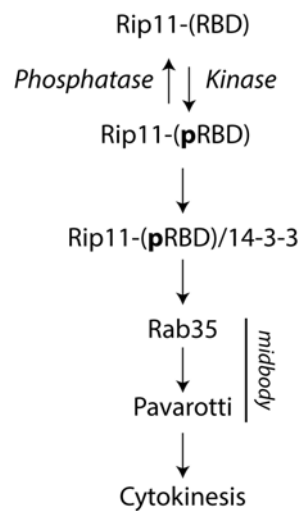


Figure 5.2 : Rôles proposés du complexe Rip11/14-3-3 lors de la cytokinèse

### 5.4.7. Difficultés rencontrées lors de la caractérisation de Rip11 *in vivo*

Afin d'évaluer si le rôle de Rip11 lors de la cytotinèse est conservé lors du développement de la mouche, j'ai mis beaucoup d'efforts afin de caractériser deux allèles de Rip11, soit Rip11<sup>KG24085</sup> et Rip11<sup>G0003</sup> (Table 5.II). Le locus du gène *Rip11* est situé sur le chromosome X. Des insertions aléatoires de transgène près du locus de Rip11 sont à l'origine des allèles Rip11<sup>KG24085</sup> et Rip11<sup>G0003</sup>. Rip11<sup>KG24085</sup> a été caractérisé par le laboratoire du Dr Ready (Li, Satoh et al. 2007).

Table 5.II : Description des deux lignées de Drosophile arborant un allèle de *Rip11*

Nom des lignées	Provenance	Femelle homozygote	Mâle hémizygote
<i>Rip11</i> <sup>KG24085</sup> , FRT19A	Lab Dr Ready (Li, Satoh et al. 2007)	Létale	Très rare
<i>Rip11</i> <sup>G0003</sup>	Bloomington stock collection #11466	Létale	Aucun

Voici les lignées ou progénitures que j'ai réussi à générer afin d'évaluer si une perte de fonction de Rip11 mène à des défauts de cytotinèse ou de distribution de protéines apicales :

i) Progénitures arborant des mosaïques homozygotes du mutant Rip11<sup>KG24085</sup> générées grâce aux sites de recombinaison FRT19A. Bien qu'une perte totale de signal de Rip11 par immunofluorescence (grâce à un anticorps généré par le laboratoire du Dr Ready reconnaissant le domaine C-terminal de Rip11 (Li, Satoh et al. 2007)) a été détectée, je n'ai observé aucun défaut de cytotinèse ou de distribution de protéines polarisées.

J'ai regardé les tissus suivants pour des défauts de cytotinèse : disques imaginaux d'aile et de l'œil, cerveau, cellules épithéliales des chambres d'œufs et hémocytes. Comme Rip11 est aussi impliquée dans le trafic de cargos à la membrane apicale, j'ai regardé la distribution de différentes protéines apicales dans les cellules épithéliales des chambres d'œufs dont aPKC, E-Cad, Moésine, p-Moésine, Crumbs, Rab11, MyosinV, a-spectrine, pTyr.

J'ai par la suite ajouté un allèle nul de Rab11, de 14-3-3 ou de Nuf dans le *background* génétique des femelles arborant la mutation homozygote de Rip11<sup>KG24085</sup> créé par mosaïque sans observer pour autant des défauts de cytotcinèse.

ii) Quelques mâles hémizygotés de la lignée Rip11<sup>KG24085</sup> m'ont permis de générer des femelles trans-hétérozygotes Rip11<sup>KG24085</sup>/Rip11<sup>G0003</sup>. J'ai par la suite regardé les différents tissus mentionnés au point i). Bien qu'une perte de signal de Rip11 soit observée dans la progéniture d'intérêt, je n'ai observé aucun défaut de cytotcinèse.

iii) J'ai par la suite regardé si les mâles Rip11<sup>KG24085</sup> hémizygotés présentaient des défauts de cytotcinèse dans les spermatozytes. J'ai quantifié le taux de binucléation observé chez les spermatozytes des mâles Rip11<sup>KG2408</sup> comparativement à des mouches contrôles (Oregon R). Près de 3,2% des spermatozytes Rip11<sup>KG2408</sup> présentent de la binucléation (n=445), comparativement à virtuellement 0% dans une situation contrôle (n=313). Cependant, l'allèle de Rip11 peut ne pas être responsable de la totalité de ce phénotype (le génome des mouches Rip11<sup>KG2408</sup> pourrait contenir des mutations abrogeant l'expression d'autres gènes que Rip11) et le *rescue* de la binucléation par GFP::*Rip11*<sup>WT</sup> serait, à mon sens, essentiel. Comme le phénotype est faible, je n'ai pas poussé la caractérisation des spermatozytes.

Les causes du manque de phénotype suivant une perte de fonction de Rip11 peuvent être multiples. D'abord, il reste une possibilité que l'allèle Rip11<sup>KG24085</sup> ne soit pas totalement nul et qu'une petite quantité de protéine puisse suffire aux rôles biologiques de Rip11. Avec le recul, j'aurai dû exciser le transgène du mutant Rip11<sup>KG24085</sup> afin de générer une délétion suffisante pour éliminer complètement le gène de Rip11. Aussi, une redondance fonctionnelle entre Rip11 et Nuf pourrait expliquer l'absence de phénotype de perte de fonction de Rip11 *in vivo*.

Je connais maintenant davantage le rôle de Rip11 lors de la cytotcinèse et je serais maintenant plus apte à caractériser le rôle de Rip11 *in vivo*. J'ajouterais des allèles de Rab35 ou de Pav au *background* génétique des femelles arborant la mutation homozygote de Rip11<sup>KG24085</sup> et je regarderais pour des défauts de cytotcinèse dans différents tissus. Il serait aussi très excitant d'éditer le génome des mouches à l'aide de la technologie CRISPR/Cas

(Port, Chen et al. 2014) en mutant, directement dans le gène de Rip11, les nucléotides correspondant aux acides aminés T391 et S405 afin de les remplacer par des alanines et observer par la suite l'impact de ces mutations lors du développement.

## **5.5. Conclusion, Impact et Perspective**

Le trafic vésiculaire est tout sauf un échange chaotique de vésicules entre différents compartiments intracellulaires. Le trafic vésiculaire atteint un équilibre coordonné dans le temps et l'espace malgré plusieurs modifications cellulaires dramatiques, comme le changement de morphologie lors de la migration ou de la division cellulaire.

En identifiant un nouveau régulateur de l'activité de Rab11, et en caractérisant la régulation entre Rip11 et 14-3-3, nos études adhèrent à cet effort d'identification des mécanismes moléculaires articulant le trafic vésiculaire. Le regroupement de l'ensemble des connaissances sur le trafic vésiculaire, incluant les résultats exposés dans cette thèse, permettra certainement un jour de modéliser les différentes routes du trafic vésiculaire. Ces connaissances sont importantes pour notre compréhension de la biologie cellulaire, mais aussi pour les pathologies touchées par des défauts de trafic vésiculaire, car très peu d'exemples de maladies reliées au transport vésiculaire peuvent être traitées de nos jours (De Matteis and Luini 2011).

## Bibliographie

Adams, R. R., A. A. Tavares, A. Salzberg, H. J. Bellen and D. M. Glover (1998). "pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis." Genes Dev **12**(10): 1483-1494.

Adari, H., D. R. Lowy, B. M. Willumsen, C. J. Der and F. McCormick (1988). "Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain." Science **240**(4851): 518-521.

Al-Hakim, A. K., O. Goransson, M. Deak, R. Toth, D. G. Campbell, N. A. Morrice, A. R. Prescott and D. R. Alessi (2005). "14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK." J Cell Sci **118**(Pt 23): 5661-5673.

Albertson, R., J. Cao, T. S. Hsieh and W. Sullivan (2008). "Vesicles and actin are targeted to the cleavage furrow via furrow microtubules and the central spindle." J Cell Biol **181**(5): 777-790.

Allaire, P. D., A. L. Marat, C. Dall'Armi, G. Di Paolo, P. S. McPherson and B. Ritter (2010). "The Connecdenn DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes." Mol Cell **37**(3): 370-382.

Allaire, P. D., P. S. McPherson and B. Ritter (2015). "Analysis of Connecdenn 1-3 (DENN1A-C) GEF Activity for Rab35." Methods Mol Biol **1298**: 217-231.

Almers, W. (1990). "Exocytosis." Annu Rev Physiol **52**: 607-624.

Andres, D. A., M. C. Seabra, M. S. Brown, S. A. Armstrong, T. E. Smeland, F. P. Cremers and J. L. Goldstein (1993). "cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein." Cell **73**(6): 1091-1099.

Aoh, Q. L., A. M. Castle, C. H. Hubbard, O. Katsumata and J. D. Castle (2009). "SCAMP3 negatively regulates epidermal growth factor receptor degradation and promotes receptor recycling." Mol Biol Cell **20**(6): 1816-1832.

Aoki, K. and M. Matsuda (2009). "Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors." Nature protocols **4**(11): 1623-1631.

Armstrong, S. A., M. C. Seabra, T. C. Sudhof, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1993). "cDNA cloning and expression of the alpha and beta subunits of rat Rab geranylgeranyl transferase." J Biol Chem **268**(16): 12221-12229.

Asano, E., H. Hasegawa, T. Hyodo, S. Ito, M. Maeda, D. Chen, M. Takahashi, M. Hamaguchi and T. Senga (2014). "SHCBP1 is required for midbody organization and cytokinesis completion." Cell Cycle **13**(17): 2744-2751.

Assaker, G., D. Ramel, S. K. Wculek, M. Gonzalez-Gaitan and G. Emery (2010). "Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(52): 22558-22563.

- Assaker, G., D. Ramel, S. K. Wculek, M. Gonzalez-Gaitan and G. Emery (2010). "Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(52): 22558-22563.
- Baetz, N. W. and J. R. Goldenring (2013). "Rab11-family interacting proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system." Molecular biology of the cell **24**(5): 643-658.
- Ballif, B. A., Z. Cao, D. Schwartz, K. L. Carraway, 3rd and S. P. Gygi (2006). "Identification of 14-3-3epsilon substrates from embryonic murine brain." J Proteome Res **5**(9): 2372-2379.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt and R. Schekman (1994). "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum." Cell **77**(6): 895-907.
- Barr, F. and D. G. Lambright (2010). "Rab GEFs and GAPs." Curr Opin Cell Biol **22**(4): 461-470.
- Bassi, Z. I., M. Audusseau, M. G. Riparbelli, G. Callaini and P. P. D'Avino (2013). "Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9782-9787.
- Ben El Kadhi, K., C. Roubinet, S. Solinet, G. Emery and S. Carreno (2011). "The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis." Curr Biol **21**(12): 1074-1079.
- Benton, R., I. M. Palacios and D. St Johnston (2002). "Drosophila 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation." Dev Cell **3**(5): 659-671.
- Benton, R. and D. St Johnston (2003). "Drosophila PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells." Cell **115**(6): 691-704.
- Bernards, A. (2003). "GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila." Biochim Biophys Acta **1603**(2): 47-82.
- Bhuin, T. and J. K. Roy (2014). "Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport." Exp Cell Res **328**(1): 1-19.
- Bhuin, T. and J. K. Roy (2015). "Rab11 in disease progression." Int J Mol Cell Med **4**(1): 1-8.
- Bianco, A., M. Poukkula, A. Cliffe, J. Mathieu, C. M. Luque, T. A. Fulga and P. Rorth (2007). "Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells." Nature **448**(7151): 362-365.
- Bogard, N., L. Lan, J. Xu and R. S. Cohen (2007). "Rab11 maintains connections between germline stem cells and niche cells in the Drosophila ovary." Development **134**(19): 3413-3418.
- Bohdanowicz, M. and S. Grinstein (2013). "Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis." Physiol Rev **93**(1): 69-106.

Boucrot, E. and T. Kirchhausen (2007). "Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7939-7944.

Brajenovic, M., G. Joberty, B. Kuster, T. Bouwmeester and G. Drewes (2004). "Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network." J Biol Chem **279**(13): 12804-12811.

Brodsky, F. M. (2012). "Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 309-336.

Brumby, A. M. and H. E. Richardson (2005). "Using Drosophila melanogaster to map human cancer pathways." Nature reviews. Cancer **5**(8): 626-639.

Bucci, C., R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack and M. Zerial (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." Cell **70**(5): 715-728.

Burd, C. G. and S. D. Emr (1998). "Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains." Mol Cell **2**(1): 157-162.

Burgess, R. W., D. L. Deitcher and T. L. Schwarz (1997). "The synaptic protein syntaxin1 is required for cellularization of Drosophila embryos." J Cell Biol **138**(4): 861-875.

Burgo, A., E. Sotirakis, M. C. Simmler, A. Verraes, C. Chamot, J. C. Simpson, L. Lanzetti, V. Proux-Gillardeaux and T. Galli (2009). "Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth." EMBO Rep **10**(10): 1117-1124.

Burke, J. E., A. J. Inglis, O. Perisic, G. R. Masson, S. H. McLaughlin, F. Rutaganira, K. M. Shokat and R. L. Williams (2014). "Structures of PI4KIIIbeta complexes show simultaneous recruitment of Rab11 and its effectors." Science **344**(6187): 1035-1038.

Cales, C., J. F. Hancock, C. J. Marshall and A. Hall (1988). "The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product." Nature **332**(6164): 548-551.

Cao, J., R. Albertson, B. Riggs, C. M. Field and W. Sullivan (2008). "Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization." The Journal of cell biology **182**(2): 301-313.

Cao, X., N. Ballew and C. Barlowe (1998). "Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins." EMBO J **17**(8): 2156-2165.

Capalbo, L., P. P. D'Avino, V. Archambault and D. M. Glover (2011). "Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(42): 17343-17348.

Carreno, S., I. Kouranti, E. S. Glusman, M. T. Fuller, A. Echard and F. Payre (2008). "Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells." J Cell Biol **180**(4): 739-746.

Casanova, J. E., X. Wang, R. Kumar, S. G. Bhartur, J. Navarre, J. E. Woodrum, Y. Altschuler, G. S. Ray and J. R. Goldenring (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." Molecular biology of the cell **10**(1): 47-61.



Castle, A. and D. Castle (2005). "Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3769-3780.

Chen, W., Y. Feng, D. Chen and A. Wandinger-Ness (1998). "Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor." Molecular biology of the cell **9**(11): 3241-3257.

Cheng, H., R. Sugiura, W. Wu, M. Fujita, Y. Lu, S. O. Sio, R. Kawai, K. Takegawa, H. Shuntoh and T. Kuno (2002). "Role of the Rab GTP-binding protein Ypt3 in the fission yeast exocytic pathway and its connection to calcineurin function." Mol Biol Cell **13**(8): 2963-2976.

Cheng, K. W., J. P. Lahad, W. L. Kuo, A. Lapuk, K. Yamada, N. Auersperg, J. Liu, K. Smith-McCune, K. H. Lu, D. Fishman, J. W. Gray and G. B. Mills (2004). "The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers." Nat Med **10**(11): 1251-1256.

Chotard, L., A. K. Mishra, M. A. Sylvain, S. Tuck, D. G. Lambright and C. E. Rocheleau (2010). "TBC-2 regulates RAB-5/RAB-7-mediated endosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biol Cell **21**(13): 2285-2296.

Christoforidis, S. and M. Zerial (2000). "Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography." Methods **20**(4): 403-410.

Chung, Y. C., W. C. Wei, S. H. Huang, C. M. Shih, C. P. Hsu, K. J. Chang and W. T. Chao (2014). "Rab11 regulates E-cadherin expression and induces cell transformation in colorectal carcinoma." BMC Cancer **14**: 587.

Cobrerros-Reguera, L., A. Fernandez-Minan, C. H. Fernandez-Espartero, H. Lopez-Schier, A. Gonzalez-Reyes and M. D. Martin-Bermudo (2010). "The Ste20 kinase misshapen is essential for the invasive behaviour of ovarian epithelial cells in *Drosophila*." EMBO Rep **11**(12): 943-949.

Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." Sci STKE **2004**(250): RE13.

Conner, S. D. and G. M. Wessel (1999). "Syntaxin is required for cell division." Mol Biol Cell **10**(8): 2735-2743.

Cote, J. F. and K. Vuori (2007). "GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways." Trends Cell Biol **17**(8): 383-393.

D'Avino, P. P., M. G. Giansanti and M. Petronczki (2015). "Cytokinesis in Animal Cells." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(4).

D'Avino, P. P., T. Takeda, L. Capalbo, W. Zhang, K. S. Lilley, E. D. Laue and D. M. Glover (2008). "Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site." J Cell Sci **121**(Pt 8): 1151-1158.

Dabbeek, J. T., S. L. Fatar, C. P. Dufresne and J. K. Cowell (2007). "The EVI5 TBC domain provides the GTPase-activating protein motif for RAB11." Oncogene **26**(19): 2804-2808.

- Dambournet, D., M. Machicoane, L. Chesneau, M. Sachse, M. Rocancourt, A. El Marjou, E. Formstecher, R. Salomon, B. Goud and A. Echard (2011). "Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis." Nat Cell Biol **13**(8): 981-988.
- Davey, J. R., S. J. Humphrey, J. R. Junutula, A. K. Mishra, D. G. Lambright, D. E. James and J. Stockli (2012). "TBC1D13 is a RAB35 specific GAP that plays an important role in GLUT4 trafficking in adipocytes." Traffic **13**(10): 1429-1441.
- de Graaf, P., W. T. Zwart, R. A. van Dijken, M. Deneka, T. K. Schulz, N. Geijsen, P. J. Coffey, B. M. Gadella, A. J. Verkleij, P. van der Sluijs and P. M. van Bergen en Henegouwen (2004). "Phosphatidylinositol 4-kinasebeta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex." Mol Biol Cell **15**(4): 2038-2047.
- De Matteis, M. A. and A. Luini (2011). "Mendelian disorders of membrane trafficking." N Engl J Med **365**(10): 927-938.
- Delprato, A. and D. G. Lambright (2007). "Structural basis for Rab GTPase activation by VPS9 domain exchange factors." Nat Struct Mol Biol **14**(5): 406-412.
- Delprato, A., E. Merithew and D. G. Lambright (2004). "Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5." Cell **118**(5): 607-617.
- Desclozeaux, M., J. Venturato, F. G. Wylie, J. G. Kay, S. R. Joseph, H. T. Le and J. L. Stow (2008). "Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **295**(2): C545-556.
- Diaz, E. and S. R. Pfeffer (1998). "TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking." Cell **93**(3): 433-443.
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman and B. J. Dickson (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila." Nature **448**(7150): 151-156.
- Dippold, H. C., M. M. Ng, S. E. Farber-Katz, S. K. Lee, M. L. Kerr, M. C. Peterman, R. Sim, P. A. Wiharto, K. A. Galbraith, S. Madhavarapu, G. J. Fuchs, T. Meerloo, M. G. Farquhar, H. Zhou and S. J. Field (2009). "GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding." Cell **139**(2): 337-351.
- Dirac-Svejstrup, A. B., T. Sumizawa and S. R. Pfeffer (1997). "Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI." EMBO J **16**(3): 465-472.
- Dollar, G., E. Struckhoff, J. Michaud and R. S. Cohen (2002). "Rab11 polarization of the Drosophila oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation." Development **129**(2): 517-526.

Donaldson, J. G., D. Finazzi and R. D. Klausner (1992). "Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein." *Nature* **360**(6402): 350-352.

Donaldson, J. G., R. A. Kahn, J. Lippincott-Schwartz and R. D. Klausner (1991). "Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein." *Science* **254**(5035): 1197-1199.

Dong, G., M. Medkova, P. Novick and K. M. Reinisch (2007). "A catalytic coiled coil: structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p." *Mol Cell* **25**(3): 455-462.

Doronkin, S., I. Djagaeva, M. E. Nagle, L. T. Reiter and T. N. Seagroves (2010). "Dose-dependent modulation of HIF-1alpha/sima controls the rate of cell migration and invasion in Drosophila ovary border cells." *Oncogene* **29**(8): 1123-1134.

Douglas, M. E., T. Davies, N. Joseph and M. Mishima (2010). "Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis." *Curr Biol* **20**(10): 927-933.

Drake, M. T., M. A. Downs and L. M. Traub (2000). "Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites." *J Biol Chem* **275**(9): 6479-6489.

Ducharme, N. A., C. M. Hales, L. A. Lapierre, A. J. Ham, A. Oztan, G. Apodaca and J. R. Goldenring (2006). "MARK2/EMK1/Par-1Balpha phosphorylation of Rab11-family interacting protein 2 is necessary for the timely establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells." *Molecular biology of the cell* **17**(8): 3625-3637.

Duchek, P. and P. Rorth (2001). "Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis." *Science* **291**(5501): 131-133.

Duchek, P., K. Somogyi, G. Jekely, S. Beccari and P. Rorth (2001). "Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor." *Cell* **107**(1): 17-26.

Dunn, K. W. and F. R. Maxfield (1992). "Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes." *J Cell Biol* **117**(2): 301-310.

Dyer, N., E. Rebollo, P. Dominguez, N. Elkhatib, P. Chavrier, L. Daviet, C. Gonzalez and M. Gonzalez-Gaitan (2007). "Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes." *Development* **134**(24): 4437-4447.

Eca Guimaraes de Araujo, M., I. Fialka and L. Huber (2010). "Endocytic Organelles: Methods for Preparation and Analysis." *eLS*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0002591.pub2]

Ellena, J. F., J. Moulthrop, J. Wu, M. Rauch, S. Jaysinghne, J. D. Castle and D. S. Cafiso (2004). "Membrane position of a basic aromatic peptide that sequesters phosphatidylinositol

4,5 bisphosphate determined by site-directed spin labeling and high-resolution NMR." Biophys J **87**(5): 3221-3233.

Emery, G., A. Hutterer, D. Berdnik, B. Mayer, F. Wirtz-Peitz, M. G. Gaitan and J. A. Knoblich (2005). "Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system." Cell **122**(5): 763-773.

Emoto, K., H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya and M. Umeda (2005). "Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis." J Biol Chem **280**(45): 37901-37907.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

Fehon, R. G., A. I. McClatchey and A. Bretscher (2010). "Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins." Nature reviews. Molecular cell biology **11**(4): 276-287.

Field, S. J., N. Madson, M. L. Kerr, K. A. Galbraith, C. E. Kennedy, M. Tahiliani, A. Wilkins and L. C. Cantley (2005). "PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis." Curr Biol **15**(15): 1407-1412.

Fielding, A. B., E. Schonteich, J. Matheson, G. Wilson, X. Yu, G. R. Hickson, S. Srivastava, S. A. Baldwin, R. Prekeris and G. W. Gould (2005). "Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis." The EMBO journal **24**(19): 3389-3399.

Fielding, A. B., E. Schonteich, J. Matheson, G. Wilson, X. Yu, G. R. Hickson, S. Srivastava, S. A. Baldwin, R. Prekeris and G. W. Gould (2005). "Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis." EMBO J **24**(19): 3389-3399.

Finger, F. P. and J. G. White (2002). "Fusion and fission: membrane trafficking in animal cytokinesis." Cell **108**(6): 727-730.

Franke, B., J. W. Akkerman and J. L. Bos (1997). "Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets." EMBO J **16**(2): 252-259.

Frasa, M. A., K. T. Koessmeier, M. R. Ahmadian and V. M. Braga (2012). "Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 67-73.

Freeman, S. A., V. Jaumouille, K. Choi, B. E. Hsu, H. S. Wong, L. Abraham, M. L. Graves, D. Coombs, C. D. Roskelley, R. Das, S. Grinstein and M. R. Gold (2015). "Toll-like receptor ligands sensitize B-cell receptor signalling by reducing actin-dependent spatial confinement of the receptor." Nat Commun **6**: 6168.

Frenette, P., E. Haines, M. Loloyan, M. Kinal, P. Pakarian and A. Piekny (2012). "An anillin-Ect2 complex stabilizes central spindle microtubules at the cortex during cytokinesis." PLoS One **7**(4): e34888.

Friedl, P. and D. Gilmour (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(7): 445-457.

- Fuchs, E., A. K. Haas, R. A. Spooner, S. Yoshimura, J. M. Lord and F. A. Barr (2007). "Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways." J Cell Biol **177**(6): 1133-1143.
- Fukuda, M. (2011). "TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab?" Biosci Rep **31**(3): 159-168.
- Fukui, K., T. Sasaki, K. Imazumi, Y. Matsuura, H. Nakanishi and Y. Takai (1997). "Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins." J Biol Chem **272**(8): 4655-4658.
- Gardino, A. K. and M. B. Yaffe (2011). "14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis." Semin Cell Dev Biol **22**(7): 688-695.
- Gary, R. and A. Bretscher (1995). "Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site." Mol Biol Cell **6**(8): 1061-1075.
- Giansanti, M. G., G. Belloni and M. Gatti (2007). "Rab11 is required for membrane trafficking and actomyosin ring constriction in meiotic cytokinesis of *Drosophila* males." Mol Biol Cell **18**(12): 5034-5047.
- Gibbs, J. B., I. S. Sigal, M. Poe and E. M. Scolnick (1984). "Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5704-5708.
- Gil, J. E., E. Kim, I. S. Kim, B. Ku, W. S. Park, B. H. Oh, S. H. Ryu, W. Cho and W. D. Heo (2012). "Phosphoinositides differentially regulate protrudin localization through the FYVE domain." J Biol Chem **287**(49): 41268-41276.
- Gillingham, A. K. and S. Munro (2007). "The small G proteins of the Arf family and their regulators." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 579-611.
- Gillingham, A. K., R. Sinka, I. L. Torres, K. S. Lilley and S. Munro (2014). "Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases." Dev Cell **31**(3): 358-373.
- Goldenring, J. R. and K. T. Nam (2011). "Rab25 as a tumour suppressor in colon carcinogenesis." Br J Cancer **104**(1): 33-36.
- Goldenring, J. R., K. R. Shen, H. D. Vaughan and I. M. Modlin (1993). "Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung." The Journal of biological chemistry **268**(25): 18419-18422.
- Goldenring, J. R., J. Smith, H. D. Vaughan, P. Cameron, W. Hawkins and J. Navarre (1996). "Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues." The American journal of physiology **270**(3 Pt 1): G515-525.
- Goldenring, J. R., C. J. Soroka, K. R. Shen, L. H. Tang, W. Rodriguez, H. D. Vaughan, S. A. Stoch and I. M. Modlin (1994). "Enrichment of rab11, a small GTP-binding protein, in gastric parietal cells." The American journal of physiology **267**(2 Pt 1): G187-194.
- Gorvel, J. P., P. Chavrier, M. Zerial and J. Gruenberg (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." Cell **64**(5): 915-925.

Goshima, G. and R. D. Vale (2003). "The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line." J Cell Biol **162**(6): 1003-1016.

Goss, J. W. and D. K. Toomre (2008). "Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis." J Cell Biol **181**(7): 1047-1054.

Green, R. A., E. Paluch and K. Oegema (2012). "Cytokinesis in animal cells." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 29-58.

Greenfield, J. P., L. W. Leung, D. Cai, K. Kaasik, R. S. Gross, E. Rodriguez-Boulan, P. Greengard and H. Xu (2002). "Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis." J Biol Chem **277**(14): 12128-12136.

Grinstein, M., R. Yelin, D. Herzlinger and T. M. Schultheiss (2013). "Generation of the podocyte and tubular components of an amniote kidney: timing of specification and a role for Wnt signaling." Development **140**(22): 4565-4573.

Gromley, A., C. Yeaman, J. Rosa, S. Redick, C. T. Chen, S. Mirabelle, M. Guha, J. Sillibourne and S. J. Doxsey (2005). "Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission." Cell **123**(1): 75-87.

Guichard, A., S. M. McGillivray, B. Cruz-Moreno, N. M. van Sorge, V. Nizet and E. Bier (2010). "Anthrax toxins cooperatively inhibit endocytic recycling by the Rab11/Sec15 exocyst." Nature **467**(7317): 854-858.

Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Muller-Reichert and D. W. Gerlich (2011). "Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments." Science **331**(6024): 1616-1620.

Haas, A. K., E. Fuchs, R. Kopajtich and F. A. Barr (2005). "A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking." Nat Cell Biol **7**(9): 887-893.

Hales, C. M., J. P. Vaerman and J. R. Goldenring (2002). "Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling." The Journal of biological chemistry **277**(52): 50415-50421.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hattula, K., J. Furuholm, A. Arffman and J. Peranen (2002). "A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport." Mol Biol Cell **13**(9): 3268-3280.

Heider, M. R. and M. Munson (2012). "Exorcising the exocyst complex." Traffic **13**(7): 898-907.

Hickson, G. R., J. Matheson, B. Riggs, V. H. Maier, A. B. Fielding, R. Prekeris, W. Sullivan, F. A. Barr and G. W. Gould (2003). "Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to *Drosophila* nuclear fallout." Molecular biology of the cell **14**(7): 2908-2920.

Horgan, C. P., S. R. Hanscom, R. S. Jolly, C. E. Futter and M. W. McCaffrey (2010). "Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment." J Cell Sci **123**(Pt 2): 181-191.

Horgan, C. P. and M. W. McCaffrey (2009). "The dynamic Rab11-FIPs." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 1032-1036.

Horiuchi, H., R. Lippe, H. M. McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann and M. Zerial (1997). "A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function." Cell **90**(6): 1149-1159.

Houalla, T., L. Shi, D. J. van Meyel and Y. Rao (2010). "Rab-mediated vesicular transport is required for neuronal positioning in the developing *Drosophila* visual system." Mol Brain **3**: 19.

Hsu, C., Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Gronborg, W. Mobius, J. Rhee, F. A. Barr and M. Simons (2010). "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C." J Cell Biol **189**(2): 223-232.

Hughes, S. M. (1983). "Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins?" FEBS Lett **164**(1): 1-8.

Hunziker, W., J. A. Whitney and I. Mellman (1992). "Brefeldin A and the endocytic pathway. Possible implications for membrane traffic and sorting." FEBS Lett **307**(1): 93-96.

Hutterer, A., M. Glotzer and M. Mishima (2009). "Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody." Curr Biol **19**(23): 2043-2049.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermode,

T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivinson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.

Ioannou, M. S., E. S. Bell, M. Girard, M. Chaineau, J. N. Hamlin, M. Daubaras, A. Monast, M. Park, L. Hodgson and P. S. McPherson (2015). "DENND2B activates Rab13 at the leading edge of migrating cells and promotes metastatic behavior." *J Cell Biol* **208**(5): 629-648.

Itoh, R. E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki and M. Matsuda (2002). "Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells." *Mol Cell Biol* **22**(18): 6582-6591.

Itoh, T., M. Satoh, E. Kanno and M. Fukuda (2006). "Screening for target Rabs of TBC (Treb2/Bub2/Cdc16) domain-containing proteins based on their Rab-binding activity." *Genes Cells* **11**(9): 1023-1037.

Jafar-Nejad, H., H. K. Andrews, M. Acar, V. Bayat, F. Wirtz-Peitz, S. Q. Mehta, J. A. Knoblich and H. J. Bellen (2005). "Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors." *Dev Cell* **9**(3): 351-363.

Jagoe, W. N., A. J. Lindsay, R. J. Read, A. J. McCoy, M. W. McCaffrey and A. R. Khan (2006). "Crystal structure of rab11 in complex with rab11 family interacting protein 2." *Structure* **14**(8): 1273-1283.

Jankovics, F., R. Sinka and M. Erdelyi (2001). "An interaction type of genetic screen reveals a role of the Rab11 gene in oskar mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte." *Genetics* **158**(3): 1177-1188.

Janssens, K., H. H. Sung and P. Rorth (2010). "Direct detection of guidance receptor activity during border cell migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(16): 7323-7328.



Jantsch-Plunger, V. and M. Glotzer (1999). "Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis." Curr Biol **9**(14): 738-745.

Jekely, G., H. H. Sung, C. M. Luque and P. Rorth (2005). "Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration." Dev Cell **9**(2): 197-207.

Jekely, G., H. H. Sung, C. M. Luque and P. Rorth (2005). "Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration." Developmental cell **9**(2): 197-207.

Jin, J., F. D. Smith, C. Stark, C. D. Wells, J. P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J. R. Woodgett, L. K. Langeberg, J. D. Scott and T. Pawson (2004). "Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization." Curr Biol **14**(16): 1436-1450.

Johnson, C., S. Crowther, M. J. Stafford, D. G. Campbell, R. Toth and C. MacKintosh (2010). "Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites." Biochem J **427**(1): 69-78.

Jones, S., R. J. Litt, C. J. Richardson and N. Segev (1995). "Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport." J Cell Biol **130**(5): 1051-1061.

Jones, S., C. Newman, F. Liu and N. Segev (2000). "The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32." Mol Biol Cell **11**(12): 4403-4411.

Joseph, N., A. Hutterer, I. Poser and M. Mishima (2012). "ARF6 GTPase protects the post-mitotic midbody from 14-3-3-mediated disintegration." EMBO J **31**(11): 2604-2614.

Kane, S., H. Sano, S. C. Liu, J. M. Asara, W. S. Lane, C. C. Garner and G. E. Lienhard (2002). "A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain." J Biol Chem **277**(25): 22115-22118.

Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima and M. Hoshino (2010). "Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking." Neuron **67**(4): 588-602.

Kechad, A., S. Jananji, Y. Ruella and G. R. Hickson (2012). "Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis." Curr Biol **22**(3): 197-203.

Kelly, E. E., C. P. Horgan and M. W. McCaffrey (2012). "Rab11 proteins in health and disease." Biochem Soc Trans **40**(6): 1360-1367.

Khosravi-Far, R., R. J. Lutz, A. D. Cox, L. Conroy, J. R. Bourne, M. Sinensky, W. E. Balch, J. E. Buss and C. J. Der (1991). "Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6264-6268.

Kim, J. H., A. Cho, H. Yin, D. A. Schafer, G. Mouneimne, K. J. Simpson, K. V. Nguyen, J. S. Brugge and D. J. Montell (2011). "Psdin, a conserved protein that regulates protrusion dynamics and cell migration." Genes & development **25**(7): 730-741.

Kimura, K., T. Tsuji, Y. Takada, T. Miki and S. Narumiya (2000). "Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation." J Biol Chem **275**(23): 17233-17236.

Kitano, M., M. Nakaya, T. Nakamura, S. Nagata and M. Matsuda (2008). "Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation." Nature **453**(7192): 241-245.

Knodler, A., S. Feng, J. Zhang, X. Zhang, A. Das, J. Peranen and W. Guo (2010). "Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6346-6351.

Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud and A. Echard (2006). "Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis." Curr Biol **16**(17): 1719-1725.

Kusakabe, M. and E. Nishida (2004). "The polarity-inducing kinase Par-1 controls *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC." EMBO J **23**(21): 4190-4201.

Kusumi, A., K. G. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie and T. K. Fujiwara (2011). "Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane." Trends Biochem Sci **36**(11): 604-615.

Laflamme, C., G. Assaker, D. Ramel, J. F. Dorn, D. She, P. S. Maddox and G. Emery (2012). "Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity." The Journal of cell biology **198**(1): 57-67.

Laflamme, C. and G. Emery (2015). "In Vitro and In Vivo Characterization of the Rab11-GAP Activity of *Drosophila* Evi5." Methods Mol Biol **1298**: 187-194.

Lai, F., L. Stubbs and K. Artzt (1994). "Molecular analysis of mouse Rab11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein." Genomics **22**(3): 610-616.

Langevin, J., M. J. Morgan, J. B. Sibarita, S. Aresta, M. Murthy, T. Schwarz, J. Camonis and Y. Bellaiche (2005). "*Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane." Dev Cell **9**(3): 365-376.

Lanzetti, L., V. Rybin, M. G. Malabarba, S. Christoforidis, G. Scita, M. Zerial and P. P. Di Fiore (2000). "The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5." Nature **408**(6810): 374-377.

Lapierre, L. A., K. M. Avant, C. M. Caldwell, A. Oztan, G. Apodaca, B. C. Knowles, J. T. Roland, N. A. Ducharme and J. R. Goldenring (2012). "Phosphorylation of Rab11-FIP2 regulates polarity in MDCK cells." Molecular biology of the cell **23**(12): 2302-2318.

Lapierre, L. A., R. Kumar, C. M. Hales, J. Navarre, S. G. Bhartur, J. O. Burnette, D. W. Provance, Jr., J. A. Mercer, M. Bahler and J. R. Goldenring (2001). "Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems." Molecular biology of the cell **12**(6): 1843-1857.

Lecuit, T. and E. Wieschaus (2000). "Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo." J Cell Biol **150**(4): 849-860.

- Legroux, L. and N. Arbour (2015). "Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story." *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman and P. Cosson (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." *Cell* **79**(7): 1199-1207.
- Li, B. X., A. K. Satoh and D. F. Ready (2007). "Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors." *J Cell Biol* **177**(4): 659-669.
- Li, D., A. Mangan, L. Cicchini, B. Margolis and R. Prekeris (2014). "FIP5 phosphorylation during mitosis regulates apical trafficking and lumenogenesis." *EMBO reports* **15**(4): 428-437.
- Li, X., E. Sapp, K. Chase, L. A. Comer-Tierney, N. Masso, J. Alexander, P. Reeves, K. B. Kegel, A. Valencia, M. Esteves, N. Aronin and M. DiFiglia (2009). "Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **36**(2): 374-383.
- Li, X., C. Standley, E. Sapp, A. Valencia, Z. H. Qin, K. B. Kegel, J. Yoder, L. A. Comer-Tierney, M. Esteves, K. Chase, J. Alexander, N. Masso, L. Sobin, K. Bellve, R. Tuft, L. Lifshitz, K. Fogarty, N. Aronin and M. DiFiglia (2009). "Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity." *Mol Cell Biol* **29**(22): 6106-6116.
- Lindsay, A. J., F. Jollivet, C. P. Horgan, A. R. Khan, G. Raposo, M. W. McCaffrey and B. Goud (2013). "Identification and characterization of multiple novel Rab-myosin Va interactions." *Mol Biol Cell* **24**(21): 3420-3434.
- Lindsay, A. J. and M. W. McCaffrey (2004). "The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane." *J Cell Sci* **117**(Pt 19): 4365-4375.
- Linford, A., S. Yoshimura, R. Nunes Bastos, L. Langemeyer, A. Gerondopoulos, D. J. Rigden and F. A. Barr (2012). "Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells." *Dev Cell* **22**(5): 952-966.
- Liu, D., J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu and R. Liddington (1995). "Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein." *Nature* **376**(6536): 191-194.
- Liu, J., G. D. Fairn, D. F. Ceccarelli, F. Sicheri and A. Wilde (2012). "Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin." *Curr Biol* **22**(1): 64-69.
- Lock, J. G. and J. L. Stow (2005). "Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1744-1755.
- Longatti, A., C. A. Lamb, M. Razi, S. Yoshimura, F. A. Barr and S. A. Tooze (2012). "TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes." *J Cell Biol* **197**(5): 659-675.
- Low, S. H., X. Li, M. Miura, N. Kudo, B. Quinones and T. Weimbs (2003). "Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells." *Dev Cell* **4**(5): 753-759.

- Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G. L. Johnson, K. M. Hahn and G. Danuser (2009). "Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion." Nature **461**(7260): 99-103.
- Mammoto, A., T. Ohtsuka, I. Hotta, T. Sasaki and Y. Takai (1999). "Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling." J Biol Chem **274**(36): 25517-25524.
- Marat, A. L. and P. S. McPherson (2010). "The connecdenn family, Rab35 guanine nucleotide exchange factors interfacing with the clathrin machinery." J Biol Chem **285**(14): 10627-10637.
- Maris, J. M., M. D. Hogarty, R. Bagatell and S. L. Cohn (2007). "Neuroblastoma." Lancet **369**(9579): 2106-2120.
- Martin, D., C. Pantoja, A. Fernandez Minan, C. Valdes-Quezada, E. Molto, F. Matesanz, O. Bogdanovic, E. de la Calle-Mustienes, O. Dominguez, L. Taher, M. Furlan-Magaril, A. Alcina, S. Canon, M. Fedetz, M. A. Blasco, P. S. Pereira, I. Ovcharenko, F. Recillas-Targa, L. Montoliu, M. Manzanares, R. Guigo, M. Serrano, F. Casares and J. L. Gomez-Skarmeta (2011). "Genome-wide CTCF distribution in vertebrates defines equivalent sites that aid the identification of disease-associated genes." Nat Struct Mol Biol **18**(6): 708-714.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita and S. Tsukita (1998). "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." J Cell Biol **140**(3): 647-657.
- Matsuzaki, F., M. Shirane, M. Matsumoto and K. I. Nakayama (2011). "Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation." Mol Biol Cell **22**(23): 4602-4620.
- Mazumdar, A. and M. Mazumdar (2002). "How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*." Bioessays **24**(11): 1012-1022.
- McDonald, J. A., E. M. Pinheiro, L. Kadlec, T. Schupbach and D. J. Montell (2006). "Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells." Developmental biology **296**(1): 94-103.
- McDonald, J. A., E. M. Pinheiro and D. J. Montell (2003). "PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman." Development **130**(15): 3469-3478.
- McLauchlan, H., J. Newell, N. Morrice, A. Osborne, M. West and E. Smythe (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." Curr Biol **8**(1): 34-45.
- Mishima, M., S. Kaitna and M. Glotzer (2002). "Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity." Dev Cell **2**(1): 41-54.
- Mishima, M., V. Pavicic, U. Gruneberg, E. A. Nigg and M. Glotzer (2004). "Cell cycle regulation of central spindle assembly." Nature **430**(7002): 908-913.

- Mishra, A. K. and D. G. Lambright (2015). "High-Throughput Assay for Profiling the Substrate Specificity of Rab GTPase-Activating Proteins." Methods Mol Biol **1298**: 47-60.
- Montell, D. J. (2003). "Border-cell migration: the race is on." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 13-24.
- Montell, D. J. (2008). "Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties." Science **322**(5907): 1502-1505.
- Montell, D. J., W. H. Yoon and M. Starz-Gaiano (2012). "Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells." Nature reviews. Molecular cell biology **13**(10): 631-645.
- Montembault, E., W. Zhang, M. R. Przewloka, V. Archambault, E. W. Sevin, E. D. Laue, D. M. Glover and P. P. D'Avino (2010). "Nessun Dorma, a novel centralspindlin partner, is required for cytokinesis in Drosophila spermatocytes." J Cell Biol **191**(7): 1351-1365.
- Morrison, H. A., H. Dionne, T. E. Rusten, A. Brech, W. W. Fisher, B. D. Pfeiffer, S. E. Celniker, H. Stenmark and D. Bilder (2008). "Regulation of early endosomal entry by the Drosophila tumor suppressors Rabenosyn and Vps45." Mol Biol Cell **19**(10): 4167-4176.
- Murphy, A. M. and D. J. Montell (1996). "Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis." The Journal of cell biology **133**(3): 617-630.
- Muslin, A. J., J. W. Tanner, P. M. Allen and A. S. Shaw (1996). "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine." Cell **84**(6): 889-897.
- Nagano, F., T. Sasaki, K. Fukui, T. Asakura, K. Imazumi and Y. Takai (1998). "Molecular cloning and characterization of the noncatalytic subunit of the Rab3 subfamily-specific GTPase-activating protein." J Biol Chem **273**(38): 24781-24785.
- Nakamura, F., M. R. Amieva and H. Furthmayr (1995). "Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets." J Biol Chem **270**(52): 31377-31385.
- Nielsen, E., S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. Miaczynska, F. Dewitte, M. Wilm, B. Hoflack and M. Zerial (2000). "Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain." J Cell Biol **151**(3): 601-612.
- Niewiadomska, P., D. Godt and U. Tepass (1999). "DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis." The Journal of cell biology **144**(3): 533-547.
- Niggli, V., C. Andreoli, C. Roy and P. Mangeat (1995). "Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin." FEBS Lett **376**(3): 172-176.
- Nishimura, Y. and S. Yonemura (2006). "Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis." J Cell Sci **119**(Pt 1): 104-114.
- Nishioka, T., M. A. Frohman, M. Matsuda and E. Kiyokawa (2010). "Heterogeneity of phosphatidic acid levels and distribution at the plasma membrane in living cells as visualized by a Foster resonance energy transfer (FRET) biosensor." J Biol Chem **285**(46): 35979-35987.

Nordmann, M., M. Cabrera, A. Perz, C. Brocker, C. Ostrowicz, S. Engelbrecht-Vandre and C. Ungermann (2010). "The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7." Curr Biol **20**(18): 1654-1659.

Nottingham, R. M., I. G. Ganley, F. A. Barr, D. G. Lambright and S. R. Pfeffer (2011). "RUTBC1 protein, a Rab9A effector that activates GTP hydrolysis by Rab32 and Rab33B proteins." J Biol Chem **286**(38): 33213-33222.

Nottingham, R. M., G. V. Pusapati, I. G. Ganley, F. A. Barr, D. G. Lambright and S. R. Pfeffer (2012). "RUTBC2 protein, a Rab9A effector and GTPase-activating protein for Rab36." J Biol Chem **287**(27): 22740-22748.

Novick, P. and M. Zerial (1997). "The diversity of Rab proteins in vesicle transport." Current opinion in cell biology **9**(4): 496-504.

Nurmi, S. M., C. G. Gahmberg and S. C. Fagerholm (2006). "14-3-3 proteins bind both filamin and alphaLbeta2 integrin in activated T cells." Ann N Y Acad Sci **1090**: 318-325.

Ortiz, D., M. Medkova, C. Walch-Solimena and P. Novick (2002). "Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast." J Cell Biol **157**(6): 1005-1015.

Palamidessi, A., E. Frittoli, M. Garre, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita and P. P. Di Fiore (2008). "Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration." Cell **134**(1): 135-147.

Pan, X., S. Eathiraj, M. Munson and D. G. Lambright (2006). "TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism." Nature **442**(7100): 303-306.

Pavicic-Kaltenbrunner, V., M. Mishima and M. Glotzer (2007). "Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex." Mol Biol Cell **18**(12): 4992-5003.

Pearse, B. M. (1976). "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1255-1259.

Pereira-Leal, J. B. and M. C. Seabra (2000). "The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily." J Mol Biol **301**(4): 1077-1087.

Pertz, O. and K. M. Hahn (2004). "Designing biosensors for Rho family proteins--deciphering the dynamics of Rho family GTPase activation in living cells." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1313-1318.

Pertz, O., L. Hodgson, R. L. Klemke and K. M. Hahn (2006). "Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells." Nature **440**(7087): 1069-1072.

Petosa, C., S. C. Masters, L. A. Bankston, J. Pohl, B. Wang, H. Fu and R. C. Liddington (1998). "14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove." J Biol Chem **273**(26): 16305-16310.

Piekny, A. J. and M. Glotzer (2008). "Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis." Curr Biol **18**(1): 30-36.

Pinheiro, E. M. and D. J. Montell (2004). "Requirement for Par-6 and Bazooka in *Drosophila* border cell migration." *Development* **131**(21): 5243-5251.

Polesello, C., I. Delon, P. Valenti, P. Ferrer and F. Payre (2002). "Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis." *Nature cell biology* **4**(10): 782-789.

Polevoy, G., H. C. Wei, R. Wong, Z. Szentpetery, Y. J. Kim, P. Goldbach, S. K. Steinbach, T. Balla and J. A. Brill (2009). "Dual roles for the *Drosophila* PI 4-kinase four wheel drive in localizing Rab11 during cytokinesis." *J Cell Biol* **187**(6): 847-858.

Port, F., H. M. Chen, T. Lee and S. L. Bullock (2014). "Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(29): E2967-2976.

Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial and A. Spang (2010). "Identification of the switch in early-to-late endosome transition." *Cell* **141**(3): 497-508.

Prasad, M., X. Wang, L. He and D. J. Montell (2011). "Border cell migration: a model system for live imaging and genetic analysis of collective cell movement." *Methods in molecular biology* **769**: 277-286.

Prekeris, R., J. M. Davies and R. H. Scheller (2001). "Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins." *The Journal of biological chemistry* **276**(42): 38966-38970.

Prekeris, R., J. Klumperman and R. H. Scheller (2000). "A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes." *Molecular cell* **6**(6): 1437-1448.

Prekeris, R., J. Klumperman and R. H. Scheller (2000). "A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes." *Mol Cell* **6**(6): 1437-1448.

Prigent, M., T. Dubois, G. Raposo, V. Derrien, D. Tenza, C. Rosse, J. Camonis and P. Chavrier (2003). "ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector." *J Cell Biol* **163**(5): 1111-1121.

Prokopenko, S. N., A. Brumby, L. O'Keefe, L. Prior, Y. He, R. Saint and H. J. Bellen (1999). "A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*." *Genes Dev* **13**(17): 2301-2314.

Pusapati, G. V., G. Luchetti and S. R. Pfeffer (2012). "Ric1-Rgp1 complex is a guanine nucleotide exchange factor for the late Golgi Rab6A GTPase and an effector of the medial Golgi Rab33B GTPase." *J Biol Chem* **287**(50): 42129-42137.

Pylypenko, O., W. Attanda, C. Gauquelin, M. Lahmani, D. Coulibaly, B. Baron, S. Hoos, M. A. Titus, P. England and A. M. Houdusse (2013). "Structural basis of myosin V Rab GTPase-dependent cargo recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(51): 20443-20448.

Rak, A., O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. S. Goody and K. Alexandrov (2003). "Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase." *Science* **302**(5645): 646-650.

Ramel, D., C. Laflamme, G. Assaker and G. Emery (2012). "La migration collective : la Drosophile montre la voie." Médecine Sciences Amérique **1**(4).

Ramel, D., X. Wang, C. Laflamme, D. J. Montell and G. Emery (2013). "Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements." Nature cell biology **15**(3): 317-324.

Ramjaun, A. R. and P. S. McPherson (1998). "Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites." J Neurochem **70**(6): 2369-2376.

Reczek, D., M. Berryman and A. Bretscher (1997). "Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family." J Cell Biol **139**(1): 169-179.

Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe (2013). "Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(9): 563-580.

Riggs, B., B. Fasulo, A. Royou, S. Mische, J. Cao, T. S. Hays and W. Sullivan (2007). "The concentration of Nuf, a Rab11 effector, at the microtubule-organizing center is cell cycle regulated, dynein-dependent, and coincides with furrow formation." Molecular biology of the cell **18**(9): 3313-3322.

Riggs, B., W. Rothwell, S. Mische, G. R. Hickson, J. Matheson, T. S. Hays, G. W. Gould and W. Sullivan (2003). "Actin cytoskeleton remodeling during early Drosophila furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11." The Journal of cell biology **163**(1): 143-154.

Riggs, B., W. Rothwell, S. Mische, G. R. Hickson, J. Matheson, T. S. Hays, G. W. Gould and W. Sullivan (2003). "Actin cytoskeleton remodeling during early Drosophila furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11." J Cell Biol **163**(1): 143-154.

Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis and M. Zerial (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-749.

Rivera-Molina, F. E. and P. J. Novick (2009). "A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14408-14413.

Roberts, T., O. Chernova and J. K. Cowell (1998). "NB4S, a member of the TBC1 domain family of genes, is truncated as a result of a constitutional t(1;10)(p22;q21) chromosome translocation in a patient with stage 4S neuroblastoma." Hum Mol Genet **7**(7): 1169-1178.

Robinett, C. C., M. G. Giansanti, M. Gatti and M. T. Fuller (2009). "TRAPPII is required for cleavage furrow ingression and localization of Rab11 in dividing male meiotic cells of Drosophila." J Cell Sci **122**(Pt 24): 4526-4534.

Roeth, J. F., J. K. Sawyer, D. A. Wilner and M. Peifer (2009). "Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the Drosophila embryonic ectoderm." PLoS One **4**(10): e7634.



- Rohde, G., D. Wenzel and V. Haucke (2002). "A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis." J Cell Biol **158**(2): 209-214.
- Rorth, P. (2002). "Initiating and guiding migration: lessons from border cells." Trends Cell Biol **12**(7): 325-331.
- Rorth, P. (2009). "Collective cell migration." Annual review of cell and developmental biology **25**: 407-429.
- Rosenquist, M., P. Sehnke, R. J. Ferl, M. Sommarin and C. Larsson (2000). "Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?" J Mol Evol **51**(5): 446-458.
- Roubinet, C., B. Decelle, G. Chicanne, J. F. Dorn, B. Payrastré, F. Payre and S. Carreno (2011). "Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis." The Journal of cell biology **195**(1): 99-112.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi and J. Blenis (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13489-13494.
- Rybin, V., O. Ullrich, M. Rubino, K. Alexandrov, I. Simon, M. C. Seabra, R. Goody and M. Zerial (1996). "GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion." Nature **383**(6597): 266-269.
- Sako, Y., A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi and A. Kusumi (1998). "Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton." J Cell Biol **140**(5): 1227-1240.
- Salminen, A. and P. J. Novick (1989). "The Sec15 protein responds to the function of the GTP binding protein, Sec4, to control vesicular traffic in yeast." J Cell Biol **109**(3): 1023-1036.
- Sano, H., S. Kane, E. Sano, C. P. Miinea, J. M. Asara, W. S. Lane, C. W. Garner and G. E. Lienhard (2003). "Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation." J Biol Chem **278**(17): 14599-14602.
- Sasamura, T., T. Kobayashi, S. Kojima, H. Qadota, Y. Ohya, I. Masai and Y. Hotta (1997). "Molecular cloning and characterization of Drosophila genes encoding small GTPases of the rab and rho families." Mol Gen Genet **254**(5): 486-494.
- Sato, N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita (1992). "A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites." J Cell Sci **103 ( Pt 1)**: 131-143.
- Schiefermeier, N., D. Teis and L. A. Huber (2011). "Endosomal signaling and cell migration." Current opinion in cell biology **23**(5): 615-620.
- Schiel, J. A., G. C. Simon, C. Zaharris, J. Weisz, D. Castle, C. C. Wu and R. Prekeris (2012). "FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis." Nat Cell Biol **14**(10): 1068-1078.

- Schuh, M. (2011). "An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport." Nat Cell Biol **13**(12): 1431-1436.
- Scita, G. and P. P. Di Fiore (2010). "The endocytic matrix." Nature **463**(7280): 464-473.
- Seabra, M. C., M. S. Brown, C. A. Slaughter, T. C. Sudhof and J. L. Goldstein (1992). "Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product." Cell **70**(6): 1049-1057.
- Sechi, S., G. Colotti, G. Belloni, V. Mattei, A. Frappaolo, G. D. Raffa, M. T. Fuller and M. G. Giansanti (2014). "GOLPH3 is essential for contractile ring formation and Rab11 localization to the cleavage site during cytokinesis in *Drosophila melanogaster*." PLoS Genet **10**(5): e1004305.
- Shandala, T., J. M. Woodcock, Y. Ng, L. Biggs, E. M. Skoulakis, D. A. Brooks and A. F. Lopez (2011). "*Drosophila* 14-3-3epsilon has a crucial role in anti-microbial peptide secretion and innate immunity." J Cell Sci **124**(Pt 13): 2165-2174.
- Shaye, D. D., J. Casanova and M. Llimargas (2008). "Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea." Nature cell biology **10**(8): 964-970.
- Shiba, T., H. Koga, H. W. Shin, M. Kawasaki, R. Kato, K. Nakayama and S. Wakatsuki (2006). "Structural basis for Rab11-dependent membrane recruitment of a family of Rab11-interacting protein 3 (FIP3)/Arfophilin-1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15416-15421.
- Shirane, M. and K. I. Nakayama (2006). "Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking." Science **314**(5800): 818-821.
- Silver, D. L. and D. J. Montell (2001). "Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*." Cell **107**(7): 831-841.
- Simon, G. C., E. Schonteich, C. C. Wu, A. Piekny, D. Ekiert, X. Yu, G. W. Gould, M. Glotzer and R. Prekeris (2008). "Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis." EMBO J **27**(13): 1791-1803.
- Sisson, J. C., C. Field, R. Ventura, A. Royou and W. Sullivan (2000). "Lava lamp, a novel peripheral golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization." J Cell Biol **151**(4): 905-918.
- Skop, A. R., D. Bergmann, W. A. Mohler and J. G. White (2001). "Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex." Curr Biol **11**(10): 735-746.
- Sogaard, M., K. Tani, R. R. Ye, S. Geromanos, P. Tempst, T. Kirchhausen, J. E. Rothman and T. Sollner (1994). "A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles." Cell **78**(6): 937-948.
- Soldati, T., M. A. Riederer and S. R. Pfeffer (1993). "Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein." Mol Biol Cell **4**(4): 425-434.
- Solinet, S., K. Mahmud, S. F. Stewman, K. Ben El Kadhi, B. Decelle, L. Talje, A. Ma, B. H. Kwok and S. Carreno (2013). "The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex." J Cell Biol **202**(2): 251-260.

Sollner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller and J. E. Rothman (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." Cell **75**(3): 409-418.

Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

Su, T., D. M. Bryant, F. Luton, M. Verges, S. M. Ulrich, K. C. Hansen, A. Datta, D. J. Eastburn, A. L. Burlingame, K. M. Shokat and K. E. Mostov (2010). "A kinase cascade leading to Rab11-FIP5 controls transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor." Nat Cell Biol **12**(12): 1143-1153.

Sudhof, T. C. and J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." Science **323**(5913): 474-477.

Suzuki, K., K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara and A. Kusumi (2005). "Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques." Biophys J **88**(5): 3659-3680.

Tan, S. X., Y. Ng, J. G. Burchfield, G. Ramm, D. G. Lambright, J. Stockli and D. E. James (2012). "The Rab GTPase-activating protein TBC1D4/AS160 contains an atypical phosphotyrosine-binding domain that interacts with plasma membrane phospholipids to facilitate GLUT4 trafficking in adipocytes." Mol Cell Biol **32**(24): 4946-4959.

Tatsumoto, T., X. Xie, R. Blumenthal, I. Okamoto and T. Miki (1999). "Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis." J Cell Biol **147**(5): 921-928.

Taylor, S. J. and D. Shalloway (1996). "Cell cycle-dependent activation of Ras." Curr Biol **6**(12): 1621-1627.

Thiery, J. P. (2009). "Metastasis: alone or together?" Curr Biol **19**(24): R1121-1123.

Tolliday, N., L. VerPlank and R. Li (2002). "Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis." Curr Biol **12**(21): 1864-1870.

Tomishige, M., Y. Sako and A. Kusumi (1998). "Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton." J Cell Biol **142**(4): 989-1000.

Treanor, B., D. Depoil, A. Bruckbauer and F. D. Batista (2011). "Dynamic cortical actin remodeling by ERM proteins controls BCR microcluster organization and integrity." J Exp Med **208**(5): 1055-1068.

Treanor, B., D. Depoil, A. Gonzalez-Granja, P. Barral, M. Weber, O. Dushek, A. Bruckbauer and F. D. Batista (2010). "The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor." Immunity **32**(2): 187-199.

Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial and R. G. Parton (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135**(4): 913-924.

Urbe, S., L. A. Huber, M. Zerial, S. A. Tooze and R. G. Parton (1993). "Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells." FEBS Lett **334**(2): 175-182.

Uytterhoeven, V., S. Kuenen, J. Kasprowitz, K. Miskiewicz and P. Verstreken (2011). "Loss of skywalker reveals synaptic endosomes as sorting stations for synaptic vesicle proteins." Cell **145**(1): 117-132.

van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud and I. Mellman (1992). "The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway." Cell **70**(5): 729-740.

Wan, P., D. Wang, J. Luo, D. Chu, H. Wang, L. Zhang and J. Chen (2013). "Guidance receptor promotes the asymmetric distribution of exocyst and recycling endosome during collective cell migration." Development **140**(23): 4797-4806.

Wang, X., L. He, Y. I. Wu, K. M. Hahn and D. J. Montell (2010). "Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo." Nat Cell Biol **12**(6): 591-597.

Wang, X., L. He, Y. I. Wu, K. M. Hahn and D. J. Montell (2010). "Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo." Nature cell biology **12**(6): 591-597.

Wang, Z., J. G. Edwards, N. Riley, D. W. Provance, Jr., R. Karcher, X. D. Li, I. G. Davison, M. Ikebe, J. A. Mercer, J. A. Kauer and M. D. Ehlers (2008). "Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity." Cell **135**(3): 535-548.

Ward, D. M., D. P. Hackenjos and J. Kaplan (1990). "Fusion of sequentially internalized vesicles in alveolar macrophages." J Cell Biol **110**(4): 1013-1022.

Welz, T., J. Wellbourne-Wood and E. Kerkhoff (2014). "Orchestration of cell surface proteins by Rab11." Trends Cell Biol **24**(7): 407-415.

Westlake, C. J., J. R. Junutula, G. C. Simon, M. Pilli, R. Prekeris, R. H. Scheller, P. K. Jackson and A. G. Eldridge (2007). "Identification of Rab11 as a small GTPase binding protein for the Evi5 oncogene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(4): 1236-1241.

Wilker, E. W., M. A. van Vugt, S. A. Artim, P. H. Huang, C. P. Petersen, H. C. Reinhardt, Y. Feng, P. A. Sharp, N. Sonenberg, F. M. White and M. B. Yaffe (2007). "14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis." Nature **446**(7133): 329-332.

Wilson, G. M., A. B. Fielding, G. C. Simon, X. Yu, P. D. Andrews, R. S. Hames, A. M. Frey, A. A. Peden, G. W. Gould and R. Prekeris (2005). "The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis." Mol Biol Cell **16**(2): 849-860.

Wilson, G. M., A. B. Fielding, G. C. Simon, X. Yu, P. D. Andrews, R. S. Hames, A. M. Frey, A. A. Peden, G. W. Gould and R. Prekeris (2005). "The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis." Molecular biology of the cell **16**(2): 849-860.

- Winter, J. F., S. Hopfner, K. Korn, B. O. Farnung, C. R. Bradshaw, G. Marsico, M. Volkmer, B. Habermann and M. Zerial (2012). "Caenorhabditis elegans screen reveals role of PAR-5 in RAB-11-recycling endosome positioning and apicobasal cell polarity." Nature cell biology **14**(7): 666-676.
- Wirtz-Peitz, F., T. Nishimura and J. A. Knoblich (2008). "Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization." Cell **135**(1): 161-173.
- Wolfman, A. and I. G. Macara (1990). "A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras." Science **248**(4951): 67-69.
- Wong, L. C. and P. Schedl (2006). "Dissection of Drosophila ovaries." J Vis Exp(1): 52.
- Wood, S. A., J. E. Park and W. J. Brown (1991). "Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes." Cell **67**(3): 591-600.
- Wu, S., S. Q. Mehta, F. Pichaud, H. J. Bellen and F. A. Quioco (2005). "Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo." Nature structural & molecular biology **12**(10): 879-885.
- Wu, S., S. Q. Mehta, F. Pichaud, H. J. Bellen and F. A. Quioco (2005). "Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo." Nat Struct Mol Biol **12**(10): 879-885.
- Wu, X., M. J. Bradley, Y. Cai, D. Kummel, E. M. De La Cruz, F. A. Barr and K. M. Reinisch (2011). "Insights regarding guanine nucleotide exchange from the structure of a DENN-domain protein complexed with its Rab GTPase substrate." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): 18672-18677.
- Wu, Y. I., X. Wang, L. He, D. Montell and K. M. Hahn (2011). "Spatiotemporal control of small GTPases with light using the LOV domain." Methods in enzymology **497**: 393-407.
- Xiong, B., V. Bayat, M. Jaiswal, K. Zhang, H. Sandoval, W. L. Charng, T. Li, G. David, L. Duraine, Y. Q. Lin, G. G. Neely, S. Yamamoto and H. J. Bellen (2012). "Crag is a GEF for Rab11 required for rhodopsin trafficking and maintenance of adult photoreceptor cells." PLoS Biol **10**(12): e1001438.
- Xu, J., L. Lan, N. Bogard, C. Mattione and R. S. Cohen (2011). "Rab11 is required for epithelial cell viability, terminal differentiation, and suppression of tumor-like growth in the Drosophila egg chamber." PLoS One **6**(5): e20180.
- Yamashiro, D. J., B. Tycko, S. R. Fluss and F. R. Maxfield (1984). "Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway." Cell **37**(3): 789-800.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2010). "Mechanisms of motility in metastasizing cells." Molecular cancer research : MCR **8**(5): 629-642.
- Yoshimura, S., J. Egerer, E. Fuchs, A. K. Haas and F. A. Barr (2007). "Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation." J Cell Biol **178**(3): 363-369.

- Yoshimura, S., A. Gerondopoulos, A. Linford, D. J. Rigden and F. A. Barr (2010). "Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors." J Cell Biol **191**(2): 367-381.
- Yoshimura, S., A. K. Haas and F. A. Barr (2008). "Analysis of Rab GTPase and GTPase-activating protein function at primary cilia." Methods in enzymology **439**: 353-364.
- Yoshimura, S., A. K. Haas and F. A. Barr (2008). "Analysis of Rab GTPase and GTPase-activating protein function at primary cilia." Methods Enzymol **439**: 353-364.
- Yuce, O., A. Piekny and M. Glotzer (2005). "An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA." J Cell Biol **170**(4): 571-582.
- Zeng, J., M. Ren, D. Gravotta, C. De Lemos-Chiarandini, M. Lui, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, G. Xu, T. H. Shen, T. Morimoto, M. Adesnik and D. D. Sabatini (1999). "Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferrin recycling." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2840-2845.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-117.
- Zhang, J., K. L. Schulze, P. R. Hiesinger, K. Suyama, S. Wang, M. Fish, M. Acar, R. A. Hoskins, H. J. Bellen and M. P. Scott (2007). "Thirty-one flavors of Drosophila rab proteins." Genetics **176**(2): 1307-1322.
- Zhang, X. M., S. Ellis, A. Sriratana, C. A. Mitchell and T. Rowe (2004). "Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells." J Biol Chem **279**(41): 43027-43034.
- Zhang, X. M., B. Walsh, C. A. Mitchell and T. Rowe (2005). "TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7." Biochem Biophys Res Commun **335**(1): 154-161.
- Zhao, J., C. L. Meyerkord, Y. Du, F. R. Khuri and H. Fu (2011). "14-3-3 proteins as potential therapeutic targets." Semin Cell Dev Biol **22**(7): 705-712.
- Zhao, W. M. and G. Fang (2005). "MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13158-13163.

# **Annexe I**

## CHAPITRE DE LIVRE

In Vitro and In Vivo Characterization of the Rab11-GAP Activity of  
Drosophila Evi5

*Rab GTPases: Methods and Protocols,*  
*Methods in Molecular Biology, 2015*

## **6. In Vitro and In Vivo Characterization of the Rab11-GAP Activity of Drosophila Evi5**

Carl Laflamme<sup>1</sup> and Gregory Emery<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) and Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7

Running head: *In vitro* and *in vivo* characterization of a Rab-GAP



## **Abstract**

Small GTPases of the Rab family are master regulators of vesicular trafficking. As such, they control the spatial distribution of various proteins, including proteins involved in cell signaling and the regulation of cell polarity. Misregulation of Rab proteins is associated with a large array of diseases. Surprisingly, the target of some key regulators of Rab proteins, including many GTPase activating protein (GAP) are still unknown. Identifying the target of a specific GAP requires the combination of both *in vitro* and *in vivo* experiments to avoid any misinterpretation. Here is described the methodology we used to characterize the Rab11-GAP activity of *Drosophila* Evi5. We first focus on the *in vitro* Rab11 effector pull down assay we developed, and then we detail the *in vivo* characterization of Rab11 activity during *Drosophila* border cell migration.

Key words :

GTPase activating protein, Rab, Evi5, Rab11,

## Introduction

Small GTPases of the Rab family promotes vesicle trafficking through their interaction with molecular motors and the initiation of the assembly of SNARE complexes. As every small GTPases, Rabs cycle between an active GTP bound state and an inactive GDP bound state. The transition between these states requires the interaction with helper proteins: GTPase activating proteins (GAPs) and GDP-GTP exchange factors (GEF). Whereas the GEF proteins activate small GTPases, GAPs accelerate the GTPase activity of Rabs, resulting in their inactivation (Figure 6.1). Here, we detail the methodology we used to characterize the Rab11-GAP activity of *Drosophila* Evi5, both *in vitro* and *in vivo* (Laflamme, Assaker et al. 2012).

*In vitro*, the activity of a small GTPase can be determined by different methods. Among these, the direct measure of the amount of phosphate cleaved by the couple Rab/GAP to be tested is the most quantitative (Yoshimura, Haas et al. 2008). However, it requires purifying full length Rab and GAP proteins, or the TBC domain (catalytic GAP domain) of the latter. Frequently GAPs are large proteins that become insoluble during the purification process. Since *Drosophila* Evi5 is precisely insoluble, we developed an effector pull down assay that is described here. This method does not require protein purification and is based on the interaction between the small GTPase studied and an effector. Effectors bind to specific Rab in their active confirmation. Effector pull down assays are commonly performed for different GTPases (Rho and Arfs GTPases), but has not been used systematically for Rab proteins. Here we measure the amount of Rip11, a member of the Rab11 family interacting protein (Rab11-FIP) (Prekeris, Klumperman et al. 2000), bound to Rab11 (Laflamme, Assaker et al. 2012). The expression of a GAP protein in cells should promote the GTPase activity, and hence the inactivation, of its target Rab. As a consequence, the GAP activity of Evi5 should decrease the quantity of Rip11 recovered after pull down of Rab11. Quantifying the amount of bound Rip11 in control condition or after the expression of Evi5 gives a valuable semi-quantitative indication of Rab11 activity. A catalytic dead form of the GAP protein is a powerful control to demonstrate that the effect of a particular GAP is indeed due to its ability to induce the GTPase activity of its target (Pan, Eathiraj et al. 2006).

Next we describe how to monitor Rab11 activity *in vivo*. Evaluating the GAP activity of a Rab-GAP in a physiological context using both gain- and loss-of-function increases significantly the confidence that a certain GAP indeed acts on a particular Rab. In our case, we used both phenotypical analysis of *Drosophila* border cell migration (not shown) and quantification of the distribution of the Rab11 effector Sec15 to demonstrate unambiguously that Evi5 acts as a Rab11-GAP during this particular migration. Briefly, we used the well characterized UAS/Gal4 system to express a GFP-fusion of the Rab11 effector Sec15 specifically in the border cell cluster (Assaker, Ramel et al. 2010). Sec15 is a member of the exocyst complex (Zhang, Ellis et al. 2004) and distribute in small punctae in a wild type situation. This distribution changes dramatically upon modulation of Rab11 activity. Indeed, expressing a GTP-locked (Rab11<sup>CA</sup>) or a GDP-locked (Rab11<sup>DN</sup>) form of Rab11 leads to larger or smaller GFP-Sec15 vesicles, respectively. Hence, the measure of the Sec15 vesicles can be used as an *in vivo* reporter for Rab11 activity.(Laflamme, Assaker et al. 2012). Accordingly, depleting the Rab11-GAP should increase the size of GFP-Sec15 vesicles through the accumulation of GTP-bound Rab11. Conversely overexpressing a Rab11-GAP should decrease the size of vesicles by promoting GTP hydrolysis. Since varying the expression level of Evi5 in border cells followed these predictions we concluded that indeed Evi5 acts as a Rab11-GAP. To describe very precisely the size of vesicles we combined confocal analysis with a segmentation analysis software (Laflamme, Assaker et al. 2012). We think that similar approaches could be used to define other potential Rab/GAP pairs.

## Material

### 1.1 Effector pull down using copper inducible stable cell lines components

1. *Drosophila* S2 cells. Schneider's medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin.
2. Copper solution: 10 ml of a 0.5M of CuSO<sub>4</sub>. Weight 1.25g of CuSO<sub>4</sub> in 10ml of water. Sterilize by filtration.
3. Nonidet P-40 lysis buffer: 20mM Tris, pH 8.0, 137mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, and 1mM EDTA, pH 8.0 with protease inhibitors. Prepare 1 liter of a 1M Tris pH 8 stock solution by adding 500ml of H<sub>2</sub>O in a 1L glass beaker. Weight 181,7g Tris and transfer to the beaker. Mix and adjust pH with HCl. Pour solution in a 1L cylinder and complete to 1L with water. Store at 4<sup>0</sup>C. Prepare 1L of a 0.5M EDTA pH 8 stock solution. Weight 186,12g of EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and transfer it to 800ml of H<sub>2</sub>O in a 1L glass beaker. Adjust pH using NaOH pellets or 10N NaOH. Complete the volume of the solution to 1liter with H<sub>2</sub>O.

### 1.2 *In vivo* Rab11-GAP assay component

1. Fly stocks used. For expression of different transgene specifically in border cells, the slbo-Gal4 driver was used, whereas c306-Gal4 was used to express Evi5 RNAi.: Slbo-Gal4/CyO; UAS-GFP-Sec15/TM3, c306-Gal4/FM7;; UAS-GFP-Sec15/TM3, UAS- Evi5-Cherry/TM3, UAS-Evi5(RNAi)/TM3, UAS-Rab11(CA)/TM3, UAS-Rab11(DN)/CyO, UAS-Rab4(DN)/TM3
  2. Fixing solution: PBS1X, 4% PFA, 0.3% triton.
  3. Alexa Fluor 555-labelled phalloidin to visualize F-actin.
  4. DAPI to stain nuclei.
3. Methods

## Methods

### 2.1 Characterisation of Evi5 GAP activity toward Rab11 *in vitro*

#### 2.1.1 Generation of GST-Rab11 inducible stable cell lines

1. Culture S2 cells in Schneider's medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin. Plate three 10cm cell culture dishes with  $10 \times 10^6$  S2 cells in 10ml of medium. The next day, transfect cells with one individual DNA construct: 1) GST-Rab11<sup>WT</sup>, 2) GST-Rab11<sup>CA</sup>, 3) a negative control plasmid. Each of the GST-Rab11 was cloned in the pMet-picoblast plasmid (see Note 1). Two days post transfection, add blasticidine for a final concentration of 20 ug/ml in each of the cell culture dish to induce selection. After few days, surviving cells contain the GST-Rab11/pMet-picoblast plasmid. Keep adding blasticidine while passing cells.

3. Optimize the concentration of copper (CuSO<sub>4</sub>) to be used which lead to strong and even GST-Rab11 protein expression between your cell populations. Plate a six 6-well with each of the GST-Rab11 stable cell lines. Treat cells with 1) 0.05mM 2) 0.1mM 3) 0.3mM 4) 0.5mM 5) 0.8mM and 6) 1.0mM for 24H. Lyse your cells and perform a Western blot to observe which copper treatment induced the wanted protein expression. In our hand, optimal copper concentration was 0.8mM for 24H for each of our GST-Rab11 cell lines (see Note2).

#### 2.1.2 Effector pull down assay

1. Plate three 10cm cell culture dishes of 1) GST-Rab11<sup>WT</sup> cells and 2) GST-Rab11<sup>CA</sup> with  $16 \times 10^6$  cells per dish. The next day (Day 1), transfect both cell lines with 1) control plasmid 2) HA-Evi5<sup>WT</sup> 3) HA-Evi5<sup>RA</sup>, and, in all case, with GFP-Rip11 (see Note3).

2. One day post-transfection (Day 2), cells are incubated with 0.8mM of CuSO<sub>4</sub> for 24h.

3. The next day (Day 3), cells are scrapped in their medium and transferred to 15ml canonical tubes on ice. Tubes are then centrifuged at 500rpm for 5 minutes. Remove the medium

carefully and add 1ml of Nonidet P-40 lysis buffer to the cell pellet. Transfer to 1.5ml tubes with repetitive pipetting up and down. Incubate on ice for 30 minutes for proper cell lysis.

4. Centrifuge at 13000rpm for 10 minutes at 4C to get rid of cell debris. Transfer supernatant to fresh 1.5ml tubes. Conserve 50µl of supernatant for later use (lysate control).

5. Add 50ul of 50% slurry of glutathione-Sepharose beads equilibrated in lysis buffer to protein lysates and rock for 4h at 4C. Centrifuge beads at 7000rpm for 30 seconds at room temperature. Wash beads with 1ml of lysis buffer and incubate on ice for 1 minute. Repeat the wash steps 4 times. Remove the last wash and add 4x loading buffer to the beads and to the lysate samples.

6. Total protein lysates or eluted proteins were resolved on an 8-10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immune detected using specific GFP, GST and HA antibodies (Figure 6.2)

## **2.2 Characterization of Evi5 GAP activity for Rab11 *in vivo***

### *2.2.1 Preparation of Drosophila ovaries to monitor Rab11 activity*

1. Cross *slbo-Gal4/CyO*, *UAS-GFP-Sec15/TM3* female with male of different genotype 1) *w1118* (control), 2) *UAS-Rab11<sup>DN</sup>*, 3) *UAS-Rab11<sup>CA</sup>*, 4) *UAS-Rab4<sup>DN</sup>* (negative control), 5) *UAS-mCherry:Evi5* and *c306-Gal4;;UAS-GFP-Sec15* female with 1) *UAS-Evi5(RNAi)* or 2) *UAS-Cherry(RNAi)* (control RNAi) males.

2. Keep Female progeny of the proper genotype for latter dissection. Put 8-10 females of 2-3 days old in fresh vials with dry yeast at the bottom. Store vials at 29C. Repeat this procedure for one more day.

3. Dissect female ovaries (Wong and Schedl 2006). Using sharp dissecting forceps, grab a female and hold it under PBS (in a small dissection pad). Pull off the tip of the abdomen and transfer the ovaries to a 200µl tube containing PBS. Transfer up to 10 pair of ovaries in the same tubes.

4. Remove PBS from the tube and add 200µl of fixing solution. Incubate for 20 minutes at room temperature. Wash three times with PBS. Incubate ovaries with PBS1X, 0.3% triton for 30 minutes.
5. Stain ovaries with DAPI (10µg/ml) and Alexa Fluor 555-labelled phalloidin (500x) for 1 hour under rotation. Protect tubes from light. Wash ovaries three times with PBS 0.3% triton and incubate the last wash for 30 minutes under rotation. Do a final wash with PBS only to remove any detergent.
6. Transfer ovaries to a microscopic slide. Gently tease apart the ovaries using forceps and make sure to spread as much as possible the ovariole (see Note 4). Remove all the PBS and add a 50µl drop of mounting media on the ovariole. Carefully add the coverslip on the top of the mounting media. Seal with nail polish as needed.

### *2.2.2 Imaging stage 9 egg chamber and vesicle analysis*

1. With a 60x objective, search for stage 9 egg chambers where border cells have just detached from the epithelium. Select the proper orientation, crop up to 3 times on the cluster and adjust the different parameters for optimal confocal images. Image all the different markers using adequate wave-lengths and filter sets. Scan the entire border cell cluster by using 0.5µm z-section. The depth of a cluster can be up to 30µm. Image at least 10 clusters for proper statistical measure (Figure 6.3).
2. Perform analysis of GFP-Sec15 vesicles volume using your favorite segmentation algorithm. Determine the number and the volume (or the surface) of the vesicles. Represent the distribution of the number of vesicles by their size or, alternatively, the mean volume size. Perform adequate statistical analyses.

## Notes

1. Rab11<sup>wt</sup> was first subcloned in pGEX-6P1 to introduce a GST tag in N-terminal. GST-Rab11<sup>wt</sup> was then clone in the pMet-picoblast plasmid. The pMet promoter is active in presence of copper, which allows inducible GST-Rab11 expression. The gene picoblast encodes for resistance to blasticidine. We next introduce mutation to create S25N (DN) and the Q90L (CA) in Rab11 using the Quickchange site-directed mutagenesis technology (Agilent).
2. You may have to use different copper concentration in your different cell lines to obtain even protein expression.
3. Evi5 was first subcloned in pDonor221 and transferred in pUAS<sub>t</sub>-Dest29 using the Gateway system (Invitrogen). pUAS<sub>t</sub>-Dest29 has a UAS promoter which requires GAL4 to be express. It is fused to GFP at his N-terminus. Evi5 Arg160 to Ala (Evi5<sup>RA</sup>) catalytic dead mutant was generated as before. Rip11 was cloned in the pAGW plasmid to express an N-terminal tagged version of Rip11 under the control of the actin promoter.
4. The ovariole needs to be properly separated to take proper images of isolated egg chambers.



## **Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (MOP 114899). G. Emery holds a Canada Research Chair (Tier II) in Vesicular Trafficking and Cell Signaling. CL is supported by a FRSQ scholar ship.

## Figure legends

### Figure 6.1: Scheme of the Rab regulatory cycle

Inactive Rabs bind GDP and their geranylgeranyl group at their C-terminus are masked through their interaction with GDI (GDP dissociation inhibitor). GEF proteins catalyse the release of GDP from the Rabs, thereby promoting the binding to GTP. Active GTP-bound Rabs are recruited to the surface of endomembranes where they interact to their specific effectors. GAP proteins accelerates the GTPase activity of the Rab, promoting their inactivation.

### Figure 6.2: Schematic representation and examples of results of the effector pull down assay

A) Schematic representation of the effector pull down assay. Overexpression of Evi5 leads to the inactivation of Rab11, leading to the dissociation of Rip11 from Rab11. As a consequence the amount of Rip11 recovered after Rab11 pull down is reduced.

B) Typical effector pull down assay. S2 cells are co-transfected with GST-Rab11<sup>wt</sup> (left) or GST-Rab11<sup>CA</sup> (right) together with GFP-Rip11 with or without Evi5. Pull down of Rab11 are performed and bound Rip11 are analysed by western blotting. Reduction of Rip11 recovered after GST-Rab11<sup>wt</sup> pull down when Evi5<sup>wt</sup> is express (lane 2) compared to a control situation (lane 1) or where Evi5<sup>RA</sup> is expressed (lane 3) indicates that Evi5 has a Rab11-GAP activity. Pull down of Rab11<sup>CA</sup> (lane 4 and 5) is used to control that the decrease of Rip11 binding to Rab11<sup>wt</sup> in the presence of Evi5<sup>wt</sup> is not caused by a steric effect. Indeed, expressing Evi5 does not cause a decrease in Rip11 binding to Rab11<sup>ca</sup>.

### Figure 6.3: Schematic representation and examples of results of the *in vivo* Rab11 assay

A) Schematic representation of the *in vivo* assay to determine Rab11 activity. Overexpression of Evi5 or Rab11<sup>DN</sup> leads to the inactivation of Rab11, decreasing the volume of GFP-Sec15 vesicles. Conversely, knocking down Evi5 or expressing Rab11<sup>CA</sup> leads to an increase in GFP-Sec15 vesicles volume.

B) Representative images showing GFP-Sec15 distribution in border cells in different conditions at the onset of migration.

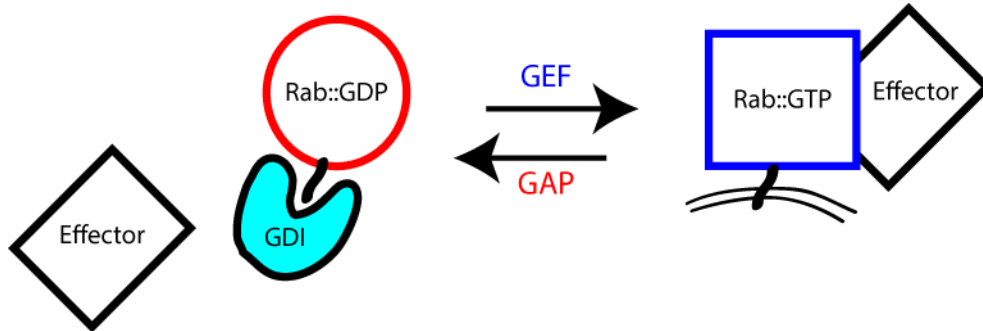


Figure 6.1 : Scheme of the Rab regulatory cycle

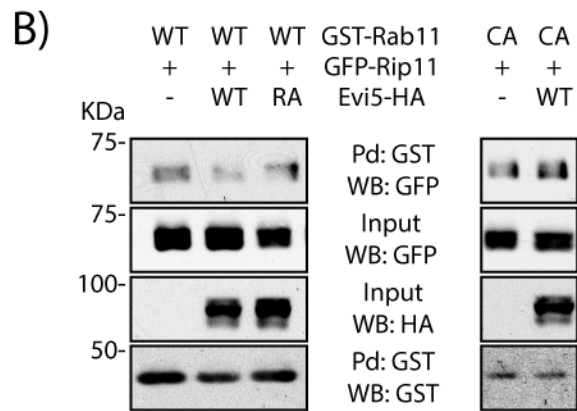
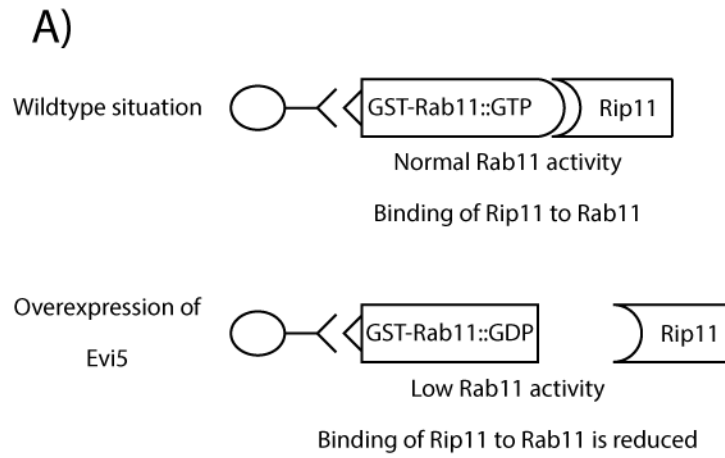


Figure 6.2 : Schematic representation and examples of results of the effector pull down assay

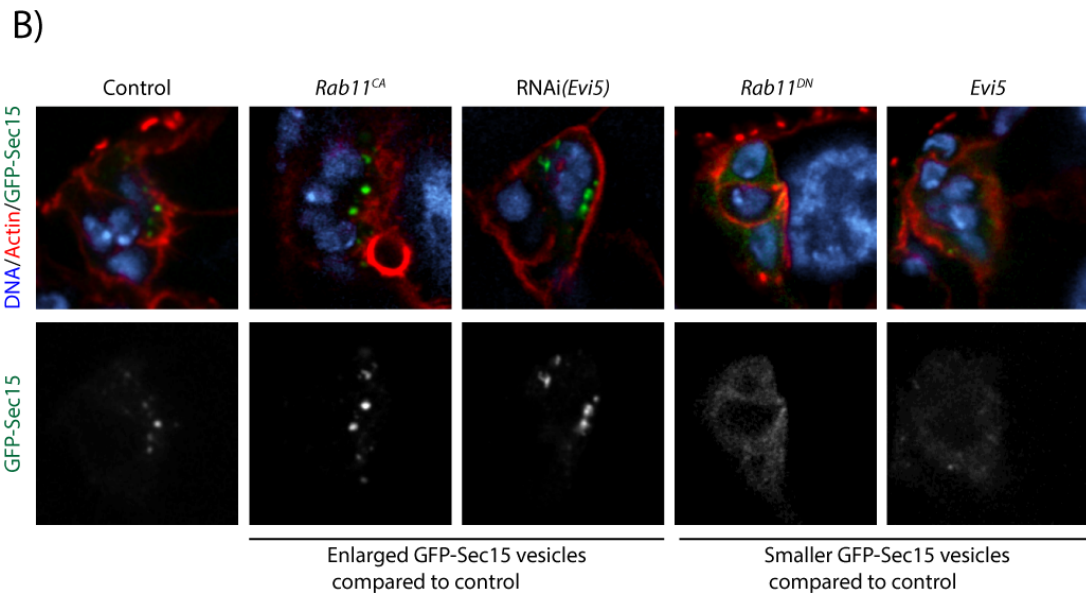
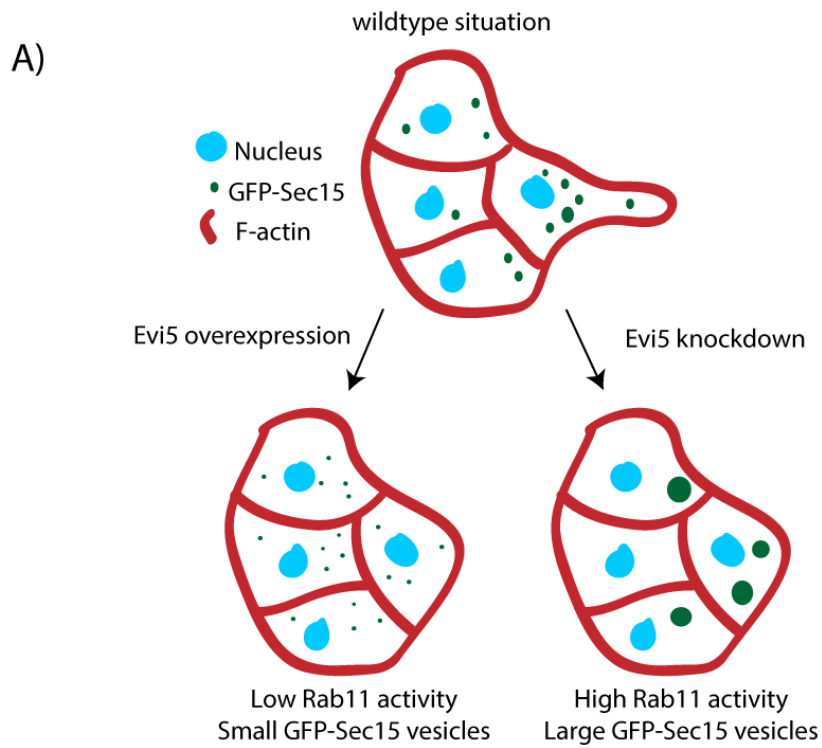


Figure 6.3 : Schematic representation and examples of results of the *in vivo* Rab11 assay

## **Annexe II**

Figures supplémentaires

## **7. Figures supplémentaires du chapitre 4**

Cette Annexe présente trois figures et un tableau concernant le projet sur l'interaction Rip11/14-3-3. Ces résultats n'ont pas été répétés (sauf ceux de la Figure 7.1 qui ont été répétés une fois) et demeurent préliminaires. Ces données sont discutées lors de la discussion (Chapitre 5).



## 7.1. Légendes des figures :

### Figure 7.1: 14-3-3 does not modulate the RBD aptitude to dimerize

(A) GFP::Rip11<sup>WT</sup>, GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup>, myc::Rip11<sup>WT</sup> and myc::Rip11<sup>TS/AA</sup> were expressed as GFP/myc pairs in S2 cells and their aptitude to dimerize was addressed by co-immunoprecipitation of myc::Rip11 using a myc antibody and bound GFP::Rip11 was analysed by western blotting using a GFP antibody.

(B) The same constructs as in (A) were expressed in pairs and their aptitude to dimerize was addressed by co-immunoprecipitation of GFP::Rip11 using a GFP antibody and bound myc::Rip11 was analysed by western blotting using myc antibody.

### Figure 7.2: Rip11 binds Rab35 and the Rab35/Rip11 interaction is modulated by 14-3-3 binding

myc::Rip11<sup>WT</sup>, myc::Rip11<sup>TS/AA</sup>, GST::Rab35<sup>CA</sup> and GST::Rab11<sup>WT</sup> were expressed as Rip11/Rab pairs in S2 cells as indicated. GST pulldown of Rab35 or Rab11 were performed using glutathione beads and bound myc::Rip11 proteins were analysed by western blotting using a myc antibody.

### Figure 7.3: Transmembrane protein Scamp is distributed at the midbody through Rip11 trafficking and could restrict PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> domain during cytokinesis

(A) Representative examples from mCherry::Scamp (red) S2 stable cell line treated with control or Rip11 dsRNAs. Immunostaining of endogenous Rip11 (violet),  $\alpha$ -tubulin (green) and staining for nucleus (blue) were performed. Grayscale images of Rip11, mCherry::Scamp and  $\alpha$ -tubulin are shown.

(B) Quantification of mCherry::Scamp or Rip11 fluorescence ratio at the midbody (F(m)) to the cortical pole region (F(p)) during both mid and late cytokinesis.

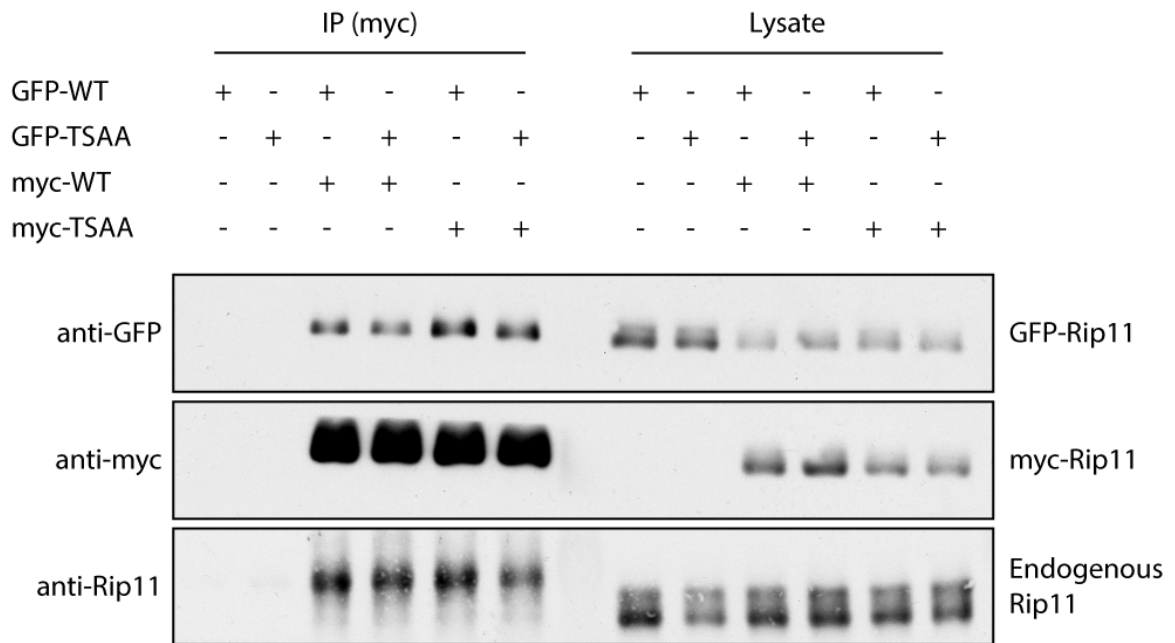
(C) Quantification of scamp mRNA by QPCR after ctrl or *scamp* knockdown

(D) Quantification of multinucleated S2 cells in *scamp* knockdown.

(E) Selected frames of representative dividing control or Rip11-depleted S2 cells stably expressing the PtdIns(4,5) $P_2$  probe GFP::tubby. Quantification of phenotype observed in control, Rip11 or Scamp knockdown are depicted in the table.

(F) Selected frames of representative dividing control or Rip11-depleted S2 cells stably expressing Anillin::mCherry and GFP::Sqh. Quantification of phenotype observed in control, Rip11 or Scamp knockdown are depicted in the table.

A)



B)

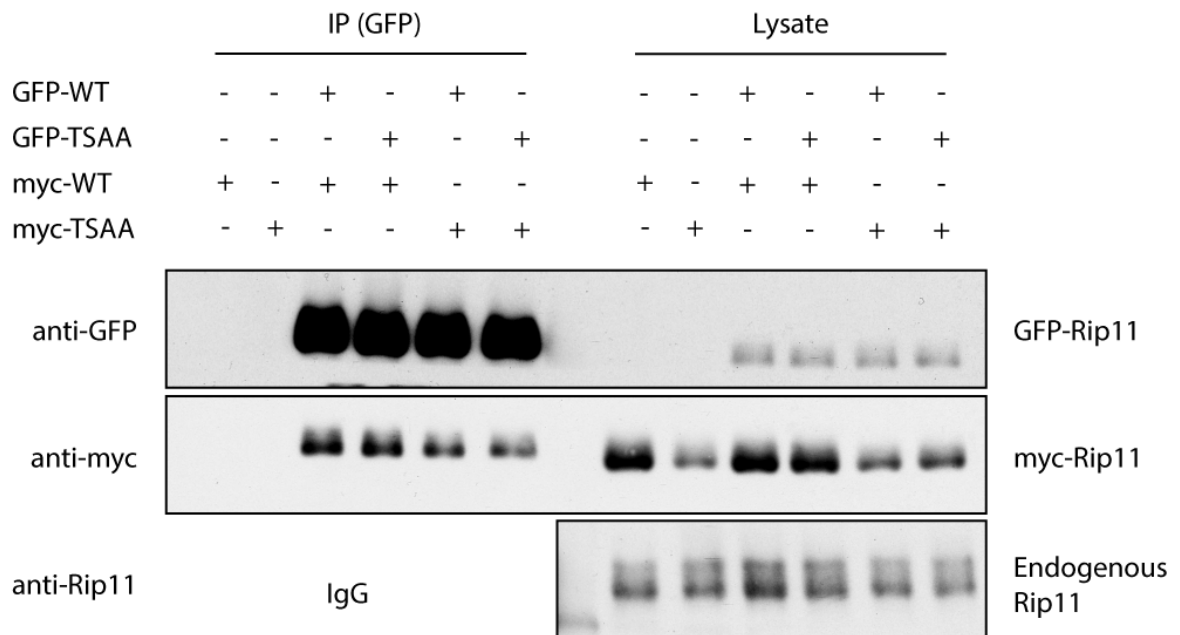


Figure 7.1 : 14-3-3 does not modulate the RBD aptitude to dimerize

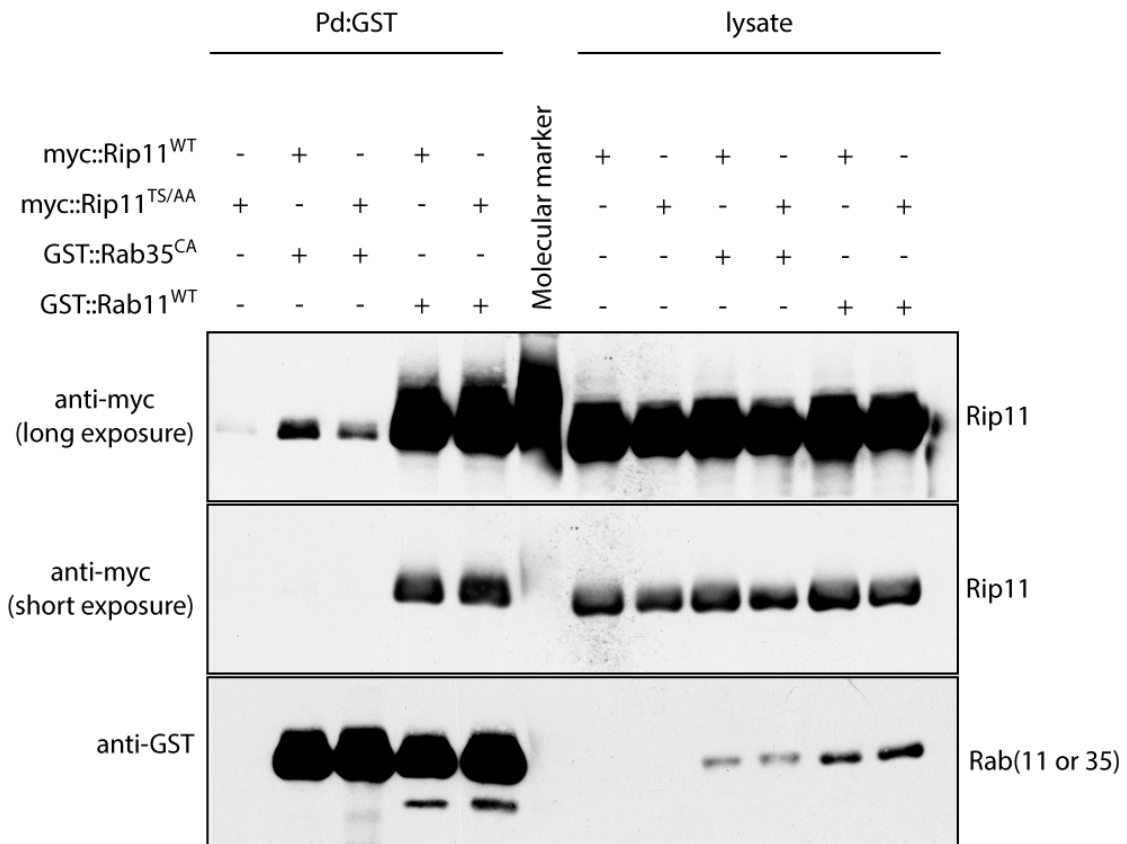


Figure 7.2 : Rip11 binds Rab35 and the Rab35/Rip11 interaction is modulated by 14-3-3 binding

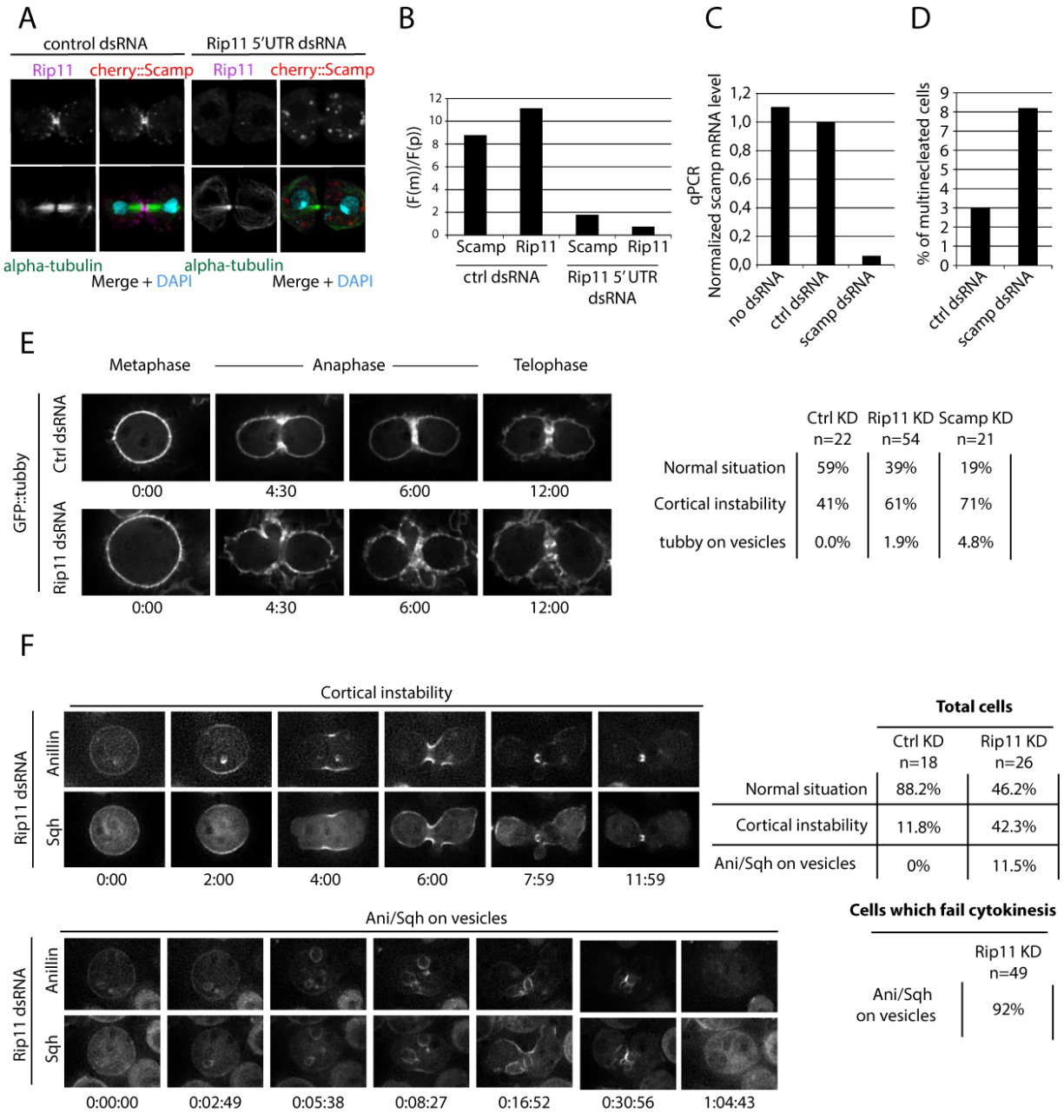


Figure 7.3 : Transmembrane protein Scamp is distributed at the *midbody* through Rip11 trafficking and could restrict PtdIns(4,5) $P_2$  domain during cytokinesis

Table 7.I : Identified Rip11-interacting-protein by immunoprecipitation. Numbers indicate the number of ms/ms spectrum observed for each identified proteins.

<b>Identified proteins</b>	<b>Ctrl IP myc</b>	<b>myc-Rip11(WT)</b>	<b>myc-Rip11(TSAA)</b>
<b>Rab11</b>	0	11	2
<b>14-3-3 epsilon</b>	0	15	0
<b>14-3-3 zeta</b>	0	3	0
<b>Clathrin heavy chain</b>	0	0	10
<b>Par-1</b>	0	0	3
<b>Nesd</b>	0	2	2
<b>Pavarotti</b>	0	0	1

