

Université de Montréal

**Effets cellulaires de l'activation de ligases de l'ubiquitine
par la protéine lysosomale LITAF**

par

Keivan Farzaneh

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Sciences Biologiques

Octobre, 2015

© Keivan Farzaneh, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Effets cellulaires de l'activation de ligases de l'ubiquitine
par la protéine lysosomale LITAF**

Présenté par :
Keivan Farzaneh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mario Cappadocia, président-rapporteur
Annie Angers, directrice de recherche
Sophie Breton, membre du jury

Résumé

LITAF (*lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor*), une protéine lysosomale, possède deux motifs PPXY capables d'interagir avec les domaines WW d'un sous-groupe spécifique de trois ligases de l'ubiquitine. Ces ligases sont impliquées dans l'ubiquitylation ainsi que la dégradation de diverses protéines cellulaires aux lysosomes et aux protéasomes. Les travaux menés dans le cadre de cette étude visaient à démontrer que LITAF active ces ligases et à déterminer les conséquences de cette activation sur les substrats de ces ligases. Pour y parvenir, des expériences d'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro* ont été menées en présence de LITAF ainsi que des ligases et des substrats appropriés. L'activation des ligases a été mesurée par leur taux d'autoubiquitylation et celle de leurs substrats par leur taux d'ubiquitylation et de dégradation. Les résultats obtenus montrent que l'activité des ligases est augmentée en présence de LITAF et que l'ubiquitylation et la dégradation des substrats de ces ligases sont partiellement augmentées. LITAF semble donc jouer un rôle de régulateur des ligases de l'ubiquitine. L'importance de ces résultats réside dans le fait que l'expression et la localisation intracellulaire de LITAF sont affectées dans plusieurs pathologies. Nos résultats amènent un éclairage nouveau sur le rôle physiologique de cette protéine et pourraient expliquer en partie comment l'altération de l'expression de LITAF affecte l'équilibre cellulaire.

Mots-clés : LITAF, ubiquitine, trafic endosomal, lysosome, ligase, Itch, Nedd4, WWP1, WWP2, Charcot-Marie-Tooth

Abstract

LITAF (*lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor*), a lysosomal protein, possesses two PPXY motifs which are able to interact with a specific subgroup comprised of three ubiquitin ligases. These ligases play a role in the ubiquitination and degradation of several cellular proteins in lysosomes and proteasomes. The aim of this study was to show that LITAF activates these ligases and to investigate the consequences of the activation of these ligases on their substrates. To do so, *in vivo* and *in vitro* ubiquitination assays were conducted in the presence of LITAF and the appropriate ligases and substrates. Activation of the ligases was measured by their self-ubiquitination rate and activation of their substrates was measured by their ubiquitination and degradation rates. Our results show that the activity of the ligases is increased in the presence of LITAF and that ubiquitination and degradation of the substrates are partially increased. Thus, LITAF might play a role in the regulation of ubiquitin ligases. The importance of these results lies in the fact that expression and intracellular localization of LITAF are affected in several pathologies. Our results bring new insights into the physiological role of this protein and could partly explain how the altered expression of LITAF affects cellular balance.

Keywords : LITAF, ubiquitin, endosomal trafficking, lysosome, ligase, Itch, Nedd4, WWP1, WWP2, Charcot-Marie-Tooth

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements	xv
1. Introduction.....	1
1.1. La protéine LITAF	1
1.1.1. Expression et rôle de LITAF	1
1.1.2. LITAF est impliqué dans le syndrome de Charcot-Marie-Tooth	3
1.1.3. Localisation cellulaire de LITAF	5
1.2. Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4	13
1.2.1. Caractéristiques des ligases et ubiquitylation.....	13
1.2.2. Itch	13
1.2.3. Évolution et comparaison des ligases.....	18
1.3. Régulation des ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4.....	20
1.3.1. Régulation des ligases au niveau transcriptionnel.....	20
1.3.2. Régulation des ligases par autoinhibition.....	22
1.3.3. Régulation des ligases par liaison des domaines WW.....	23
1.4. Problématique, objectifs et hypothèses.....	28
2. Méthodologie	30
2.1. Expériences d'ubiquitylation <i>in vivo</i>	30
2.1.1. Purification des plasmides	30
2.1.2. Expression et rôle de LITAF	32
2.1.3. Lavage et quantification des protéines de fusion	33
2.1.4. Transfection cellulaire	34
2.1.5. Extraction cellulaire	34
2.1.6. Migration, transfert de gel sur membrane et immunobuvardage.....	35
2.1.7. Interaction entre Itch, Nedd4, WWP1, WWP2 et LITAF WT et LITAF 2Y.....	38
2.1.8. Taux de dégradation de Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline en présence de LITAF WT, LITAF 2Y et du MG132.....	39
2.1.9. Autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2 suite à leur surexpression et à celle de l'ubiquitine, en présence de LITAF WT.....	39
2.1.10. Autoubiquitylation de Itch et Nedd4 présents à des niveaux endogènes, ainsi que de l'endophiline, en présence de LITAF WT ou LITAF 2Y	40
2.2. Expériences d'ubiquitylation <i>in vitro</i>	40
2.2.1. Expression des protéines d'intérêt.....	41

2.2.2. Purification des protéines d'intérêt	41
2.2.3. Réactions d'ubiquitylation <i>in vitro</i>	42
3. Résultats.....	43
3.1. Expériences <i>in vivo</i>	43
3.1.1. Interaction entre LITAF et différentes ligases de la famille Nedd4	43
3.1.2. LITAF induit la dégradation spécifique des protéines Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline.....	44
3.1.3. LITAF cause l'autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2	47
3.1.4. LITAF cause l'ubiquitylation de Itch, Nedd4 et de l'endophiline présents à des niveaux endogènes	48
3.2. Expériences <i>in vitro</i>	53
3.2.1. Influence de LITAF sur l'autoubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de c-Jun et de l'endophiline.....	53
4. Discussion	58
4.1. LITAF augmente l'activité autocatalytique des ligases de la famille Nedd4	58
4.1.1. Autoubiquitylation de Itch en présence de LITAF.....	58
4.1.2. Comparaison avec Nedd4, WWP1 et WWP2	60
4.1.3. Comparaison avec les autres activateurs	63
4.2. LITAF et son influence sur la dégradation des substrats de Itch	65
4.2.1. LITAF active la dégradation de c-Jun via Itch : impacts de la régulation du substrat	
4.2.2. LITAF ne semble pas activer la dégradation de l'endophiline via Itch	66
4.3. Implication de LITAF et Itch dans le syndrome de Charcot-Marie-Tooth.....	68
5. Conclusion et perspectives	70
6. Références.....	72

Liste des figures

- Figure 1. Schéma de LITAF.** L'extrémité N-terminale de LITAF contient des domaines proline pouvant lier diverses protéines comme les ligases de l'ubiquitine Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) et Itch, ainsi que l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine TSG101. La portion C-terminale est riche en cystéines et contient un domaine hautement conservé, le domaine SLD.2
- Figure 2. Localisation cellulaire de LITAF recombinant.** Des cellules rénales de singe vert (*Buffalo green monkey kidney cells*; BGMK) ont été transfectées avec LITAF et la localisation de la protéine a pu être détectée par microscopie à fluorescence. Le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. La superposition de LITAF avec le LysoTracker montre une localisation complète de LITAF recombinant avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton *et al.* (2012).6
- Figure 3. Localisation cellulaire de LITAF endogène.** Des cellules BGMK ont été visualisées par microscopie à fluorescence. La vimentine a été utilisée pour marquer les agrésomes. La superposition de LITAF avec la vimentine montre une localisation complète de LITAF endogène avec les agrésomes. Tiré de Eaton *et al.* (2012).6
- Figure 4. Localisation cellulaire de deux mutants de LITAF liés au syndrome de Charcot-Marie-Tooth.** Des cellules de neuroblastome humain LAN-5 ont été transfectées avec LITAF WT (*LITAF wild-type*; LITAF sauvage) et les mutants T49M et G112S. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le CD63 a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs et le MitoTRACKER a été utilisé pour marquer les mitochondries. Par superposition, on peut voir que LITAF WT colocalise complètement avec les lysosomes et les endosomes tardifs, alors que le mutant T49M colocalise partiellement avec les mitochondries et les lysosomes et endosomes tardifs. Le mutant G112S colocalise avec les mitochondries. Tiré de Lacerda *et al.* (2014).7
- Figure 5. Localisation cellulaire de la protéine FV3 75L.** Des cellules BGMK ont été transfectées avec 75L. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que 75L colocalise complètement avec les endosomes précoces, mais pas avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton *et al.* (2013). 11
- Figure 6. Localisation cellulaire des protéines LITAF et FV3 75L lorsque cotransfectées.** Des cellules BGMK ont été cotransfectées avec LITAF et 75L. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que LITAF et 75L colocalisent avec les endosomes tardifs et les lysosomes, et non avec endosomes précoces. Tiré de Eaton *et al.* (2013). 12
- Figure 7. Localisation cellulaire du mutant LITAF Y23,61A et FV3 75L lorsque cotransfectés.** Des cellules BGMK ont été cotransfectées avec un mutant de LITAF ayant ses motifs PPXY mutés, LITAF Y23,61A, et 75L. Les cellules ont été regardées par

microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que LITAF et 75L colocalisent avec les endosomes précoces, et non avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Tiré de Eaton <i>et al.</i> (2013).....	12
Figure 8. Schéma de Itch. L'extrémité N-terminale de Itch contient un domaine de liaison au calcium et aux lipides (domaine C2). On retrouve un domaine PRD pouvant lier les protéines à domaine SH3 et 4 domaines WW pouvant lier les motifs PPXY de diverses protéines. L'extrémité C-terminale de Itch contient un domaine catalytique HECT permettant de lier l'ubiquitine.....	14
Figure 9. Comparaison structurelle entre les différentes ligases de la famille Nedd4 chez l'humain, la souris, la levure et la drosophile. Itch possède davantage de similitudes avec WWP1 et WWP2 qu'avec Nedd4. L'humain et la souris sont représentés en noir, la levure en rouge et la drosophile en bleu. Tiré de Bernassola <i>et al.</i> (2008).	19
Figure 10. Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4 prennent une conformation active après interaction avec une protéine activatrice. La liaison d'une ligase de l'ubiquitine de la famille Nedd4 à une protéine activatrice cause un changement de conformation de la ligase et permet la libération de son domaine HECT. La ligase pourra ainsi ubiquityler ses substrats et s'autoubiquityler elle-même. Tiré de Mund <i>et al.</i> (2009).	23
Figure 11. Interaction entre Itch et LITAF. L'interaction entre Itch (en haut) et LITAF (en bas) se fait via les domaines WW de Itch et les motifs PPXY de LITAF.....	25
Figure 12. Localisation cellulaire de Itch. Des cellules BGМК ont été transfectées avec Itch. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le IGF-IIR (<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>) a été utilisé pour marquer le trans-golgi et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que Itch colocalise avec le trans-golgi, mais pas avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton <i>et al.</i> (2011).	26
Figure 13. Localisation cellulaire de Itch lorsque cotransfecté avec LITAF. Des cellules BGМК ont été cotransfectées avec LITAF et Itch. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le IGF-IIR a été utilisé pour marquer le trans-golgi et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que Itch, lorsque cotransfecté avec LITAF, colocalise avec les lysosomes et les endosomes tardifs, mais pas avec le trans-golgi. Tiré de Eaton <i>et al.</i> (2011).	27
Figure 14. Montage de transfert de gel sur membrane de nitrocellulose. La migration des protéines se fait du gel vers la membrane, soit de la cathode (-) vers l'anode (+).....	36
Figure 15. Interaction entre Itch, Nedd4, WWP1, WWP2 et LITAF WT et LITAF 2Y. Le panneau du haut montre les protéines de fusion YFP récupérées par les billes liées à GST-LITAF WT. Le panneau du milieu montre qu'aucune des fusions YFP n'est récupérée par le mutant GST-LITAF 2Y. Le panneau du bas montre le niveau d'expression des fusions YFP dans les lysats cellulaires. IB : immunoblot. (Guillaume Desrochers, communication personnelle).....	44
Figure 16. Taux de dégradation de Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline en présence de LITAF WT, LITAF 2Y et du MG132. Première colonne : résultats après une incubation de 2h avec inhibiteurs de protéases; deuxième colonne : résultats après une incubation de 2h sans inhibiteurs; troisième colonne : résultats après une incubation d'une nuit entière	

avec inhibiteurs; quatrième colonne : résultats après une incubation d'une nuit entière sans inhibiteurs. ON : <i>overnight</i> (incubation prolongée). (Guillaume Desrochers, communication personnelle).....	46
Figure 17. Autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2 suite à leur surexpression et à celle de l'ubiquitine, en présence de LITAF WT. Première rangée : autoubiquitylation des ligases en présence ou en absence de FLAG-LITAF WT; deuxième rangée : quantité de FLAG-LITAF WT dans le lysat cellulaire; troisième rangée : présence ou absence de FLAG-LITAF WT. CL : <i>cell lysate</i> (lysat cellulaire). (Guillaume Desrochers, communication personnelle).....	48
Figure 18. Autoubiquitylation de Itch présent à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : <i>standard material</i> (lysat cellulaire).	49
Figure 19. Autoubiquitylation de Nedd4 présent à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : <i>standard material</i> (lysat cellulaire).	50
Figure 20. Ubiquitylation de l'endophiline présente à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : <i>standard material</i> (lysat cellulaire). Les panneaux du bas sont les mêmes que pour la Figure 18, car il s'agit de la même expérience.	52
Figure 21. Influence de LITAF WT et LITAF 2Y sur l'autoubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de c-Jun et de l'endophiline <i>in vitro</i>. Le panneau A représente l'autoubiquitylation de Itch, la panneau B représente l'ubiquitylation de c-Jun et le panneau C représente l'ubiquitylation de l'endophiline. Ub : ubiquitine. (Annie Angers et Claire Gazaille, communication personnelle).....	56
Figure 22. Analyse densitométrique des résultats d'ubiquitylation de Itch, de c-Jun et de l'endophiline sous l'influence de LITAF WT et LITAF 2Y <i>in vitro</i>. La quantité d'ubiquitylation provoquée par LITAF WT est en vert et la quantité d'ubiquitylation provoquée par LITAF 2Y est en violet. Le contrôle est en rouge. (Annie Angers et Claire Gazaille, communication personnelle).	57

Liste des tableaux

TABLEAU I. Anticorps primaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage.....	38
TABLEAU II. Anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage	38
TABLEAU III. Conditions testées pour les réactions d'ubiquitylation <i>in vitro</i>	42

Liste des abréviations

BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BFA	Bréfeldine A
BGMK	Buffalo green monkey kidney cells
β ME	Bêta-mercaptoéthanol
BSA	Bovine serum albumin
c-FLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
CCS	Cosmic calf serum
CL	Cell lysate
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CMT1C	Charcot-Marie-Tooth type 1C
CMT2	Charcot-Marie-Tooth type 2
EEA1	Early endosome antigen 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMPD	Extramammary Paget disease
ENaC	Epithelial sodium channel
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FV3	Frog Virus 3
GFP	Green fluorescent protein
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathione S-transferase
HEK-293T	Human embryonic kidney 293T cells
HBS	HEPES buffered saline

HRS	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
IB	Immunoblot
ICD	Intracellular domain
IgG	Immunoglobuline G
IgG1	Immunoglobuline G1
IgE	Immunoglobuline E
IGF-IIR	Insulin-like growth factor 2 receptor
IL-4	Interleukine 4
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JNK	c-Jun N-terminal protein kinase
JNK2	c-Jun N-terminal protein kinase 2
LITAF	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor
LB	Lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharides
LSB	Loading sample buffer
N4BP1	Nedd4-binding protein 1
NDFIP1/2	Nedd4 family-interacting protein 1/2
Nedd4	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
ON	Overnight
PBS	Phosphate buffered saline
PIG-7	p53 inducible gene-7
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRD	Proline-rich domain

PTB	Phosphotyrosine-binding domain
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RING	Really interesting new gene
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIMPLE	Small integral membrane protein of the lysosome/late endosome
SH3	Src homology 3 domain
SLD	SIMPLE-like domain
SM	Standard material
STAM-UIM	Signal transducing adaptor molecule ubiquitin interacting motif
STAM1	Signal transducing adaptor molecule 1
TBS	Tris-buffered saline
T _H 1	T-helper 1 cells
T _H 2	T-helper 2 cells
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like receptors
TMD	Transmembrane domain
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TSG101	Tumor suppressor gene 101
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
Ub	Ubiquitine
UIM	Ubiquitin interacting motif

WT	Wild-type (sauvage)
WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
WWP2	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
YFP	Yellow fluorescent protein

Remerciements

Je souhaite remercier ma directrice de recherche, Annie Angers, pour ses précieux conseils et son soutien dans la réalisation de mon projet de maîtrise. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions, de m'avoir apporté tant de connaissances et de m'avoir aidé dans l'élaboration de mon projet.

Un grand merci à tous mes collègues sans qui mes deux années de maîtrise n'auraient pas été aussi fructueuses : Guillaume pour m'avoir aidé à faire mes premiers pas au laboratoire et pour m'avoir si bien conseillé, Malick pour ton support et tes remarques et Riham pour ta gentillesse et ton sens du jugement. Merci aussi à tous les stagiaires qui ont participé à mon projet : Mathieu, Ouassila, Dounia, Florian et Claire.

Un merci bien particulier à mes parents pour m'avoir donné un élan d'encouragement pendant mes moments de doute. Merci à mes amis avec qui j'ai partagé de très bons moments depuis le début de mon cheminement en sciences biologiques et avec qui j'ai pu souffler un bon coup : Jeyadarshan pour nos discussions, Kevin pour ton humour, Maxime pour tes connaissances et Philippe pour ta passion.

Je tiens aussi à souligner l'appui financier offert par le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG). Merci de m'avoir épaulé tout au long de mon parcours en sciences biologiques et de m'avoir permis de réaliser mon projet de recherche.

1. Introduction

1.1. La protéine LITAF

1.1.1. Expression et rôle de LITAF

LITAF (*lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor*), également connu sous le nom de SIMPLE (*small integral membrane protein of the lysosome/late endosome*) et PIG-7 (*p53 inducible gene-7*), est une protéine cellulaire de 161 acides aminés présente dans une grande variété de tissus et dont le rôle n'est pas encore tout à fait bien caractérisé (Moriwaki *et al.*, 2001). L'extrémité N-terminale de LITAF ne correspond à aucune structure connue, mais contient deux motifs PPXY et un motif P(S/T)AP permettant sa reconnaissance par d'autres protéines (Figure 1) (Shirk *et al.*, 2005; Jolliffe *et al.*, 2000; Eaton *et al.*, 2011). La moitié C-terminale de LITAF est riche en cystéines et forme un domaine RING (*really interesting new gene*), qui est interrompu par une chaîne d'acides aminés hydrophobes. Ce domaine particulier et hautement conservé se nomme le domaine SLD (*SIMPLE-like domain*). On sait que ce domaine contient des motifs dileucine et YXXØ (Ø étant n'importe quel acide aminé hydrophobe), permettant de cibler LITAF aux endosomes/lysosomes (Moriwaki *et al.*, 2001). À cause de sa localisation endosomale et lysosomale, on pense que LITAF pourrait être impliqué dans le tri des récepteurs aux endosomes et dans la régulation du trafic endosome-à-lysosome en participant au recrutement de certaines composantes du complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), dont STAM1 (*signal transducing adaptor molecule 1*), HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) et TSG101 (*tumor suppressor gene 101*) (Lee *et al.*, 2012). LITAF les recrute jusqu'à la membrane de l'endosome et fonctionne de pair avec la

machinerie de l'ESCRT dans le contrôle du tri des endosomes et dans la dégradation lysosomale des protéines cargo, comme les récepteurs ErbB (Lee *et al.*, 2011). Afin de s'ancrer à la membrane endosomale, LITAF utilise son domaine transmembranaire (*transmembrane domain*; TMD) (Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).



Figure 1. Schéma de LITAF. L'extrémité N-terminale de LITAF contient des domaines proline pouvant lier diverses protéines comme les ligases de l'ubiquitine Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) et Itch, ainsi que l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine TSG101. La portion C-terminale est riche en cystéines et contient un domaine hautement conservé, le domaine SLD.

Dans certaines lignées cellulaires, comme les monocytes et les macrophages, l'expression de LITAF est régulée à la hausse en réponse aux lipopolysaccharides (LPS), des substances qui composent la membrane externe des bactéries Gram négatif (Myokai *et al.*, 1999). Les LPS se lient à des récepteurs Toll-like (*Toll-like receptors*; TLR) et induisent les gènes de l'immunité et les gènes inflammatoires comme TNF α (*tumor necrosis factor alpha*), qui à leur tour induisent l'expression de LITAF (Moriwaki *et al.*, 2001). Les LPS sont donc d'un intérêt particulier en laboratoire pour la surexpression de LITAF *in vivo*. Dans d'autres lignées, comme les lymphocytes B, les LPS n'ont aucun impact sur l'expression de LITAF et c'est la protéine BCL6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) qui joue le rôle de répresseur de LITAF. Ainsi, lorsque BCL6 est présent en grande quantité, il réprime la transcription de LITAF en se liant à l'intron 1 de la protéine. Au contraire, lorsque BCL6 se trouve en faible quantité,

l'expression de LITAF est augmentée, causant l'autophagie dans certains lymphomes (Bertolo *et al.*, 2013). On a longtemps pensé que LITAF était un facteur de transcription de la cytokine TNF α , mais une étude menée par Moriwaki *et al.* (2001) a prouvé le contraire. En fait, LITAF ne peut pas jouer le rôle de facteur de transcription, puisqu'il ne possède aucun domaine de liaison à l'ADN et n'est pas localisé au niveau du noyau. En revanche, l'expression de LITAF est bien induite par le TNF α (Moriwaki *et al.*, 2001). Son expression est également augmentée en réponse à l'œstrogène (Everett *et al.*, 1997) et au facteur proapoptotique p53 (Polyak *et al.*, 1997). Une expression augmentée de LITAF peut conduire à des maladies inflammatoires de l'intestin (Stucchi *et al.*, 2006) ainsi qu'à l'obésité (Ji *et al.*, 2011), alors qu'une expression réduite de LITAF est associée à diverses formes de cancer, comme le cancer du sein (Abba *et al.*, 2004), les lymphomes (Mestre-Escorihuela *et al.*, 2007), la leucémie (Wang *et al.*, 2008) et le cancer de la thyroïde (Lui *et al.*, 2005).

1.1.2. LITAF est impliqué dans le syndrome de Charcot-Marie-Tooth

Le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est l'une des maladies héréditaires les plus communes, qui affecte approximativement 1 personne sur 2500 (Lacerda *et al.*, 2014). Sa variante de type 1C (CMT1C) est une neuropathie périphérique transmise de façon héréditaire, causant la démyélinisation des axones et ralentissant la propagation de l'influx nerveux (Saifi *et al.*, 2005). Suite à la découverte de quelques mutations de LITAF chez les patients atteints de CMT1C, on pense que cette dernière est impliquée dans la maladie et on dénombre d'ailleurs neuf mutations faux-sens de la protéine liées au CMT1C : T49M, A111G, G112S, T115N, W116G, I92V, L112V, P135S et P135T (Saifi *et al.*, 2005; Street *et al.*, 2003; Bennet *et al.*, 2004; Meggouh *et al.*, 2005; Latour *et al.*, 2006). La plupart de ces mutations se

retrouvent aux alentours du domaine TMD (Lee *et al.*, 2011), lui-même se trouvant à l'intérieur du domaine SLD de LITAF. Le mécanisme exact selon lequel ces mutations engendrent le CMT1C est cependant inconnu. Il a par contre été suggéré que les mutants de LITAF associés au CMT1C auraient un effet sur sa localisation cellulaire (Lacerda *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011). Cette délocalisation des mutants de LITAF pourrait peut-être expliquer l'apparition du CMT1C par un mécanisme de perte de fonction où LITAF muté ne se retrouve plus à son site d'action. Il est également possible que le détachement de LITAF de la membrane des endosomes précoces induise l'exposition de ses séquences hydrophobes, causant son mauvais repliement et son agrégation, promouvant ainsi l'apparition du CMT1C par un mécanisme de toxicité. Sachant que le CMT1C touche directement la démyélinisation des axones, il est possible que la manifestation de la maladie soit un signe que les cellules de Schwann sont plus sensibles aux mutations de LITAF que les autres cellules de l'organisme (Bennett *et al.*, 2004).

En plus d'être impliquée dans le CMT1C, la protéine LITAF est surexprimée dans les tissus de patients atteints de la maladie de Paget extramammaire (*extramammary Paget disease*; EMPD). Alors que le facteur proapoptotique p53 induit normalement LITAF, ce même facteur n'est pas présent dans les tissus des patients atteints d'EMPD. Des mutations de LITAF ont également été détectées chez les patients atteints de la maladie, dont des mutations faux-sens et des mutations silencieuses, comme dans le cas du syndrome de Charcot-Marie-Tooth. L'une de ces mutations se trouve au niveau du codon 23 de LITAF, alors que l'autre se trouve au niveau du codon 174 (Matsumara *et al.*, 2004). Afin d'expliquer la surexpression de LITAF chez ces patients alors que p53 n'est pas présent, on peut penser que la mutation de

LITAF induit son inactivation, suivi d'une accumulation de la protéine LITAF non fonctionnelle.

1.1.3. Localisation cellulaire de LITAF

LITAF endogène et recombinant se retrouvent au niveau des lysosomes et des endosomes tardifs (Figure 2) (Moriwaki *et al.*, 2001; Eaton *et al.*, 2011), ce qui implique que la protéine pourrait avoir un rôle dans le trafic intracellulaire et dans la dégradation. Bien que certaines études démontrent que LITAF endogène se situe au niveau de la membrane des endosomes précoces (Lee *et al.*, 2011), une étude suggère cependant que LITAF endogène se localise au niveau de structures de dégradation cytoplasmiques appelées aggrésomes (Figure 3) (Eaton *et al.*, 2012). Pour expliquer ceci, les auteurs affirment qu'à des concentrations normales, LITAF serait situé aux aggrésomes, mais que sa surexpression déclencherait le processus d'autophagie de la cellule, qui implique les lysosomes. La surexpression de LITAF résulterait donc en sa localisation au niveau des lysosomes. Notons cependant que cette potentielle localisation de LITAF endogène au niveau des aggrésomes n'a été démontrée que dans une seule étude.

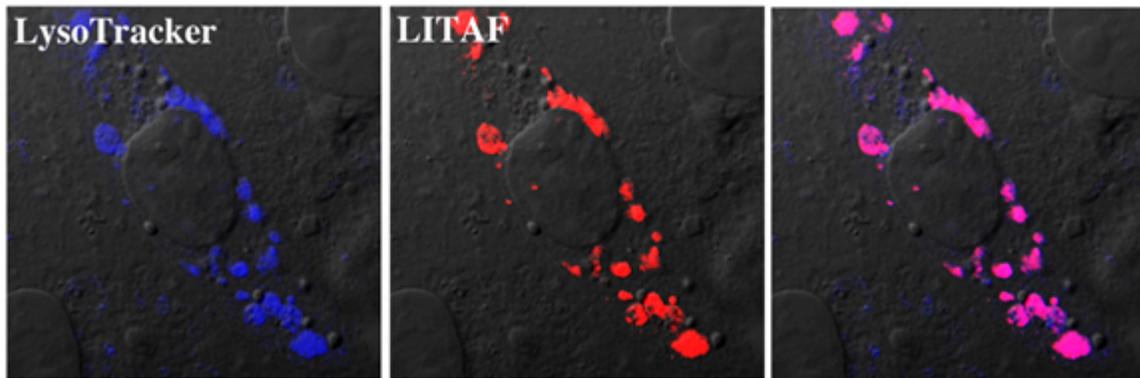


Figure 2. Localisation cellulaire de LITAF recombinant. Des cellules rénales de singe vert (*Buffalo green monkey kidney cells*; BGМК) ont été transfectées avec LITAF et la localisation de la protéine a pu être détectée par microscopie à fluorescence. Le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. La superposition de LITAF avec le LysoTracker montre une localisation complète de LITAF recombinant avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton *et al.* (2012).

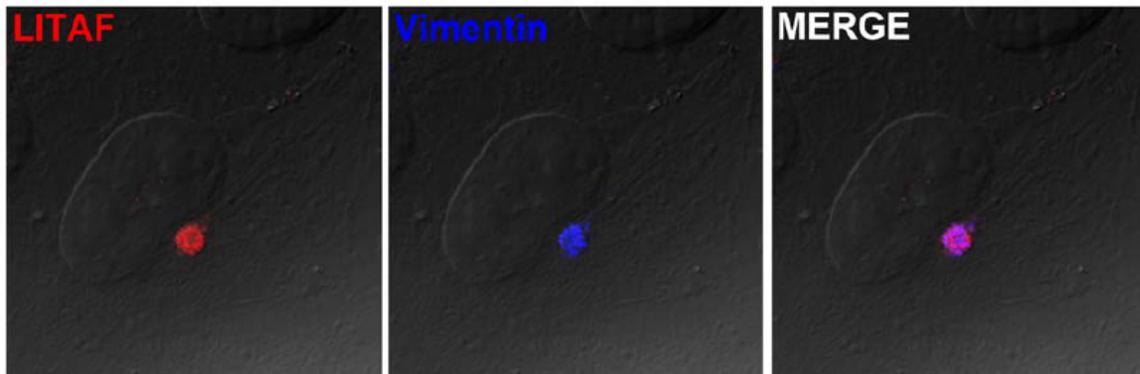


Figure 3. Localisation cellulaire de LITAF endogène. Des cellules BGМК ont été visualisées par microscopie à fluorescence. La vimentine a été utilisée pour marquer les agrégosomes. La superposition de LITAF avec la vimentine montre une localisation complète de LITAF endogène avec les agrégosomes. Tiré de Eaton *et al.* (2012).

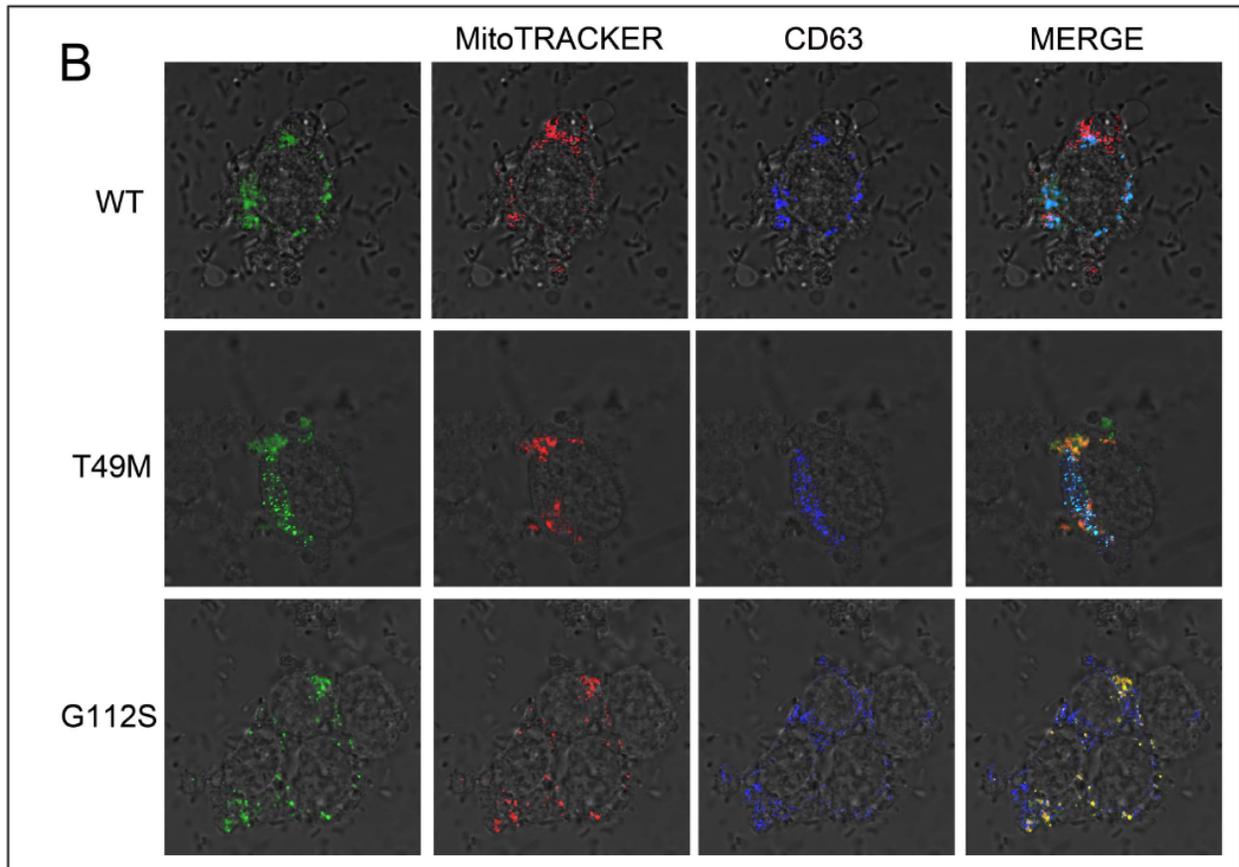


Figure 4. Localisation cellulaire de deux mutants de LITAF liés au syndrome de Charcot-Marie-Tooth. Des cellules de neuroblastome humain LAN-5 ont été transfectées avec LITAF WT (*LITAF wild-type*; LITAF sauvage) et les mutants T49M et G112S. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le CD63 a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs et le MitoTRACKER a été utilisé pour marquer les mitochondries. Par superposition, on peut voir que LITAF WT colocalise complètement avec les lysosomes et les endosomes tardifs, alors que le mutant T49M colocalise partiellement avec les mitochondries et les lysosomes et endosomes tardifs. Le mutant G112S colocalise avec les mitochondries. Tiré de Lacerda *et al.* (2014).

Bien qu'il ait été déterminé que LITAF recombinant se situe aux lysosomes et aux endosomes tardifs (Eaton *et al.*, 2011), il reste néanmoins intéressant de faire davantage la lumière sur la localisation de LITAF endogène dans la cellule. Les études menées sur le sujet sont pour le moment contradictoires. L'étude menée par Eaton *et al.* (2012) a permis de constater que le domaine SLD à lui seul est responsable de cibler LITAF endogène aux aggrésomes. Le fait que l'on retrouve LITAF endogène au niveau des aggrésomes suggère que LITAF a peut-être un grand niveau de mauvais repliement, dû à sa région très hydrophobe SLD. De plus, l'accumulation de protéines mal repliées peut résulter en l'apoptose (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2008). Les mutations du domaine SLD de LITAF pourraient exagérer cet effet, saturant ainsi complètement la machinerie de dégradation de la cellule, résultant en l'accumulation d'agrégats de la protéine LITAF. Il est aussi possible que LITAF joue un rôle spécifique dans les aggrésomes, mais aucune donnée appuyant cette hypothèse n'existe. Bien que LITAF se trouve au niveau des aggrésomes dans les cellules BGMK, il est possible que cette localisation soit spécifique à cette lignée cellulaire. LITAF endogène n'a pas pu être détecté dans les cellules HEK-293T (*human embryonic kidney 293T cells*) et HeLa, possiblement à cause d'une expression trop faible. Cependant, une étude de Moriwaki *et al.* (2001) a décelé la présence de LITAF endogène au niveau des lysosomes dans les cellules COS-7 et non des aggrésomes.

Une étude récente a montré que des mutants de LITAF associés au CMT1C seraient localisés complètement aux mitochondries (mutants A111G, G112S, T115N et W116G) ou partiellement aux mitochondries et aux endosomes tardifs et lysosomes (mutants T49M, L122V et P135T) (Figure 4) (Lacerda *et al.*, 2014). Bien qu'une étude antérieure ait montré que les mutants W116G et P135T sont localisés dans le cytoplasme (Lee *et al.*, 2011), les

mutants de LITAF sont présents de façon ponctuelle dans le cytoplasme, au niveau des mitochondries. Il a été démontré que le domaine SLD de LITAF est responsable de la localisation cellulaire des mutants, de même que la localisation de LITAF recombinant. De plus, LITAF est relocalisé lorsque la cellule est transfectée avec un mutant de LITAF, ce qui démontre que les mutants de LITAF agissent de façon dominante négative (Lacerda *et al.*, 2014). Ceci est en conformité avec une étude menée par Lee *et al.* (2012) et suggérant que des cellules hétérozygotes pour LITAF ont le même phénotype que des cellules où la protéine LITAF est absente. Donc, un individu étant hétérozygote pour LITAF aura le phénotype correspondant à LITAF muté. Puisqu'on sait que l'une des fonctions de LITAF est de recruter le complexe ESCRT à la membrane des endosomes et de réguler le trafic endosomal et la dégradation des récepteurs ErbB (Lee *et al.*, 2012), on peut penser que les mutations de LITAF qui altèrent sa localisation cellulaire vont altérer ou inhiber le trafic endosomal et potentiellement affecter la dégradation des protéines par le lysosome, ce qui pourrait causer le CMT1C. De plus, des traitements menés avec la bréfeldine A (BFA) ont démontré que LITAF transite par la voie sécrétoire pour se retrouver aux lysosomes et endosomes tardifs alors que les mutants ne transitent pas par la voie sécrétoire pour se retrouver aux mitochondries (Lacerda *et al.*, 2014).

Une similitude a été découverte entre LITAF et la protéine Frog Virus 3 (FV3) 75L présente chez les *Ranavirus*, un genre de virus qui infecte les amphibiens et les reptiles (Miller *et al.*, 2011; Marschang, 2011). Cette protéine est pratiquement identique à la portion C-terminale de LITAF d'où le fait qu'on y retrouve le domaine SLD. Cependant, 75L ne possède pas la portion N-terminale de LITAF. Le motif de ciblage composé de tyrosine, YXXØ, est présent chez 75L comme chez LITAF, cependant le motif dileucine responsable de cibler les

protéines au système endosomes/lysosomes est absent de 75L. Comparativement à LITAF (Figure 2), 75L se retrouve plutôt au niveau des endosomes précoces, comme le démontre sa colocalisation avec EEA1 (*early endosome antigen 1*) (Figure 5). Lorsque 75L et LITAF sont tous les 2 transfectés dans des cellules, il y a relocalisation de 75L aux endosomes tardifs/lysosomes et colocalisation avec LITAF (Figure 6). Ceci est également vrai lorsque 75L est viro-produit. La mutation des 2 motifs PPXY de LITAF entraîne un changement de localisation de ce dernier lorsque LITAF et 75L sont cotransfectés dans les cellules et les deux protéines colocalisent alors aux endosomes précoces (Figure 7) (Eaton *et al.*, 2013). Notons cependant que lorsque LITAF est exprimé seul, sa localisation cellulaire ne change pas suite à la mutation de ses motifs PPXY et on le retrouve toujours au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Eaton *et al.*, 2011). Le domaine SLD permettrait donc l'interaction entre les deux protéines et leur colocalisation. Ce faisant, il semble possible que la protéine LITAF puisse interagir avec elle-même et ainsi former des dimères. Cette dimérisation aurait pour effet la relocalisation cellulaire de LITAF et pourrait expliquer l'effet dominant-négatif des mutants qui peuvent délocaliser LITAF dans le CMT1C.

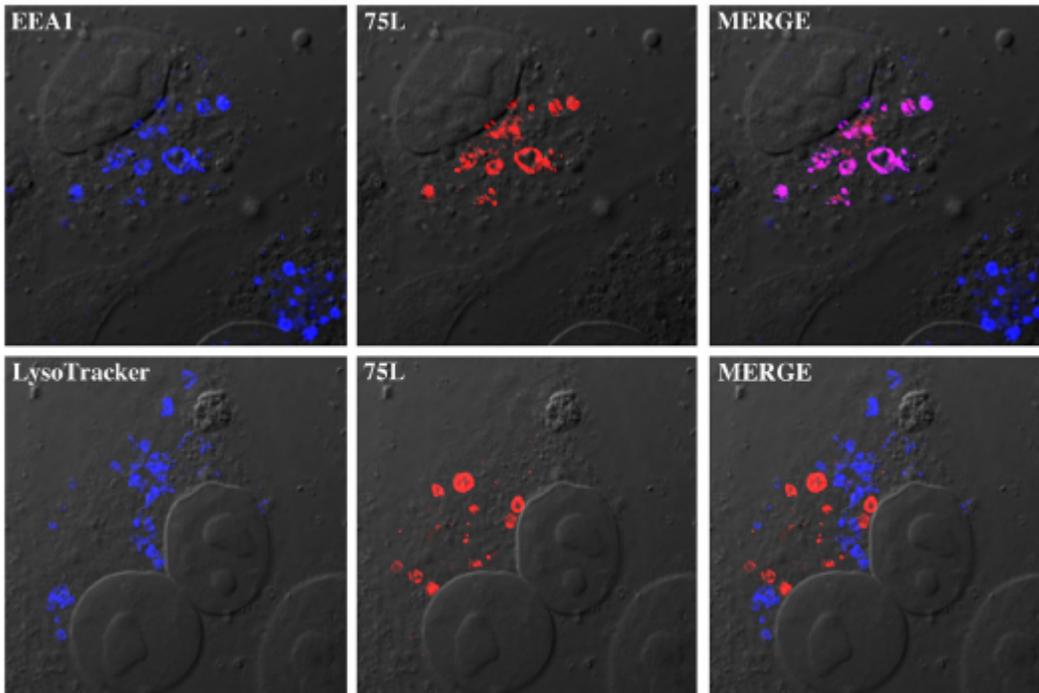


Figure 5. Localisation cellulaire de la protéine FV3 75L. Des cellules BGМК ont été transfectées avec 75L. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que 75L colocalise complètement avec les endosomes précoces, mais pas avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton *et al.* (2013).

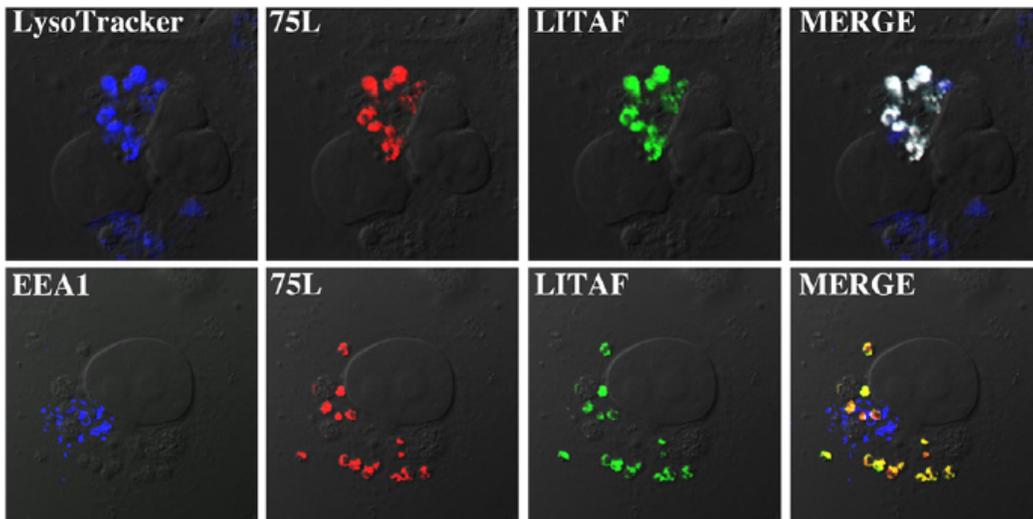


Figure 6. Localisation cellulaire des protéines LITAF et FV3 75L lorsque cotransfectées. Des cellules BGGMK ont été cotransfectées avec LITAF et 75L. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que LITAF et 75L colocalisent avec les endosomes tardifs et les lysosomes, et non avec endosomes précoces. Tiré de Eaton *et al.* (2013).

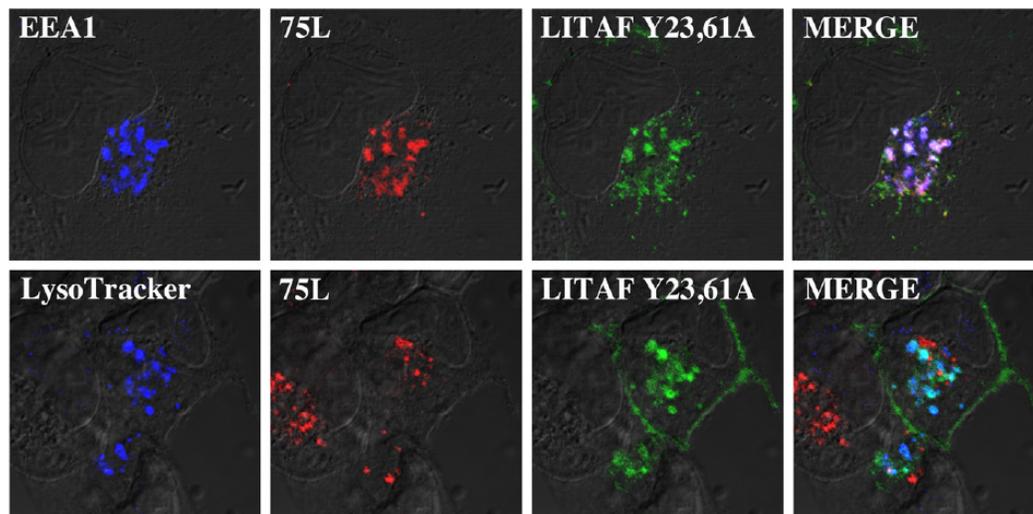


Figure 7. Localisation cellulaire du mutant LITAF Y23,61A et FV3 75L lorsque cotransfectés. Des cellules BGGMK ont été cotransfectées avec un mutant de LITAF ayant ses motifs PPXY mutés, LITAF Y23,61A, et 75L. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le EEA1 a été utilisé pour marquer les endosomes précoces et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que LITAF et 75L colocalisent avec les endosomes précoces, et non avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Tiré de Eaton *et al.* (2013).

1.2. Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4

1.2.1. Caractéristiques des ligases et ubiquitylation

Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4 ont comme caractéristiques de posséder un domaine de liaison aux membranes à l'extrémité N-terminale (domaine C2), 2 à 4 domaines WW pouvant entre autres lier les motifs PPXY de diverses protéines dont LITAF, ainsi qu'un domaine catalytique HECT (grand domaine d'environ 350 résidus) situé à l'extrémité C-terminale et permettant de lier l'ubiquitine aux substrats (Marin, 2010; Ingham *et al.*, 2004), par un processus appelé l'ubiquitylation. L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle agissant parfois comme signal de dégradation d'un substrat et qui se fait en plusieurs étapes : L'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme d'activation (E1), puis transférée à une enzyme de conjugaison (E2) pour être finalement liée sur une ou plusieurs lysine(s) d'un substrat à l'aide d'une ligase de l'ubiquitine (E3) (Pickart *et al.*, 2004). La monoubiquitylation d'un substrat permet sa dégradation aux lysosomes alors que la polyubiquitylation (4 molécules d'ubiquitine et plus) permet la dégradation d'un substrat aux protéasomes (Komander, 2009). On peut donc dire que l'ubiquitylation est d'une importance capitale dans le maintien de l'homéostasie de la cellule puisqu'elle régule la dégradation des substrats aux protéasomes et aux lysosomes.

1.2.2. Itch

Itch est une protéine de 113 kDa (Shirk *et al.*, 2005; Jolliffe *et al.*, 2000; Eaton *et al.*, 2011) qui tire son nom des souris *Itchy*, se caractérisant par l'absence de la ligase de l'ubiquitine Itch. Ces souris développent une sévère maladie immunologique, y compris l'inflammation des poumons et de l'estomac et une hyperplasie des cellules lymphoïdes et

hématopoïétiques. Itch possède différents rôles au sein de la cellule en raison de ses nombreux substrats qui diffèrent par leurs fonctions et est notamment impliqué dans l'immunité, l'apoptose et même dans le cancer (Melino *et al.*, 2008). Tel que schématisé sur la Figure 8, Itch possède 4 domaines WW pouvant lier les motifs PPXY de diverses protéines, dont LITAF (Eaton *et al.*, 2011), c-Jun (Oberst *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2004), JunB (Oberst *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2004), c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) (Chang *et al.*, 2006) et Notch (Qiu *et al.*, 2000). Ses domaines WW peuvent également interagir avec des résidus phosphosérine et phosphothréonine (Melino *et al.*, 2008). De plus, contrairement aux autres ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4, elle possède une séquence riche en prolines (*proline-rich domain*; PRD) lui permettant de lier des protéines à domaine SH3 (*Src homology 3 domain*) (Desrochers *et al.*, 2013).



Figure 8. Schéma de Itch. L'extrémité N-terminale de Itch contient un domaine de liaison au calcium et aux lipides (domaine C2). On retrouve un domaine PRD pouvant lier les protéines à domaine SH3 et 4 domaines WW pouvant lier les motifs PPXY de diverses protéines. L'extrémité C-terminale de Itch contient un domaine catalytique HECT permettant de lier l'ubiquitine.

Itch possède quelques substrats bien caractérisés qui peuvent être catégorisés : des facteurs de transcription, quelques récepteurs de facteurs de croissance et surtout des protéines de voies de signalisation (Melino *et al.*, 2008). En conditions normales, l'ubiquitylation du facteur de transcription JunB par Itch fait en sorte que celui-ci se retrouve en moins grand

nombre au niveau du promoteur de l'interleukine 4 (IL-4) (Fang *et al.*, 2002). Ainsi, l'IL-4 est produit en plus faible quantité et la différenciation des lymphocytes T-helper 2 (T_H2) est réduite (Melino *et al.*, 2008). Au contraire, la mutation ou la diminution de la quantité cellulaire de Itch résulte en l'augmentation de la quantité de JunB dans les cellules T_H2 et stimule ainsi leur différenciation et leur hyperprolifération, conduisant à des réponses allergiques et à une augmentation des immunoglobulines IgG1 (immunoglobuline G1) et IgE (immunoglobuline E) (Fang *et al.*, 2002).

Le récepteur transmembranaire Notch est une autre cible de l'ubiquitylation par Itch et l'une des plus importantes cibles de la ligase (Qiu *et al.*, 2000). Notch a pour rôle de déterminer le destin de la cellule durant la différenciation et la morphogénèse. Selon le type de tissu et le contexte, l'activation de Notch peut promouvoir ou restreindre la détermination du destin de la cellule (Melino *et al.*, 2008). En conditions normales, cette protéine joue notamment un rôle dans la différenciation d'une multitude de types cellulaires, dont les cellules T_H2 lors du développement lymphoïde (Osborne *et al.*, 2007), mais promeut également la survie et l'activation des lymphocytes T périphériques matures en augmentant l'expression de certaines protéines antiapoptotiques, comme AKT (Jenkinson *et al.*, 2006). La liaison d'un ligand au récepteur Notch cause la libération de son domaine intracellulaire (*intracellular domain*; ICD). L'ICD actif se dirige alors vers le noyau et joue le rôle de coactivateur pour réguler la transcription des gènes cibles de Notch (Melino *et al.*, 2008). À la suite de l'activation du récepteur, Notch est ubiquitylé par Itch, ce qui cause la dégradation de l'ICD et donc une diminution de la transcription des gènes cibles de Notch (Qiu *et al.*, 2000; McGill *et al.*, 2003). La protéolyse de Notch1 est également régulée par la protéine adaptatrice Numb, permettant ainsi de moduler convenablement le destin des lymphocytes T déterminé

par la signalisation de Notch (McGill *et al.*, 2003). Une mutation ou une diminution de la quantité cellulaire de Itch aurait pour effet d'augmenter la signalisation de Notch et ainsi augmenter la survie cellulaire par l'augmentation de la transcription des gènes antiapoptotiques, causant des réponses immunitaires anormales (Melino *et al.*, 2008). Notch serait également impliqué dans le cancer et pourrait agir soit en tant qu'oncogène ou soit en tant que suppresseur de tumeur, dépendamment de la force du signal et du contexte (Maillard *et al.*, 2003). En outre, Notch a été identifié en tant que suppresseur de tumeur dans l'épiderme des souris (Nicolas *et al.*, 2003).

Les facteurs de transcription p73 et p63, sont, comme p53, des facteurs proapoptotiques, libérés suite à un stress cellulaire induit par des dommages à l'ADN (Melino *et al.*, 2002; Melino *et al.*, 2003; Irwin *et al.*, 2003; Bergamaschi *et al.*, 2003; Gressner *et al.*, 2005). Dans des conditions normales, p73 et p63 sont maintenus à des quantités basses par l'ubiquitylation médiée par Itch (Rossi *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006). Les deux protéines sont polyubiquitylées *in vivo* et dégradées par le protéasome (Rossi *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006; Bernassola *et al.*, 2004). Ceci permet d'éviter que les cellules n'entrent en apoptose sans arrêt. Les deux facteurs de transcription possèdent des motifs PPXY uniques, non présents chez p53, à leur extrémité C-terminale et peuvent donc être recrutés par le domaine WW2 de Itch (Rossi *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006). En réponse à un stress génotoxique, leur expression est en partie augmentée par la baisse de la quantité de Itch cellulaire (Rossi *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme par lequel Itch est régulé à la baisse lors d'un stress causant des dommages à l'ADN n'est pas encore bien compris. Un modèle selon lequel Itch pourrait jouer un rôle dans la régulation de p73 lors de la mort cellulaire induite des lymphocytes T a été proposé par Melino *et al.* (2008). Selon ce modèle, la quantité de p73

serait basse dans les lymphocytes T-helper 1 (T_H1) naïfs grâce à l'ubiquitylation par Itch. Lorsque le lymphocyte T se lie à des antigènes spécifiques et est activé, les quantités de p73 augmentent dans la cellule et ceci pourrait être causé par (1) la baisse de l'expression cellulaire de Itch, (2) la phosphorylation d'un résidu Tyr de Itch par la tyrosine kinase Fyn, (3) la baisse de l'activité de Itch par la compétition de N4BP1 (*Nedd4-binding protein 1*) (Melino *et al.*, 2008). L'augmentation de la quantité de p73 dans les cellules T_H1 induit la transcription de plusieurs gènes proapoptotiques, comme Puma, Noxa et CD95 (Melino *et al.*, 2008). Les facteurs proapoptotiques p73 et p63 agissent de concert avec p53 dans la suppression des tumeurs (Flores *et al.*, 2005). Comme p53, ils s'accumulent dans les cellules cancéreuses suite à un traitement avec des médicaments chimiothérapeutiques ou par des irradiations gamma (Flores *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter qu'un bon nombre de cancers humains se caractérisent par une faible expression de p73 et p63 (Bernassola *et al.*, 2008). Il serait intéressant de voir si ceci est dû à une mauvaise régulation de Itch dans les cellules tumorales, résultant en son accumulation et à la dégradation protéasomale de p73 et p63. Notons également que p73 et p63 sont des substrats de d'autres ligases de la famille Nedd4 : WWP1 (*WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1*) et WWP2 (*WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*) (Zhi *et al.*, 2012; Chaudhary *et al.*, 2014).

Une autre protéine liée à l'apoptose et régulée par Itch est c-FLIP. En temps normal, c-FLIP joue le rôle d'inhibiteur de la caspase 8, un facteur proapoptotique. Itch reconnaît c-FLIP et cause sa dégradation, promouvant l'apoptose médiée par TNF α . La dégradation de c-FLIP n'a pas été aperçue dans des fibroblastes déficients en Itch ni dans des cellules déficientes en JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*) et qui ne répondent plus au traitement par le TNF α .

Donc, la phosphorylation de Itch par JNK permet à Itch d'interagir avec c-FLIP et de causer l'apoptose (Chang *et al.*, 2006).

Récemment, un lien a été établi entre Itch et TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*). TXNIP est un inhibiteur de la thiorédoxine, un régulateur de l'équilibre oxydoréductif de la cellule qui dégrade les radicaux oxygénés libres (*reactive oxygen species*; ROS) et qui est anti-apoptotique. TXNIP est donc proapoptotique. Il est également impliqué dans le cancer et dans le métabolisme des glucides et des lipides. Bien que la régulation transcriptionnelle de TXNIP soit bien caractérisée, sa régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle l'est beaucoup moins. Itch interagit avec les 2 motifs PPXY de TXNIP via ses 4 domaines WW et induit sa polyubiquitylation *in vitro* et *in vivo*, résultant en la dégradation protéasomale de TXNIP. Itch agit donc en tant que régulateur négatif et post-traductionnel de TXNIP, inhibant ainsi l'apoptose. Par ailleurs, le knockdown de Itch augmente l'accumulation des ROS et par le fait même l'apoptose (Zhang *et al.*, 2010).

1.2.3. Évolution et comparaison des ligases

Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4, dont on dénombre à ce jour plus de 150 représentants, font partie d'un groupe de ligases particulièrement abondantes chez les vertébrés, les ligases à domaine HECT (Marin, 2010).

Les ligases de la famille Nedd4 auraient divergé à partir de 4 gènes présents chez les animaux ancestraux : Nedd4a, Nedd4b, Nedd4c et Nedd4d. Au cours de l'évolution, ces gènes auraient donné naissance à 9 gènes chez les vertébrés, caractérisant les ligases qu'on connaît aujourd'hui. Ainsi, Nedd4a aurait formé Nedd4 et Nedd4l, Nedd4b aurait formé WWP1, WWP2 et Itch, Nedd4c aurait formé Smurf1 et Smurf2 et Nedd4d aurait formé Nedl1 et Nedl2

(Figure 9) (Marin, 2010). Ces liens entre les nouveaux gènes et leurs ancêtres sont établis par les ressemblances qui existent au niveau de la succession des domaines à l'intérieur de ces gènes. Ainsi, Itch, WWP1 et WWP2 ont davantage de similitudes entre eux que Itch en a avec Nedd4, et ainsi de suite.

Les ligases de la famille Nedd4 partagent des caractéristiques structurales communes, mais à la différence des autres ligases, Itch possède un domaine PRD qui lui permet de lier les protéines à domaine SH3 (Figure 8) (Desrochers *et al.*, 2013).

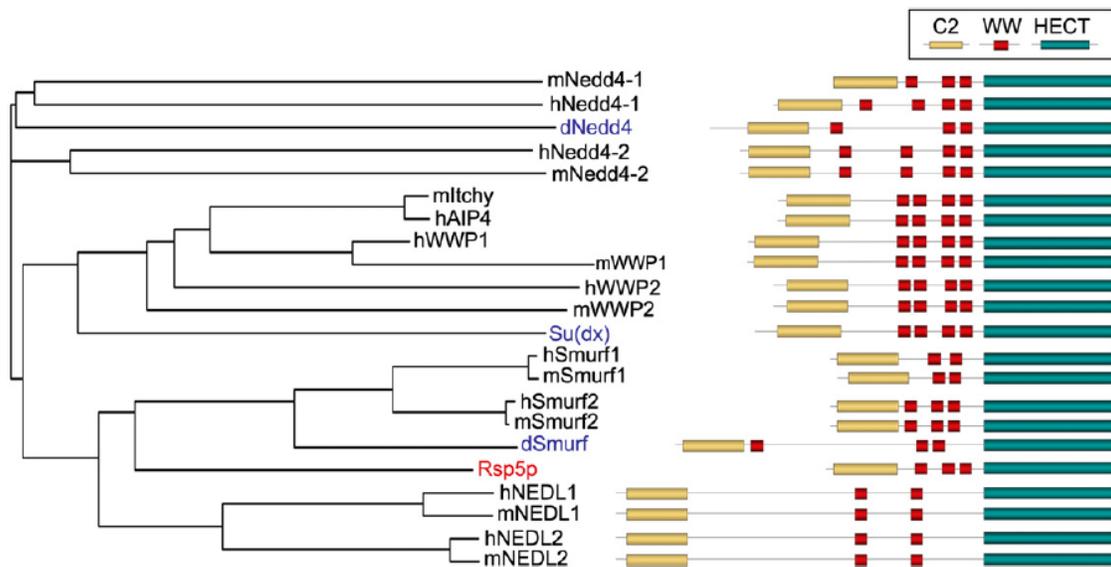


Figure 9. Comparaison structurale entre les différentes ligases de la famille Nedd4 chez l'humain, la souris, la levure et la drosophile. Itch possède davantage de similitudes avec WWP1 et WWP2 qu'avec Nedd4. L'humain et la souris sont représentés en noir, la levure en rouge et la drosophile en bleu. Tiré de Bernassola *et al.* (2008).

Comme son nom l'indique, Nedd4 est le représentant principal des ligases de la famille Nedd4, mais également celle qui est la mieux caractérisée. L'une des cibles de Nedd4 est le canal sodium de la membrane apicale des cellules épithéliales (*epithelial sodium channel*; ENaC). Nedd4 se lie au motif PPXY présent dans les sous-unités de ENaC via ses domaines

WW (Staub *et al.*, 1996; Harvey *et al.*, 1999). Les mutations dans le petit segment riche en prolines se situant à l'extrémité C-terminale des sous-unités bêta et gamma d'ENaC conduisent à l'augmentation de l'activité du canal, caractéristique d'une forme dominante autosomale d'hypertension appelée syndrome de Liddle. Plus spécifiquement, ces mutations suppriment ou altèrent les motifs PPXY présents dans les sous-unités bêta ou gamma de ENaC qui sont nécessaires pour l'interaction avec Nedd4 (Staub *et al.*, 1996; Schild *et al.*, 1996). Ceci suggère donc que Nedd4 régule l'activité ou l'abondance de ENaC.

Les ligases de la famille Nedd4 sont toutes impliquées dans la signalisation du TGF- β (*transforming growth factor beta*), hormis les ligases Nedl pour lesquelles aucun lien n'a pu être établi jusqu'à maintenant. On les retrouve également au niveau de l'ubiquitylation des protéines de la famille p53 (liées à l'apoptose), sauf les ligases Smurf1 et Smurf2 pour qui aucun lien n'a été détecté, ainsi que dans la voie de signalisation de l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Marin, 2010).

1.3. Régulation des ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4

1.3.1. Régulation des ligases au niveau transcriptionnel

La régulation des ligases est importante afin de contrôler leur niveau cellulaire et celui de leurs substrats. Un dérèglement au niveau de cette régulation peut causer de sévères dégâts à l'organisme et engendrer des maladies. Parmi les mécanismes de régulation, on reconnaît la régulation au niveau transcriptionnel qui provient de signaux extracellulaires. On sait par exemple que le TNF α régule à la hausse la transcription de la ligase Smurf1 dans les os de la voûte crânienne ainsi que dans les cellules de la moelle osseuse, mais que le niveau de Smurf2 n'est pas affecté (Kaneki *et al.*, 2006). Sachant que Smurf1 est impliqué dans l'ubiquitylation

et la dégradation de protéines jouant un rôle dans la formation des os, notamment Smad1/5 et Runx2, on peut faire le lien entre la ligase et la croissance osseuse (Guo *et al.*, 2008). De son côté, la transcription de WWP1 est également augmentée par induction de TNF α chez des souris transgéniques. Celle-ci ubiquityle et dégrade le facteur JunB, qui a un lien direct dans la différenciation des ostéoblastes (Zhao *et al.*, 2011).

Le TGF- β augmente également l'expression de certaines ligases de la famille Nedd4, comme Smurf2 et WWP1, tandis que le zinc régule à la hausse le niveau de Nedd4 dans les neurones de rat et s'en suit l'ubiquitylation et la dégradation de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Ohashi *et al.*, 2005; Kwak *et al.*, 2010), un gène agissant comme suppresseur de tumeur. L'androgène, sous sa forme synthétique, permet d'augmenter l'expression de certaines variantes de Nedd4l (Qi *et al.*, 2003). Pour sa part, l'acide rétinoïque diminue le niveau de Smurf1 dans le système nerveux entérique des souris, plus précisément dans les corps cellulaires des neurones (Sato *et al.*, 2008). Les dommages causés à l'ADN peuvent aussi augmenter la transcription de WWP1, bien que ce mécanisme ne soit pas encore très bien compris (Laine *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

En ce qui concerne la ligase Itch, on dénote que sa transcription est induite par le traitement des lymphocytes T à la ionomycine. Cet antibiotique augmente le niveau de calcium cellulaire, ce qui permet de constater que le calcium augmente l'expression de Itch dans les lymphocytes T (Heissmeyer *et al.*, 2004). Runx, un gène impliqué dans le cancer, induit l'expression de Itch, qui va ensuite ubiquityler et dégrader la protéine p73 (Levy *et al.*, 2008), qui est liée à l'apoptose et qui joue le rôle de suppresseur de tumeur.

1.3.2. Régulation des ligases par autoinhibition

Les ligases de la famille Nedd4 possèdent des conformations inactives et actives et peuvent donc en quelque sorte s'autoréguler. On sait par exemple que la conformation inactive de la ligase Itch est caractérisée par un repliement de son domaine HECT sur une région située entre les domaines WW et le domaine PRD (Mund *et al.*, 2009), bien que cette interaction soit faible (Hooper *et al.*, 2010). Les autres ligases possèdent des mécanismes d'autoinhibition semblables, bien que le modèle soit légèrement différent, par exemple dans le cas de Nedd4, WWP et Smurf2 où la conformation inactive est caractérisée par le repliement du domaine HECT sur le domaine C2 (Wiesner *et al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes permettent aux ligases de passer de leur forme inactive à leur forme active. On peut par exemple penser à l'ajout de calcium, qui, dans le cas de Nedd4 et Nedd4l réduit l'interaction entre le domaine HECT et le domaine C2 et augmente ainsi leur activité catalytique (Wang *et al.*, 2010). La phosphorylation joue également un rôle, par exemple dans le cas de Itch, où la phosphorylation d'une région se situant au niveau du domaine PRD augmente non seulement son activité autocatalytique, mais également son activité catalytique (Wiesner *et al.*, 2007; Mund *et al.*, 2009). Ceci a pour conséquence d'augmenter l'autoubiquitylation de Itch et donc sa dégradation, mais également l'ubiquitylation de ses substrats c-Jun et JunB (Gao *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2006).

D'autres mécanismes permettent également aux ligases d'adopter une conformation active, entre autres par la liaison aux motifs WW des ligases.

1.3.3. Régulation des ligases par liaison des domaines WW

Différentes protéines peuvent activer ou réprimer l'activité des ligases, en leur permettant justement de quitter ou d'adopter leur conformation inactive. On peut notamment penser aux protéines NDFIPs (NDFIP1 et NDFIP2) (*Nedd4 family-interacting protein 1/2*) qui peuvent lier les domaines WW des ligases à l'aide de leurs motifs PPXY. Un modèle de cette activation a d'ailleurs été proposé par Mund *et al.* (2009) (Figure 10). Ainsi, l'interaction entre NDFIP1/2 et la ligase libère le domaine HECT de cette dernière, lui permettant de lier l'ubiquitine et ainsi d'ubiquityler ses substrats et de s'autoubiquityler elle-même (Mund *et al.*, 2009).

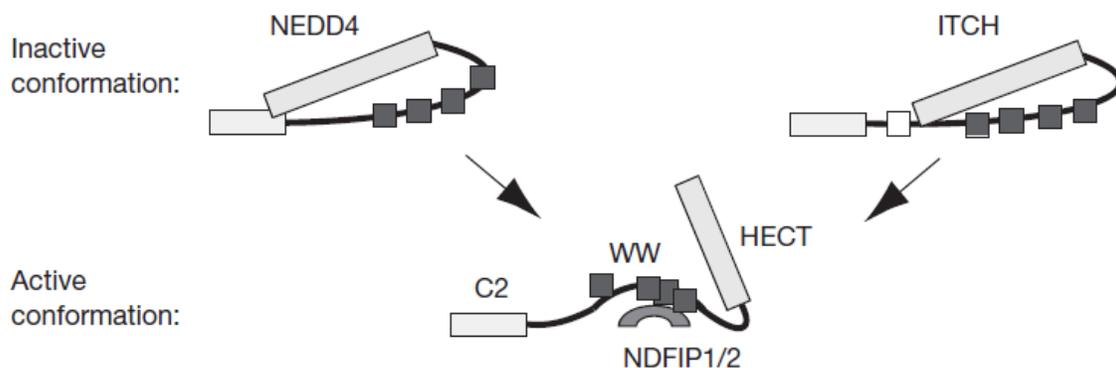


Figure 10. Les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4 prennent une conformation active après interaction avec une protéine activatrice. La liaison d'une ligase de l'ubiquitine de la famille Nedd4 à une protéine activatrice cause un changement de conformation de la ligase et permet la libération de son domaine HECT. La ligase pourra ainsi ubiquityler ses substrats et s'autoubiquityler elle-même. Tiré de Mund *et al.* (2009).

Bien que certaines protéines fonctionnent en tant que protéines activatrices de ces ligases, d'autres vont compétitionner avec leurs substrats et vont donc réguler leur activité à la baisse. C'est le cas de la protéine N4BP1 qui compétitionne avec les substrats de Itch et qui, ainsi, inhibe l'autoubiquitylation de la ligase et l'ubiquitylation de ses substrats (Oberst *et al.*, 2007).

Certaines observations préliminaires effectuées au laboratoire suggèrent que LITAF est une autre protéine pouvant réguler l'activité des ligases. En effet, tel que mentionné précédemment, cette dernière possède des motifs proline, dont PPXY qui est le plus commun, mais aussi P(S/T)AP, lui permettant d'interagir avec divers substrats. Les motifs PPXY de LITAF lui permettent de lier les domaines WW des ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4 (Figure 11), comme Nedd4, Itch, WWP1 et WWP2 (Shirk *et al.*, 2005; Jolliffe *et al.*, 2000; Eaton *et al.*, 2011) ainsi que TSG101, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (Shirk *et al.*, 2005).

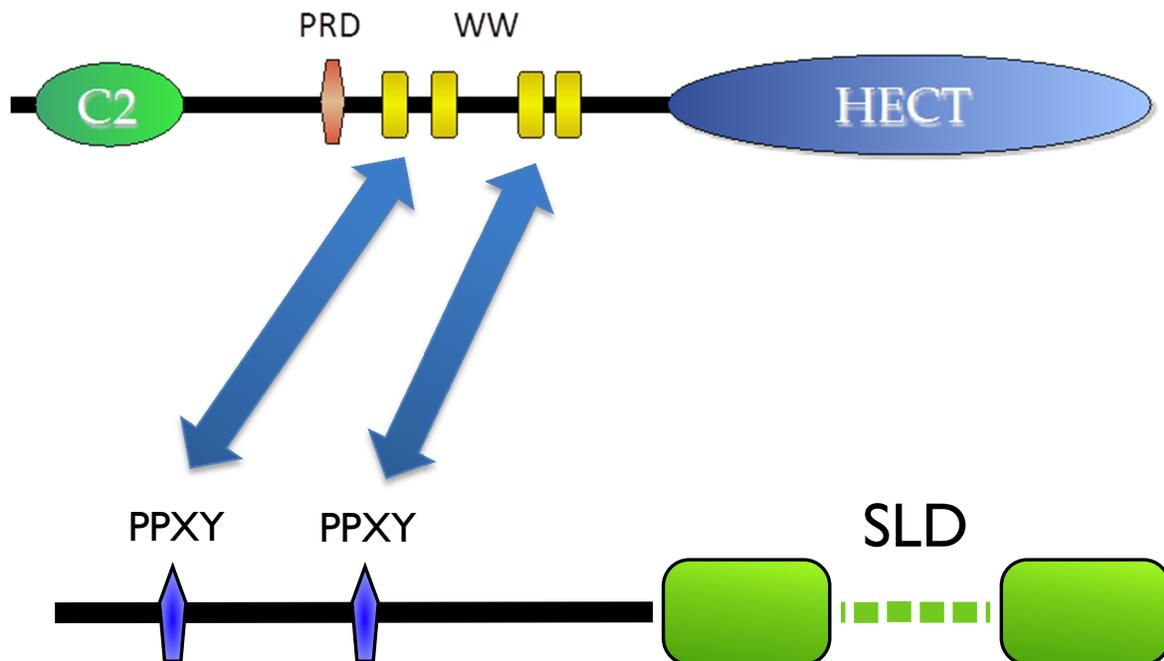


Figure 11. Interaction entre Itch et LITAF. L'interaction entre Itch (en haut) et LITAF (en bas) se fait via les domaines WW de Itch et les motifs PPXY de LITAF.

Il a été observé que l'interaction entre Itch et LITAF cause la relocalisation de Itch depuis le trans-golgi (Figure 12) jusqu'aux lysosomes et résulte donc en sa colocalisation avec LITAF (Figure 13). Cette relocalisation n'a pas été aperçue dans le cas de Nedd4 (Eaton *et al.*, 2011).

On sait aussi que Itch est autoubiquitylé dans les cellules (Mouchantaf *et al.*, 2006) et on peut donc penser que l'interaction de LITAF avec Itch serait une façon d'activer ce mécanisme ou d'augmenter son intensité. L'autoubiquitylation permet la dégradation de Itch, mais son importance exacte n'est pas connue. Il est possible qu'il s'agisse d'un mécanisme permettant de diminuer la quantité cellulaire de Itch suite à son activation, un peu comme une boucle de rétroaction négative. La protéase de l'ubiquitine FAM peut retirer l'ubiquitine de Itch et ainsi contrer sa dégradation aux protéasomes (Mouchantaf *et al.*, 2006). Sachant que

des protéines structurellement semblables à LITAF et possédant des motifs PPXY, NDFIP1 et NDFIP2, interagissent avec Itch et causent son activation (Mund *et al.*, 2009), il est possible que l'interaction de LITAF avec Itch active la ligase et lui permette par la suite d'ubiquityler ses substrats.

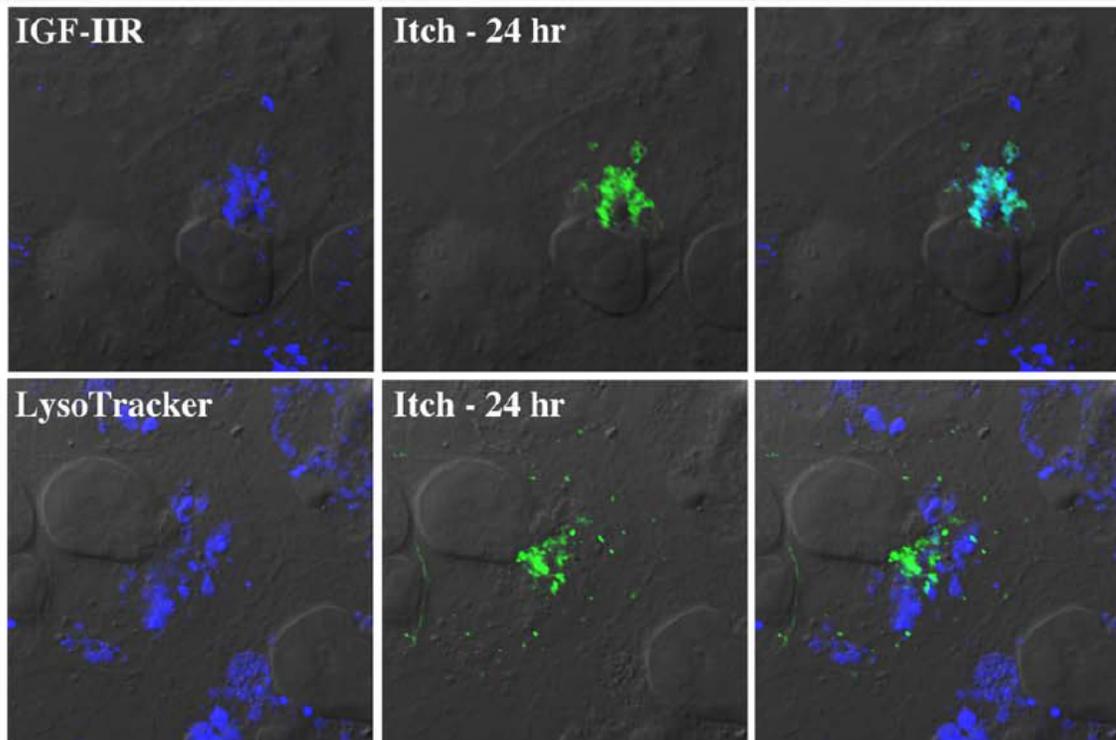


Figure 12. Localisation cellulaire de Itch. Des cellules BGMK ont été transfectées avec Itch. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le IGF-IIR (*insulin-like growth factor 2 receptor*) a été utilisé pour marquer le trans-golgi et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que Itch colocalise avec le trans-golgi, mais pas avec les lysosomes et les endosomes tardifs. Tiré de Eaton *et al.* (2011).

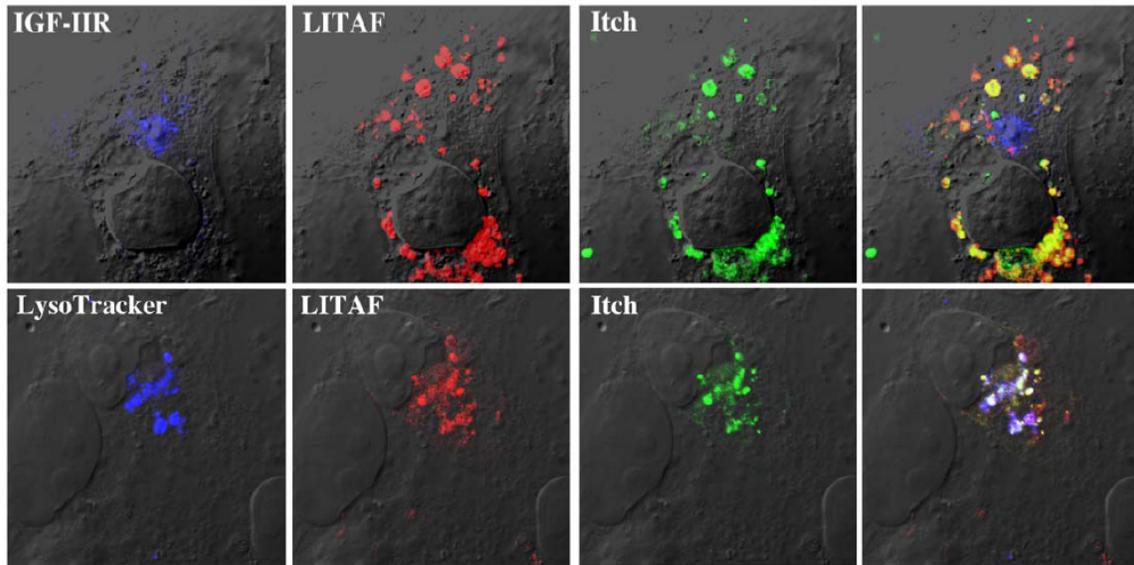


Figure 13. Localisation cellulaire de Itch lorsque cotransfecté avec LITAF. Des cellules BGMK ont été cotransfectées avec LITAF et Itch. Les cellules ont été regardées par microscopie à fluorescence. Le IGF-IIR a été utilisé pour marquer le trans-golgi et le LysoTracker a été utilisé pour marquer les lysosomes et les endosomes tardifs. Par superposition, on peut voir que Itch, lorsque cotransfecté avec LITAF, colocalise avec les lysosomes et les endosomes tardifs, mais pas avec le trans-golgi. Tiré de Eaton *et al.* (2011).

1.4. Problématique, objectifs et hypothèses

La dégradation des protéines joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie des cellules. Le trafic endosomal achemine les protéines de la surface cellulaire devant être dégradées jusqu'au lysosome, où cette dégradation a lieu. L'ubiquitylation des protéines est un élément clé dans la régulation de ces phénomènes.

Des études menées dans nos laboratoires ont montré que la transfection seule de LITAF ou Itch dans des cellules HEK-293T n'a aucune influence sur la quantité cellulaire des protéines. Cependant, la cotransfection de LITAF et Itch dans ces mêmes cellules diminue grandement la quantité de Itch, alors que la quantité de LITAF demeure in affectée. Ces observations suggèrent que LITAF semble jouer un rôle dans la diminution de la quantité cellulaire de Itch. Suite aux découvertes de Mund *et al.* (2009) démontrant que les NDFIPs, des protéines similaires à LITAF, seraient des activateurs de deux ligases de la famille Nedd4, soit Nedd4 et Itch, nous avons pensé que LITAF pourrait également avoir cet effet envers les ligases.

Les objectifs poursuivis dans cette étude étaient de déterminer si LITAF active les ligases de la famille Nedd4 et de voir les impacts de cette activation sur les substrats des ligases.

Nos hypothèses étaient que LITAF active les ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4, dont Itch, et que cette activation permet à ces ligases d'ubiquityler leurs substrats, causant leur dégradation. Nous supposons donc que LITAF serait une protéine pouvant réguler l'activité des ligases de la famille Nedd4. Nous avons donc testé l'effet de la présence de LITAF sur l'activité catalytique de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2, ainsi que sur la stabilité et l'ubiquitylation des substrats de Itch : c-Jun et l'endophiline.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons tout d'abord testé l'interaction entre la protéine et quatre ligases de la famille Nedd4 (Nedd4, Itch, WWP1 et WWP2), puis avons mené des expériences de dégradation et d'ubiquitylation sur ces ligases ainsi que sur certains de leurs substrats. La cotransfection de LITAF et des ligases dans les cellules HEK-293T conduit à une diminution marquée des ligases en question, ce qui rend l'observation des effets sur les substrats difficile. Des expériences *in vitro* ont donc été menées afin de mieux mettre en évidence l'effet de l'activation de Itch sur l'ubiquitylation de ses substrats.

2. Méthodologie

2.1. Expériences d'ubiquitylation *in vivo*

2.1.1. Purification des plasmides

La purification de FLAG-LITAF WT, GFP-LITAF 2Y (GFP étant le *green fluorescent protein*), YFP-Itch (YFP étant le *yellow fluorescent protein*), YFP-Nedd4, YFP-WWP1 et YFP-WWP2 se fait par la technique de maxiprep. On prépare tout d'abord 500 mL de milieu LB (*lysogeny broth*) dans des flasques de 2 L pour la culture bactérienne. Ce milieu contient des extraits de levure (5 g/L), du tryptone (10 g/L) et du NaCl (10 g/L). On ajoute ensuite l'antibiotique approprié (5 µL) dans les flasques, soit l'ampicilline (pour FLAG-LITAF WT) ou la kanamycine (pour GFP-LITAF 2Y, YFP-Itch, YFP-Nedd4, YFP-WWP1 et YFP-WWP2), ainsi que les bactéries contenant le plasmide désiré. On fait pousser les bactéries et on transfère ensuite le tout dans des gros tubes en plastique puis on fait centrifuger 20 minutes à 4000 RPM à 4 °C. On resuspend le culot dans 4 mL d'une solution glucose/Tris/EDTA et on transfère dans des tubes de 20 mL pour centrifugeuse.

La lyse des cellules bactériennes se fait par l'ajout de 10 mL d'une solution 0,2 M NaOH/1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*) fraîchement préparée, puis par l'ajout de 7,5 mL d'une solution de d'acétate de potassium 3 M. On centrifuge ensuite 10 minutes à 20 000 RCF à 4 °C.

Pour précipiter l'ADN plasmidique, on transvase le surnageant dans un nouveau tube, on ajoute 0,6x le volume d'isopropanol, on centrifuge 10 minutes à 15 000 RCF à 22 °C et on rince le culot avec 2 mL d'éthanol 70%. On centrifuge par la suite de 2 à 3 minutes à 15 000 RCF à 22 °C, on jette l'éthanol et on fait sécher les tubes avec le culot.

Le retrait des contaminants nécessite l'ajout de 1 mL d'une solution glucose/Tris/EDTA et de 20 µL de RNase (TE). On fait ensuite incuber à une température de 37 °C pendant 20 à 45 minutes. Par la suite, on ajoute 2 mL d'une solution 0,2M NaOH/1% SDS fraîche et 1,5 mL d'acétate de potassium 3 M et on centrifuge pendant 10 minutes à 20 000 RCF à une température de 22 °C. On poursuit en transférant le surnageant dans un tube de 15 mL, puis en ajoutant le même volume de chloroforme alcool isoamylique 24:1. On centrifuge 2 minutes à 22 °C puis on transfère le tout dans un nouveau tube de 20 mL. Il faut ensuite ajouter le quart du volume d'une solution d'acétate d'ammonium concentrée à 10 M, puis ajouter 2x le volume d'éthanol 100% et laisser de 10 à 20 minutes au congélateur à -80 °C. On centrifuge pendant 10 minutes à 10 RCF à une température de 4 °C, on jette le surnageant, on rince le culot avec 5 mL d'éthanol 70%, on centrifuge à nouveau pendant 5 minutes, puis on jette l'éthanol et on laisse sécher les tubes avec le culot sous la hotte.

Pour faire précipiter l'ADN plasmidique, le culot a été resuspendu dans 2 mL de tampon TE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM) et dans 0,8 mL de solution de polyéthylène glycol (PEG 8000 30% (m/v) – NaCl 1,6 M). Les tubes ont été laissés dans un bac de glace au réfrigérateur à 4 °C pendant une nuit entière. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés 20 minutes à 10 000 RCF à 4 °C, puis le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon TE. Le quart du volume d'acétate d'ammonium 10 M, puis le double du volume d'éthanol 100% ont été ajoutés. Le tout a été laissé 10 minutes au congélateur à -80 °C avant d'être centrifugé 10 minutes à 10 000 RCF à une température de 4 °C. Le culot a par la suite été rincé avec 5 mL d'éthanol 100%, puis les tubes ont été centrifugés 2 minutes à une vitesse de 10 000 RCF et à 4 °C. Pour garder un environnement stérile, l'éthanol a été jeté et les tubes avec le culot ont été

séchés à la flamme. Le culot a ensuite été resuspendu dans 750 µL de tampon TE stérile. Les échantillons purifiés ont été gardés au réfrigérateur à 4 °C.

2.1.2. Expression et rôle de LITAF

Les protéines d'intérêt ont été obtenues par expressions hétérologues dans *Escherichia coli* (*E. coli*) à partir de vecteurs pGEX-4T-1 recombinés avec les séquences codantes appropriées : GST (*glutathione S-transferase*), GST-RAD23, GST-RPN10, GST-STAM-UIIM (STAM-UIIM étant *signal transducing adaptor molecule ubiquitin interacting motif*), GST-LITAF WT, GST-LITAF 2Y, GST-LITAF WT (portion N-terminale) et GST-LITAF 2Y (portion N-terminale). Les bactéries ont été gardées au congélateur à -80 °C. Pour la purification, 500 mL de milieu LB à 37 °C ont été préparés dans des flasques de 2 L et ont étéensemencés avec 50 mL d'une culture fraîche de bactéries transformées avec le vecteur d'expression. On fait ensuite agiter 1h à 120 RPM à 37 °C. Par la suite, 500 µL d'IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) sont ajoutés dans les flasques et on laisse ceux-ci agiter pendant 3h à 120 RPM et à 37 °C. L'IPTG se lie au répresseur de l'opéron lactose et permet de stimuler la transcription de l'ADN recombinant du vecteur pGEX-4T-1 qui contient un promoteur contenant la séquence de liaison du répresseur bactérien LacI, activant ainsi la machinerie cellulaire et permettant la production des protéines d'intérêt. On centrifuge ensuite les bactéries 20 minutes à 4000 RPM à 4 °C, puis on récupère les culots bactériens placés dans des tubes dans un congélateur à -80 °C. Ensuite, les culots sont resuspendus dans 20 mL de PBS (*phosphate buffered saline* - NaH₂PO₄ 0,2 M - NaCl 0,6 M - pH 7,4) et transférés dans des tubes de 50 mL pour ensuite être soniqués 3 fois pendant 10 secondes à une amplitude de 50% pour la lyse physique. Pour la lyse chimique, on ajoute 2 mL de triton 10% dans chaque

tube et on fait incuber 30 minutes au réfrigérateur à 4 °C avec agitation. On centrifuge finalement 20 minutes à 20 000 RCF, puis on sépare les extraits en tubes de 5 mL en les gardant au congélateur à -80 °C pour usage ultérieur.

2.1.3. Lavage et quantification des protéines de fusion

Les extraits bactériens sont décongelés, puis de façon stérile à la flamme on ajoute 150 µL de billes de Sepharose couplées au glutathion dans chaque tube et on laisse agiter pendant 2h à température pièce (20 °C). Le glutathion a une forte affinité pour la protéine GST, fusionnée aux séquences d'intérêt. Ainsi, les billes vont pouvoir se lier à la portion GST des protéines de fusion et permettre de les récupérer. On centrifuge ensuite à 2000 RCF à 4 °C pendant 2 minutes, puis on ajoute 10 mL de la solution saline de PBS dans les tubes pour le lavage. On répète les étapes de lavage 2 autres fois pour éliminer le maximum de débris. Les protéines de fusion mélangées aux billes peuvent ensuite être gardées au réfrigérateur à 4 °C pendant un maximum de 2 semaines (on récupère 150 µL). Pour la quantification, un mini-gel de polyacrylamide (10%) est préparé. Les billes liées aux protéines de fusion sont chauffées à 95 °C pendant 5 minutes afin d'être dénaturées. On ajoute ensuite 10 µL des billes liées aux différentes protéines et 2,5 µL de LSB (*loading sample buffer* - SDS 3% - sucrose 115 mM - Tris-Cl 65 mM pH 6 - bêta-mercaptoéthanol (βME) 1% - bleu de bromophénol 0,0025%) dans les puits avec des concentrations croissantes de BSA (*bovine serum albumin* - 1 ug, 2 ug, 5 ug et 10 ug). Les puits vides sont remplis avec 12,5 µL de LSB. On fait ensuite migrer à 150 V pendant 1h, puis on colore le gel au bleu de Coomassie (acide acétique glacial 10% - méthanol 30% - bleu de Coomassie/bleu brillant 0,25%) pendant 3h, on le décolore au destain (alcool

isopropylique 10% - acide acétique glacial 10%), puis on quantifie les bandes obtenues à partir d'une courbe de BSA.

2.1.4. Transfection cellulaire

Afin de pouvoir exprimer les protéines désirées dans les cellules, des cellules rénales embryonnaires humaines, HEK-293T, ont été cultivées dans une solution de DMEM enrichie de sérum de veau cosmique (*cosmic calf serum*; CCS), de streptomycine et d'antifongique et incubées dans des boîtes de pétri à des conditions physiologiques. Des échantillons contenant 5 µg de l'ADN désiré ont été pipetés dans 430 µL de TE 0,1X et 60 µL de CaCl₂ 250 mM servant à la perforation des membranes cellulaires, auxquels 500 µL de HBS 2X (*HEPES buffered saline* - NaCl 280 mM - KCL 10 mM - Na₂HPO₄ 1,5 mM - dextrose 12 mM - HEPES 50 mM - pH 7,0) ont été ajoutés. Le lendemain, le milieu DMEM a été changé pour tous les pétris afin d'éviter la désoxygénation du milieu, puis les cellules ont été extraites le surlendemain.

2.1.5. Extraction cellulaire

Une solution d'extraction a été préparée, contenant 500 µL de HEPES 10 mM, 1,875 mL de NaCl 150 mM ainsi que des inhibiteurs de protéasome (sauf pour l'expérience sur le taux de dégradation de Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline) : 100 µL de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), 500 µL de benzamidine, 5 µL d'aprotinine et 5 µL de leupeptine. La solution a été complétée jusqu'à 50 mL avec de l'eau Milli-Q.

Les pétris cellulaires ayant été transfectés ont été lavés 2 fois avec 5 mL de PBS, puis 500 µL de solution d'extraction ont été ajoutés dans chaque boîte de pétri et les cellules ont été

récupérées dans 2 tubes de 15 mL : un pour FLAG-LITAF WT et un pour GFP-LITAF 2Y. Les tubes ont par la suite été soniqués 3 fois pendant 10 secondes à une amplitude de 50% (lyse physique), puis 100 μ L de triton 10% ont été ajoutés dans chaque tube pour la lyse chimique. Les tubes ont ensuite été mis au réfrigérateur à 4 °C sur agitateur pendant 30 minutes, pour ensuite être transférés dans une centrifugeuse à 4 °C pendant 30 minutes à une vitesse de 16 000 RPM. Les surnageants ont été récupérés dans des nouveaux tubes et les culots ont été jetés.

2.1.6. Migration, transfert de gel sur membrane et immunobuvardage

Les échantillons ont été migrés sur un gel de polyacrylamide à gradient 4%-16%. 80 μ L de chaque échantillon ont été pipetés dans chaque puit puis 20 μ L de LSB ont été ajoutés. Pour le marqueur de poids moléculaire, 60 μ L d'eau distillée, 20 μ L de LSB et 20 μ L du marqueur ont été utilisés. Les puits vides ont été remplis avec 100 μ L de LSB. La migration a été effectuée durant la nuit à un total de 900 V.

Les protéines migrées sur gel ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose avant l'immunobuvardage, comme sur le montage de la Figure 14.

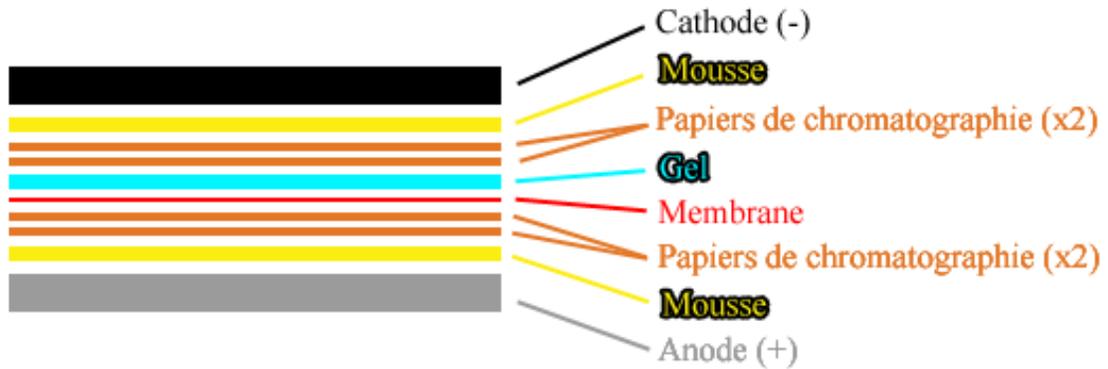


Figure 14. Montage de transfert de gel sur membrane de nitrocellulose. La migration des protéines se fait du gel vers la membrane, soit de la cathode (-) vers l'anode (+).

Le montage a été placé dans une cuve pour le transfert, à laquelle ont été ajoutés la totalité de la solution de transfert ainsi que 1 L de méthanol. La cuve a par la suite été placée dans le réfrigérateur à 4 °C, branchée à une source à 1000 mA et le transfert a été effectué pendant 1h30.

L'immunobuvardage, communément appelé le *western blot*, permet de détecter les protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques.

Tout d'abord, une solution de blotto contenant 200 mL de PBS, 800 mL d'eau distillée et 50 g de lait en poudre commercial a été préparée. Cette solution permet de bloquer les protéines sur les membranes de nitrocellulose. La membrane a ensuite été annotée, découpée, puis placée dans du blotto pendant 1h, avec agitation, à température pièce (20 °C).

Chaque anticorps primaire (voir la liste dans le TABLEAU I) a été dilué dans 10 mL de blotto selon les quantités établies par le manufacturier, puis les différents morceaux de la membrane ont été placés dans des sacs scellables commerciaux et les solutions contenant le blotto et l'anticorps primaire ont été versées dans les sacs, en contact avec le morceau de membrane approprié. Le tout a été laissé au réfrigérateur à 4 °C avec agitation pendant une

nuit entière, afin de bien recouvrir toutes les portions de la membrane et de permettre aux anticorps primaires de bien se fixer sur leurs protéines cibles.

Les solutions ont ensuite été récupérées au réfrigérateur à 4 °C, puis les portions de membranes ont été sorties des sacs et placées et mis 3 fois en présence de blotto pendant 10 minutes, à température pièce et avec agitation. Les membranes ont ensuite été placées dans de nouveaux sacs scellables et ont été mis en présence de 10 µL d'un anticorps secondaire (voir la liste dans le TABLEAU II) approprié. Le tout a été mis sur agitateur à température pièce pendant 1h. Les membranes ont par la suite été lavées 10 minutes avec la solution de blotto à 2 reprises, puis elles ont été laissées dans du TBS (*Tris-buffered saline*) 1X avec agitation et à température pièce pendant 30 minutes.

Afin de visualiser les protéines d'intérêt, les morceaux de membrane ont été mis dans une pochette en plastique, puis 750 µL de peroxyde d'hydrogène ont été mélangés avec 750 µL de luminol, puis la solution a été versée goutte à goutte partout sur les morceaux de membrane. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec le luminol, créant ainsi une réaction de chimiluminescence, et donc la production de lumière. Cette chimiluminescence a ensuite pu être visualisée à l'aide d'une machine FUSION FX, révélant ainsi si les anticorps ont réagi avec leur protéine cible.

TABLEAU I. Anticorps primaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage

Protéine cible	Nom commercial (manufacturier)	Espèce hôte	Concentration utilisée
c-Jun	Anti-c-Jun, clone 6E4.4 (Millipore)	Souris	1:1000
Endophiline	Anti-Pan-Endophiline (Zymed Laboratories Inc.)	Lapin	1:1000
FLAG	Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody (Sigma-Aldrich)	Souris	1:1000
GFP	Anti-GFP (Molecular Probes)	Lapin	1:5000
Itch	Anti-Itch (BD Transduction Laboratories)	Souris	1:1000
Nedd4	Anti-Nedd4, WW2 domain (Millipore)	Lapin	1:10 000

TABLEAU II. Anticorps secondaires utilisés pour les expériences d'immunobuvardage

Protéine cible	Nom commercial (manufacturier)	Espèce hôte	Concentration utilisée
IgG souris	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)	Chèvre	1:1000
IgG lapin	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)	Chèvre	1:1000

IgG : immunoglobuline G

2.1.7. Interaction entre Itch, Nedd4, WWP1, WWP2 et LITAF WT et LITAF 2Y

Les ligases YFP-Itch, YFP-Nedd4, YFP-WWP1 et YFP-WWP2 ont été transfectées dans des cellules HEK-293T, puis incubées à des conditions physiologiques pendant 48h. Ensuite, les protéines de fusion GST-LITAF WT et GST-LITAF 2Y ont été liées à des billes de Sepharose couplées au glutathion. Après incubation avec les billes liées aux protéines de fusion, ces dernières ont été lavées trois fois avec la solution d'extraction et déposées sur gel. Une fraction de l'extrait cellulaire a également été déposée sur gel afin de témoigner de

l'expression des protéines. L'interaction entre les ligases et les deux variantes de LITAF a pu être vérifiée à l'aide d'immunobuvardages effectués avec l'anticorps anti-GFP.

2.1.8. Taux de dégradation de Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline en présence de LITAF WT, LITAF 2Y et du MG132

La portion N-terminale de LITAF WT ou LITAF 2Y a été obtenue par purification avec des billes de Sepharose couplées au glutathion, puis éluées des billes par une incubation dans une solution contenant 5 mM de glutathion. Des extraits de cellules HEK-293T ont été obtenus et incubés avec 40 µg/mL de LITAF WT ou LITAF 2Y purifié. Du MG132 et/ou des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés au mélange. Après 2 ou 16 heures d'incubation, les extraits ont été déposés sur gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), transférés sur membrane et les protéines d'intérêt révélées par immunobuvardage.

2.1.9. Autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2 suite à leur surexpression et à celle de l'ubiquitine, en présence de LITAF WT

YFP-Itch, YFP-Nedd4, YFP-WWP1 et YFP-WWP2 ainsi que l'ubiquitine en fusion avec HA ont été transfectés dans des cellules HEK-293T. FLAG-LITAF WT a été surexprimé dans la moitié des cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48h à des conditions physiologiques. Des pull-down ont ensuite été effectués avec des motifs d'interaction avec l'ubiquitine (*ubiquitin interacting motif*; UIM) fusionnés à GST pour récupérer toutes les protéines ubiquitylées. Afin de déceler la présence des ligases, un immunobuvardage utilisant l'anticorps anti-GFP a été effectué.

2.1.10. Autoubiquitylation de Itch et Nedd4 présents à des niveaux endogènes, ainsi que de l'endophiline, en présence de LITAF WT ou LITAF 2Y

FLAG-LITAF WT et GFP-LITAF 2Y ont été transfectés dans des cellules HEK-293T, qui ont ensuite été incubées à des conditions physiologiques pendant 48h. Les protéines ubiquitylées ont ensuite été extraites à l'aide de protéines de fusion reconnaissant l'ubiquitine : GST-STAM-UIIM, GST-RAD23 et GST-RPN10. La protéine GST seule a pour sa part été utilisée en tant que contrôle négatif. Des immunobuvardages ont ensuite été réalisés à l'aide de l'anticorps approprié (anti-Itch pour Itch, anti-Nedd4 pour Nedd4, et anti-endophiline pour l'endophiline) afin de quantifier les ligases.

2.2. Expériences d'ubiquitylation *in vitro*

Une réaction d'ubiquitylation *in vitro* comprend 2 μ M de substrat (c-Jun ou l'endophiline) auquel on ajoute 100 nM de l'enzyme UBE1 (E1), 2 μ M de l'enzyme UBE2L3 (E2), 2 μ M de la ligase Itch (E3), 50 μ M d'ubiquitine et 4 mM d'ATP. La réaction se déroule à température pièce pendant 90 minutes dans un tampon Tris 40 mM pH 7,1, NaCl 40 mM, bêta-mercaptoéthanol 1 mM et MgCl₂ 5 mM. À ces conditions contrôles, nous avons ajouté 5 μ g de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Toutes les protéines ont été purifiées de bactéries exprimant les différentes protéines de fusion avec GST éluées des billes de Sepharose couplées au glutathion, sauf UBE1, UBE2L3 et l'ubiquitine qui ont été obtenues de la compagnie UBP-Bio.

La résultat de la réaction a été déposé sur gel SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose. L'ubiquitylation des substrats a été révélée par immunobuvardage et est visible par l'apparition de formes de plus haut poids moléculaire de la protéine substrat.

2.2.1. Expression des protéines d'intérêt

Les réactions d'ubiquitylation *in vitro* nécessitent des protéines recombinantes étant produites par des bactéries. Ainsi, nous avons mis en culture des bactéries *E. coli* BL21 et DH5 α comprenant le vecteur pGEX-4T1 recombiné avec les séquences qui codent l'endophiline A1, c-Jun, Itch, LITAF WT et LITAF 2Y. On peut ainsi produire les protéines de fusion désirées avec le marqueur GST dans leur portion N-terminale.

Les étapes initiales sont les mêmes que pour l'extraction des protéines de fusion pour les expériences *in vivo*. Après avoir ajouté le triton, les échantillons sont placés sur un agitateur au réfrigérateur à 4 °C pendant 20 minutes, puis ils sont centrifugés 15 minutes à une vitesse de 10 000 RPM. On récupère ensuite les surnageants pour pouvoir purifier les protéines d'intérêt.

2.2.2. Purification des protéines d'intérêt

Pour pouvoir récupérer les protéines de fusion marquées avec le tag GST, des billes de Sepharose couplées au glutathion ont été utilisées. Ces billes ont été lavées avec une solution de PBS puis ont été mises dans les surnageants contenant les protéines d'intérêt pour une durée d'une heure à température pièce (20 °C). Les protéines de fusion peuvent ainsi être récupérées grâce au marqueur GST qui a une forte affinité pour le glutathion. Suite à l'incubation, les échantillons sont lavés à 3 reprises avec du PBS, puis un tampon d'élution

(glutathion 5 mM - Tris-Cl 50 mM pH 7,4 - pH 8,3) est utilisé pour récupérer les protéines d'intérêt. Afin de pouvoir aller chercher le plus de protéines possible, cette étape a été répétée 2 autres fois. On peut ensuite vérifier, grâce à un mini-gel SDS-PAGE 10%, si les protéines ont bien été purifiées (voir les étapes de la quantification sur mini-gel pour les expériences *in vivo*).

2.2.3. Réactions d'ubiquitylation *in vitro*

Afin d'effectuer la réaction d'ubiquitylation de 20 μ L *in vitro*, 2 μ M d'endophiline et de c-Jun ont été utilisés, 100 μ M d'enzyme activatrice UBE1 (E1), 2 μ M d'enzyme de conjugaison UBE2L3 (E2), 2 μ M de la ligase de l'ubiquitine Itch (E3), 50 μ M d'ubiquitine, 4 mM d'ATP et un tampon (Tris 40 mM pH 7,1 - NaCl 40 mM - β ME 1 mM - MgCl₂ 5 mM). Selon la réaction à effectuer, 1,25 μ M de LITAF WT ou de LITAF 2Y a été ajouté. Le TABLEAU III montre les différentes conditions testées.

TABLEAU III. Conditions testées pour les réactions d'ubiquitylation *in vitro*

Substrat	Endophiline				c-Jun			
Itch	-	+	+	+	-	+	+	+
LITAF	-	-	WT	2Y	-	-	WT	2Y

Par la suite, les échantillons ont été incubés à une température de 30 °C pour une durée d'1h30. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de LSB. Les produits ont finalement été migrés sur un gel de polyacrylamide et le tout a été révélé par immunobuvardage.

3. Résultats

3.1. Expériences *in vivo*

3.1.1. Interaction entre LITAF et différentes ligases de la famille Nedd4

LITAF contient deux motifs PPXY lui permettant d'interagir avec Nedd4 et Itch (Jolliffe *et al.*, 2000; Eaton *et al.*, 2011). Pour vérifier si les ligases WWP1 et WWP2, qui sont issues du même gène ancestral que Itch, peuvent aussi interagir avec LITAF, nous avons effectué une expérience d'interaction protéine-protéine. Des protéines de fusion GST-LITAF WT ou GST-LITAF 2Y où les deux motifs PPXY sont altérés pour inhiber l'interaction avec les domaines WW des ligases ont été utilisées. Cette inactivation est possible en mutant les résidus tyrosine à la 23^e et à la 61^e position en alanine. Les protéines de fusion ont été liées à des billes de Sepharose couplées au glutathion afin de vérifier si ces billes pouvaient récupérer les différentes ligases d'un extrait protéique. Les quatre ligases de l'ubiquitine en fusion avec la protéine YFP ont été produites par transfection de cellules HEK-293T. Des pull-down ont ensuite été réalisés avec GST-LITAF WT et GST-LITAF 2Y sur les extraits de cellules HEK-293T transfectés, puis la liaison des ligases aux protéines GST-LITAF vérifiée par des immunobuvardages utilisant l'anticorps anti-GFP.

La Figure 15 permet de voir que LITAF WT interagit avec les 4 ligases de l'ubiquitine à domaine HECT, soit Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2, alors qu'aucune interaction n'est décelée avec le mutant LITAF 2Y. LITAF WT semble interagir davantage avec Itch, WWP1 et WWP2 qu'avec Nedd4, compte tenu du fait que les quantités des quatre ligases étaient similaires dans le lysat cellulaire, et que moins de Nedd4 a été récupéré sur les billes.

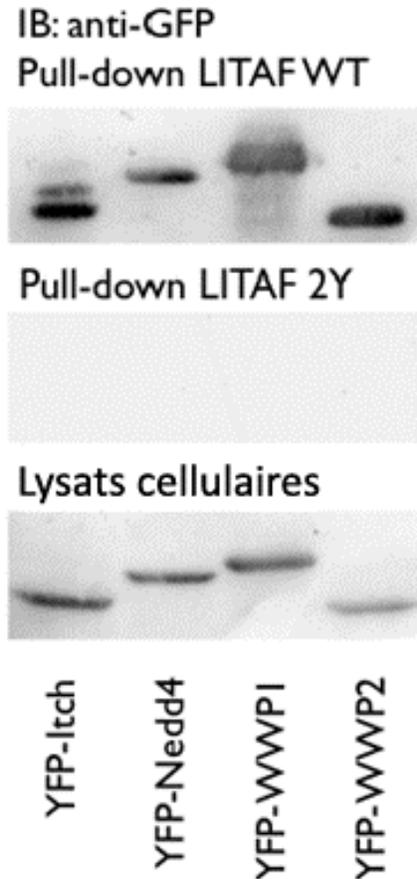


Figure 15. Interaction entre Itch, Nedd4, WWP1, WWP2 et LITAF WT et LITAF 2Y. Le panneau du haut montre les protéines de fusion YFP récupérées par les billes liées à GST-LITAF WT. Le panneau du milieu montre qu'aucune des fusions YFP n'est récupérée par le mutant GST-LITAF 2Y. Le panneau du bas montre le niveau d'expression des fusions YFP dans les lysats cellulaires. IB : immunoblot. (Guillaume Desrochers, communication personnelle).

3.1.2. LITAF induit la dégradation spécifique des protéines Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline

Lors d'observations antérieures au laboratoire, il a été noté que les cellules surexprimant LITAF montraient un niveau plus bas de la protéine Itch (Eaton *et al.*, 2011). Certaines protéines interagissant avec les domaines WW des ligases agissent comme des activateurs et stimulent l'activité ligase (Mund *et al.*, 2010). Sachant que les ligases de

l'ubiquitine Itch et Nedd4 interagissent avec LITAF, nous avons vérifié si la présence de LITAF a un impact sur l'activité de Itch et Nedd4 en mesurant leur dégradation et celle de certains substrats connus en présence de LITAF WT ou LITAF 2Y. Pour ce faire, nous avons produit des protéines de fusion des portions N-terminales de GST-LITAF WT ou GST-LITAF 2Y que nous avons ajoutées à des extraits cellulaires en présence ou non d'inhibiteurs du protéasome (MG132) ou d'inhibiteurs de protéases généraux. Les quantités cellulaires des ligases et des substrats ont par la suite été vérifiées par immunobuvardage.

La Figure 16 montre le taux de dégradation de 2 ligases de l'ubiquitine (Itch et Nedd4) ainsi que de 2 substrats de Itch (c-Jun et endophiline) en réponse à LITAF WT ou LITAF 2Y et à la présence ou absence de MG132.

On remarque que Itch est fortement dégradé suite à l'incubation avec LITAF WT, alors que sa dégradation est beaucoup moins notable en présence de LITAF 2Y. La présence de MG132 réduit le taux de dégradation de la ligase. L'effet est moins prononcé du côté de Nedd4, où la différence du taux de dégradation de la ligase en présence de LITAF WT et LITAF 2Y est beaucoup plus subtile, voire absente, particulièrement après une incubation de 2 heures. Cependant, l'incubation prolongée avec inhibition laisse voir que Nedd4 est davantage dégradé en présence de LITAF WT qu'en présence de LITAF 2Y, bien que la différence soit moins décelable qu'avec Itch. Encore une fois, l'inhibiteur MG132 réduit le taux de dégradation de la ligase. Ces résultats suggèrent donc que LITAF peut effectivement stimuler la dégradation protéasomale de Itch et Nedd4, avec une plus grande efficacité pour Itch, ce qui suggère une augmentation de l'activité autocatalytique des ligases.

Du côté des substrats de Itch, c-Jun semble très rapidement dégradé en présence de LITAF WT comparativement à LITAF 2Y, et ceci se remarque notamment après une incubation de 2 heures sans inhibition et une incubation prolongée avec inhibition. Le MG132 réduit le taux de dégradation du substrat, ce qui montre que l'ubiquitylation de c-Jun est probablement en cause. La différence est beaucoup moins notable avec l'endophiline, où seule l'incubation prolongée sans inhibition laisse voir une dégradation plus prononcée en présence de LITAF WT qu'en présence de LITAF 2Y. Le MG132 diminue grandement le taux de dégradation. Les résultats obtenus suggèrent donc que LITAF active davantage l'ubiquitylation de c-Jun que celle de l'endophiline.

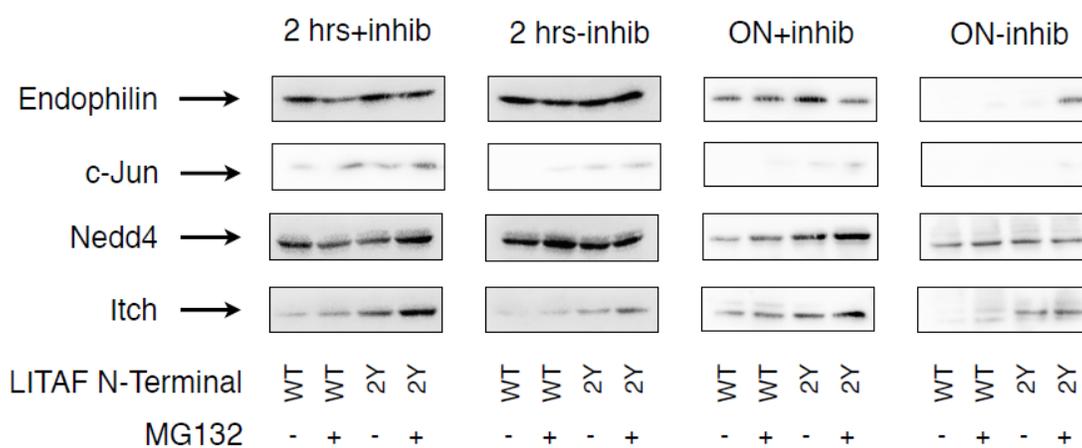


Figure 16. Taux de dégradation de Itch, Nedd4, c-Jun et de l'endophiline en présence de LITAF WT, LITAF 2Y et du MG132. Première colonne : résultats après une incubation de 2h avec inhibiteurs de protéases; deuxième colonne : résultats après une incubation de 2h sans inhibiteurs; troisième colonne : résultats après une incubation d'une nuit entière avec inhibiteurs; quatrième colonne : résultats après une incubation d'une nuit entière sans inhibiteurs. ON : *overnight* (incubation prolongée). (Guillaume Desrochers, communication personnelle).

3.1.3. LITAF cause l'autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2

Puisque la dégradation de Itch et Nedd4 est accélérée en présence de LITAF et que cette dégradation dépend du protéasome, il est probable que la liaison de LITAF augmente leur activité ligase. Une façon de démontrer l'activation des ligases de l'ubiquitine est d'observer leur autoubiquitylation, c'est-à-dire le mécanisme par lequel les ligases s'ubiquitylent elles-mêmes. Pour vérifier cela, les différentes ligases (Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2 en fusion avec YFP) ont été transfectées à l'intérieur de cellules HEK-293T, de même que l'ubiquitine. La protéine LITAF était également surexprimée dans la moitié des cellules, l'autre moitié servant de contrôle. Nous avons ensuite extrait l'ensemble des protéines ubiquitylées à l'aide de protéines de fusion entre la GST et différents motifs d'interaction avec l'ubiquitine. Finalement, la présence des différentes ligases dans la fraction de protéines ubiquitylées a été vérifiée par immunobuvardage avec un anticorps anti-GFP.

La Figure 17 montre que les 4 ligases de l'ubiquitine à domaine HECT sont ubiquitylées en présence de LITAF, mais pas dans les cellules contrôle.

On remarque que la quantité de Nedd4 ubiquitylée en présence de LITAF est très inférieure à Itch et WWP1, bien que les ligases soient présentes en quantités comparables dans les lysats cellulaires. Pour ce qui est de la ligase WWP2, bien qu'elle soit plus exprimée dans le lysat cellulaire, sa forme ubiquitylée est présente en quantité comparable aux autres ligases. À la lumière de ces résultats, on peut donc penser que LITAF active plus faiblement Nedd4 que les autres ligases, ce qui reflète la plus faible interaction entre LITAF et Nedd4 qu'entre LITAF et Itch, WWP1 et WWP2 ainsi que la dégradation moindre de Nedd4.

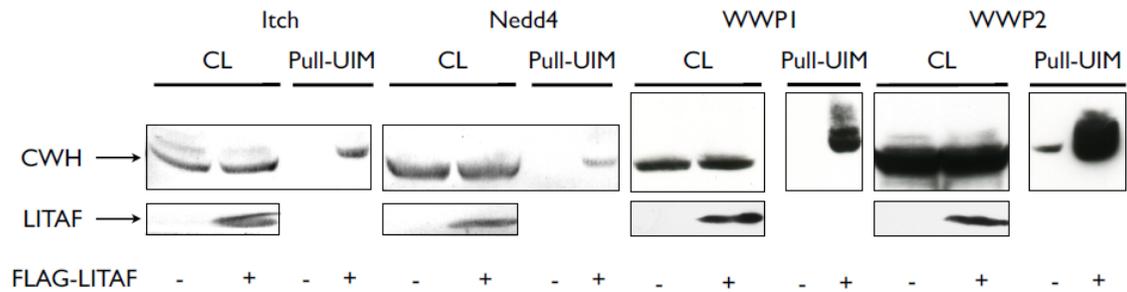


Figure 17. Autoubiquitylation de Itch, Nedd4, WWP1 et WWP2 suite à leur surexpression et à celle de l'ubiquitine, en présence de LITAF WT. Première rangée : autoubiquitylation des ligases en présence ou en absence de FLAG-LITAF WT; deuxième rangée : quantité de FLAG-LITAF WT dans le lysat cellulaire; troisième rangée : présence ou absence de FLAG-LITAF WT. CL : *cell lysate* (lysate cellulaire). (Guillaume Desrochers, communication personnelle).

3.1.4. LITAF cause l'ubiquitylation de Itch, Nedd4 et de l'endophiline présents à des niveaux endogènes

La surexpression seule des ligases de l'ubiquitine peut parfois mener à leur autoubiquitylation, comme on peut le voir avec WWP2 pour qui la surexpression était plus importante (Figure 17). Pour vérifier l'authenticité des résultats d'autoubiquitylation des ligases, une expérience semblable a été menée, mais sans surexprimer les ligases, Itch et Nedd4 étant présents à des niveaux détectables dans les cellules HEK-293T. FLAG-LITAF WT et GFP-LITAF 2Y ont donc été transfectés dans des cellules HEK-293T, avant de procéder à l'extraction des protéines ubiquitylées avec les différentes protéines de fusion GST-STAM-UIM, GST-RAD23 et GST-RPN10. La protéine GST seule est utilisée en tant que témoin négatif. Ces protéines ont toutes été liées à des billes de Sepharose couplées au glutathion au préalable. Des immunobuvardages ont ensuite été effectués pour vérifier l'autoubiquitylation des ligases.

La Figure 18 permet de voir qu'en présence de LITAF WT, il y a autoubiquitylation de Itch, particulièrement visible dans l'extrait obtenu avec RAD23, bien que l'autoubiquitylation soit aussi présente mais de façon moins prononcée à la suite des pull-down avec RPN10 et STAM-UIM. En présence du mutant LITAF 2Y, on ne remarque aucune autoubiquitylation de Itch, bien que la quantité de Itch était beaucoup plus élevée du côté de LITAF 2Y.

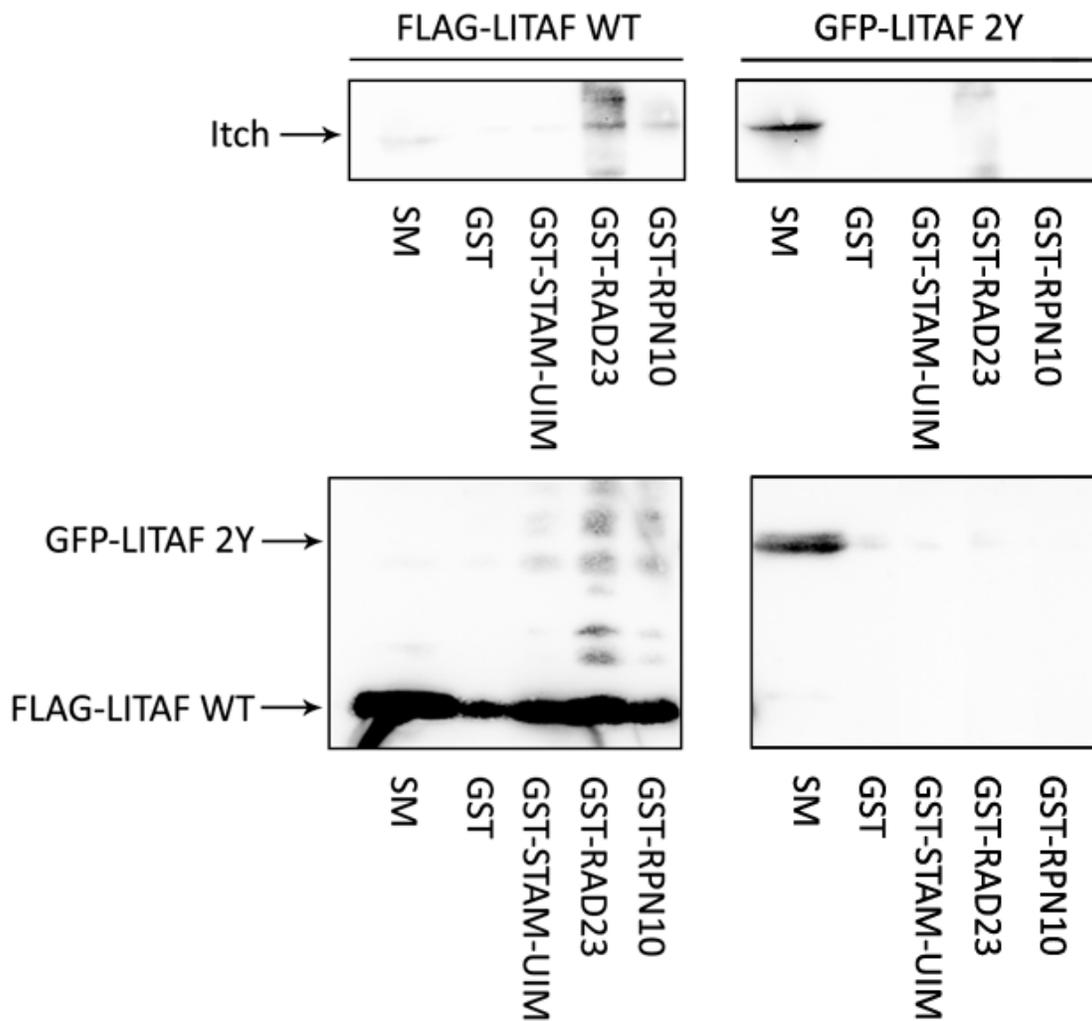


Figure 18. Autoubiquitylation de Itch présent à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : *standard material* (lysate cellulaire).

Du côté de Nedd4, la Figure 19 laisse voir une autoubiquitylation notable de la ligase en présence de LITAF WT, que ce soit avec le pull-down GST-RAD23, GST-RPN10 ou GST-STAM-UIM. Cependant, l'autoubiquitylation de Nedd4 est moins prononcée que celle de Itch, sachant que Itch était présent en moins grande quantité dans le SM. Aucune autoubiquitylation de Nedd4 n'est aperçue en présence de LITAF 2Y, et ce, avec n'importe quel pull-down.

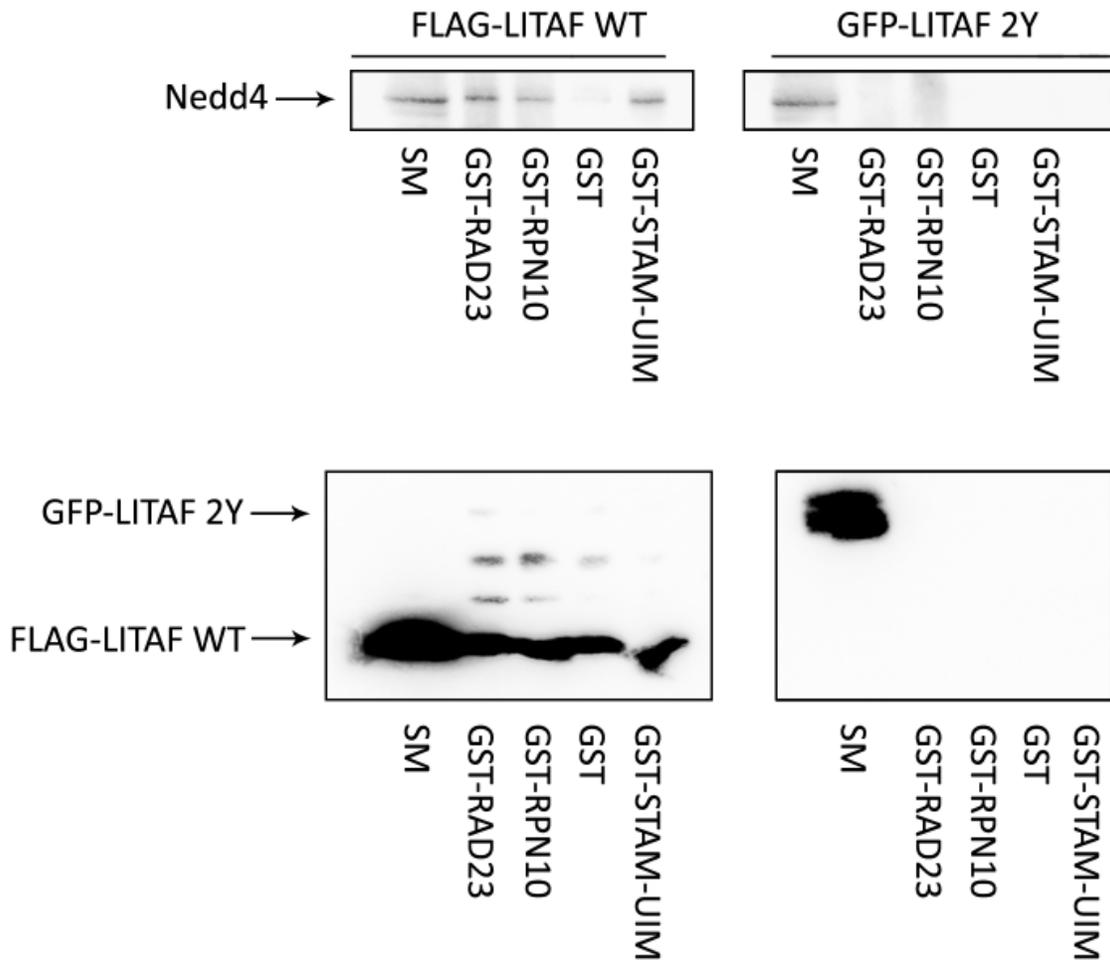


Figure 19. Autoubiquitylation de Nedd4 présent à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : *standard material* (lysate cellulaire).

Les résultats obtenus en présence de quantités endogènes de Itch et Nedd4 viennent donc confirmer ceux obtenus suite à la surexpression des ligases. Ces ligases sont bien autoubiquitylées en présence de LITAF, mêmes lorsqu'elles sont présentes à des quantités normales dans la cellule.

La même expérience a été menée afin de vérifier l'ubiquitylation d'un substrat déjà connu de Itch, l'endophiline. Comme on peut le voir sur la Figure 20, aucune ubiquitylation du substrat n'a pu être remarquée en présence de LITAF WT ou en présence de LITAF 2Y, et ce, pour tous les pull-down. Ceci concorde avec les résultats observés suite à l'expérience de dégradation (Figure 16), où Itch ne semblait pas augmenter de façon notable l'ubiquitylation de l'endophiline en réponse à LITAF. Nous avons également tenté de détecter l'ubiquitylation de c-Jun, mais n'avons pas réussi à détecter la protéine dans les cellules surexprimant LITAF, possiblement à cause de sa dégradation rapide montrée à la Figure 16.

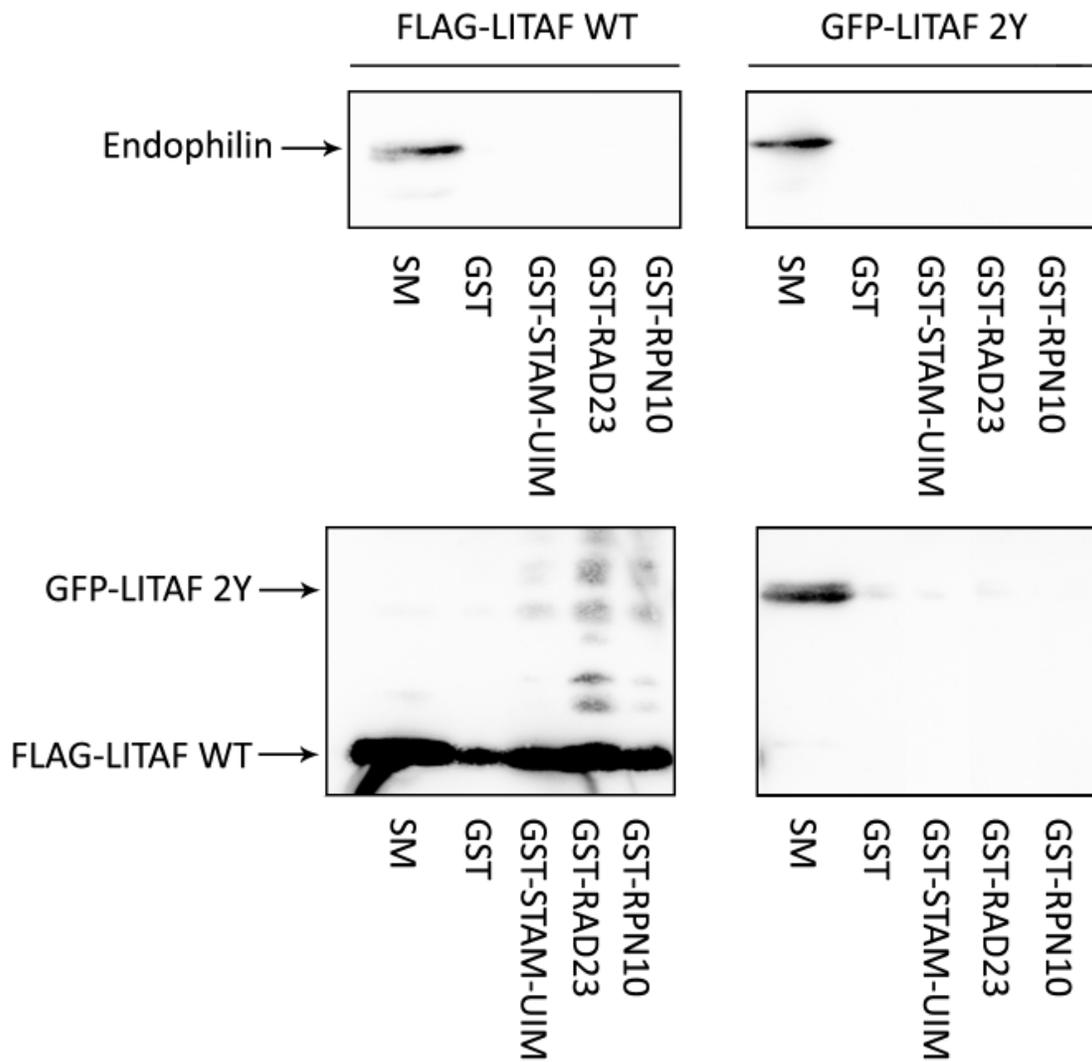


Figure 20. Ubiquitylation de l'endophiline présente à des niveaux endogènes, en présence de LITAF WT ou de LITAF 2Y. Les protéines interagissant avec l'ubiquitine et ayant été utilisées pour les pull-down sont STAM-UIM, RAD23 et RPN10. GST sert de témoin. SM : *standard material* (lysate cellulaire). Les panneaux du bas sont les mêmes que pour la Figure 18, car il s'agit de la même expérience.

3.2. Expériences *in vitro*

3.2.1. Influence de LITAF sur l'autoubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de c-Jun et de l'endophiline

Comme on peut l'observer à la Figure 16 et dans la fraction lysat cellulaire de la Figure 18, la surexpression de LITAF entraîne une forte diminution du niveau de Itch dans les cellules. Dans ces conditions, il est probable que même si l'activité ligase de Itch est augmentée par la liaison de LITAF, l'effet global de cette activation sur les substrats de Itch ne puisse pas être perçu à cause de la perte de Itch. Ceci pourrait expliquer que l'ubiquitylation du substrat endophiline n'ait pas pu être observée à la Figure 20, le niveau restant de Itch dans les cellules étant trop faible pour induire un niveau détectable d'ubiquitylation. Pour éviter cet effet confondant, nous avons directement mesuré l'activité ligase de Itch en étant lié ou non à LITAF en procédant à des expériences d'ubiquitylation *in vitro*. Nous avons ainsi pu mesurer l'influence de la présence de LITAF sur l'activité de Itch envers elle-même et envers ses substrats c-Jun et endophiline.

La Figure 21A permet de constater que la présence de LITAF dans la réaction augmente sensiblement l'activité autocatalytique de Itch. En effet, la première piste montre l'activité de base de Itch et on remarque une bande très foncée et bien définie à environ 130 kDa, correspondant au poids moléculaire de la fusion GST-Itch. On peut aussi observer un peu plus haut des bandes de plus haut poids moléculaire et de plus faible intensité, correspondant à la monoubiquitylation et à la polyubiquitylation de Itch.

Des résultats identiques sont obtenus dans la troisième piste, où la réaction se déroule en présence de LITAF 2Y. Ce dernier étant un mutant de LITAF dont les motifs PPXY ont été

modifiés et incapable de se lier à Itch, il est logique d'y observer le même taux d'autoubiquitylation de Itch qu'en absence de LITAF.

En présence de LITAF WT (deuxième piste), l'autoubiquitylation de Itch augmente grandement. En effet, on observe que la bande se situant aux alentours de 130 kDa est un peu moins intense, mais que les formes de plus haut poids moléculaire y sont plus fortement représentées.

Ces bandes ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 22), ce qui démontre que l'autoubiquitylation de Itch en présence de LITAF WT a doublé par rapport au contrôle, témoignant ainsi du fait que LITAF WT augmente l'activité catalytique de Itch.

La même expérience a été effectuée en présence de c-Jun, un substrat de Itch (Figure 21B). L'intensité initiale de c-Jun peut être observée dans la première piste, où Itch et LITAF sont tous les deux absents. On remarque une bande de forte intensité d'environ 65 kDa, correspondant au poids moléculaire de GST-c-Jun. Il n'y a donc pratiquement aucune ubiquitylation de c-Jun en absence de Itch.

L'ajout de Itch (deuxième piste) permet de constater une augmentation de l'ubiquitylation de c-Jun. En effet, on remarque l'apparition d'une bande d'environ 75 kDa, qui correspond à la monoubiquitylation du substrat, et une faible traînée est également visible au-dessus, correspondant cette fois à la polyubiquitylation du substrat. On constate donc que la présence de Itch induit l'ubiquitylation de c-Jun.

Le même constat peut être fait pour la quatrième piste, où c-Jun est en présence de Itch et de LITAF 2Y. On ne remarque pas d'augmentation prononcée de l'ubiquitylation de c-Jun par rapport à la deuxième bande, où c-Jun était en présence de Itch seul.

La troisième piste montre les effets de l'ubiquitylation de c-Jun lorsqu'il est en présence de Itch et LITAF WT. On observe une diminution de l'intensité de la bande se situant à 65 kDa, alors que la bande à 75 kDa est plus intense, montrant une augmentation de la monoubiquitylation de c-Jun. La traînée est également nettement plus intense, témoignant de l'augmentation de la polyubiquitylation de c-Jun. La mesure de l'intensité de ces bandes par densitométrie (Figure 22) montre que l'ubiquitylation de c-Jun est doublée en présence de LITAF WT par rapport au contrôle, c'est-à-dire dans des proportions pratiquement équivalentes à l'autoubiquitylation de Itch.

Ces résultats montrent donc que LITAF WT a bel et bien un effet activateur sur Itch, pouvant être démontré par l'augmentation de l'ubiquitylation (mono et poly) d'un des substrats de la ligase, c-Jun.

L'expérience a également été menée en présence d'endophiline, un autre substrat de Itch (Figure 21C), où une bande d'environ 65 kDa peut être observée sur la première piste, correspondant au poids moléculaire de GST-Endophiline. On peut constater que l'endophiline n'est pas ubiquitylée en absence de Itch car aucune autre bande de poids moléculaire supérieur ne peut être observée.

En ajoutant Itch (deuxième piste), l'intensité de la bande qui se trouve à 65 kDa diminue, mais on peut voir une traînée, qui signifie que des formes polyubiquitylées de l'endophiline sont présentes. On voit aussi une bande très foncée à environ 75 kDa, qui correspond à la monoubiquitylation de l'endophiline. On peut donc conclure que l'endophiline est ubiquitylée en présence de Itch.

Le même constat peut être fait sur la quatrième piste, où l'endophiline est mise en présence de Itch ainsi que du mutant LITAF 2Y. Cependant, contrairement à ce qui avait pu

être observé avec c-Jun, la présence de LITAF WT (troisième piste) n'augmente pas l'intensité de la traînée et donc des formes polyubiquitylées de l'endophiline, mais on observe même plutôt l'effet contraire.

De plus, comme démontré par densitométrie (Figure 22), l'ubiquitylation de l'endophiline n'est pas augmentée en présence de LITAF WT comparativement au contrôle, ce qui appuie les résultats obtenus *in vivo* (Figure 20), selon lesquels la présence de LITAF n'augmente pas l'ubiquitylation de l'endophiline par Itch.

Les résultats *in vivo* et *in vitro* obtenus suggèrent donc que LITAF n'influence pas positivement l'activité de Itch envers l'endophiline, alors que c'était le cas pour c-Jun. L'activation de Itch par LITAF semble donc dépendre du substrat étudié.

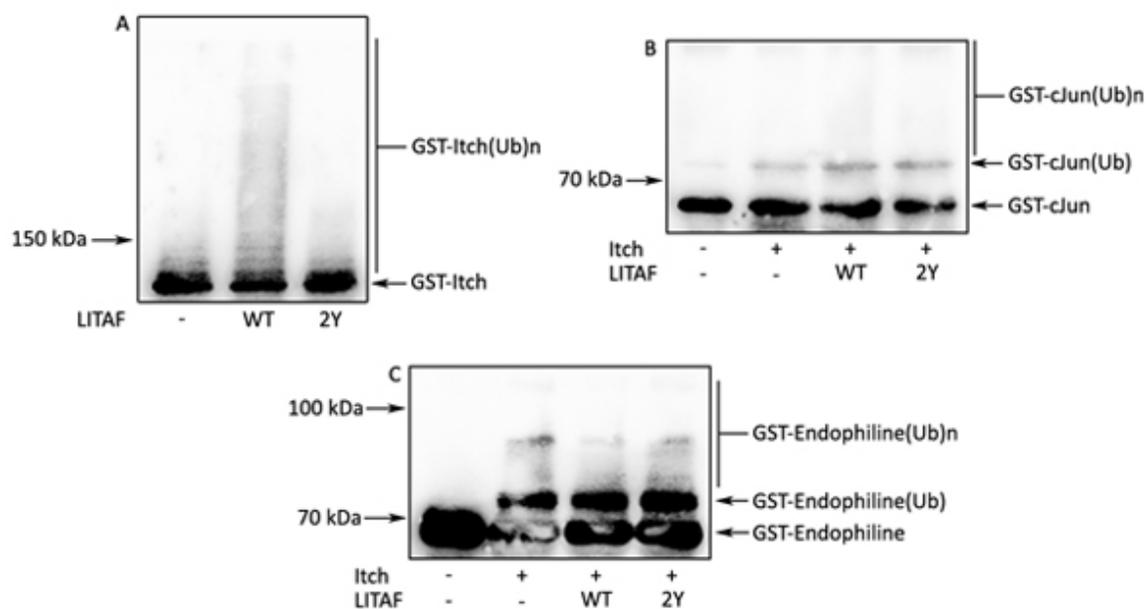


Figure 21. Influence de LITAF WT et LITAF 2Y sur l'autoubiquitylation de Itch et l'ubiquitylation de c-Jun et de l'endophiline *in vitro*. Le panneau A représente l'autoubiquitylation de Itch, la panneau B représente l'ubiquitylation de c-Jun et le panneau C représente l'ubiquitylation de l'endophiline. Ub : ubiquitine. (Annie Angers et Claire Gazaille, communication personnelle).

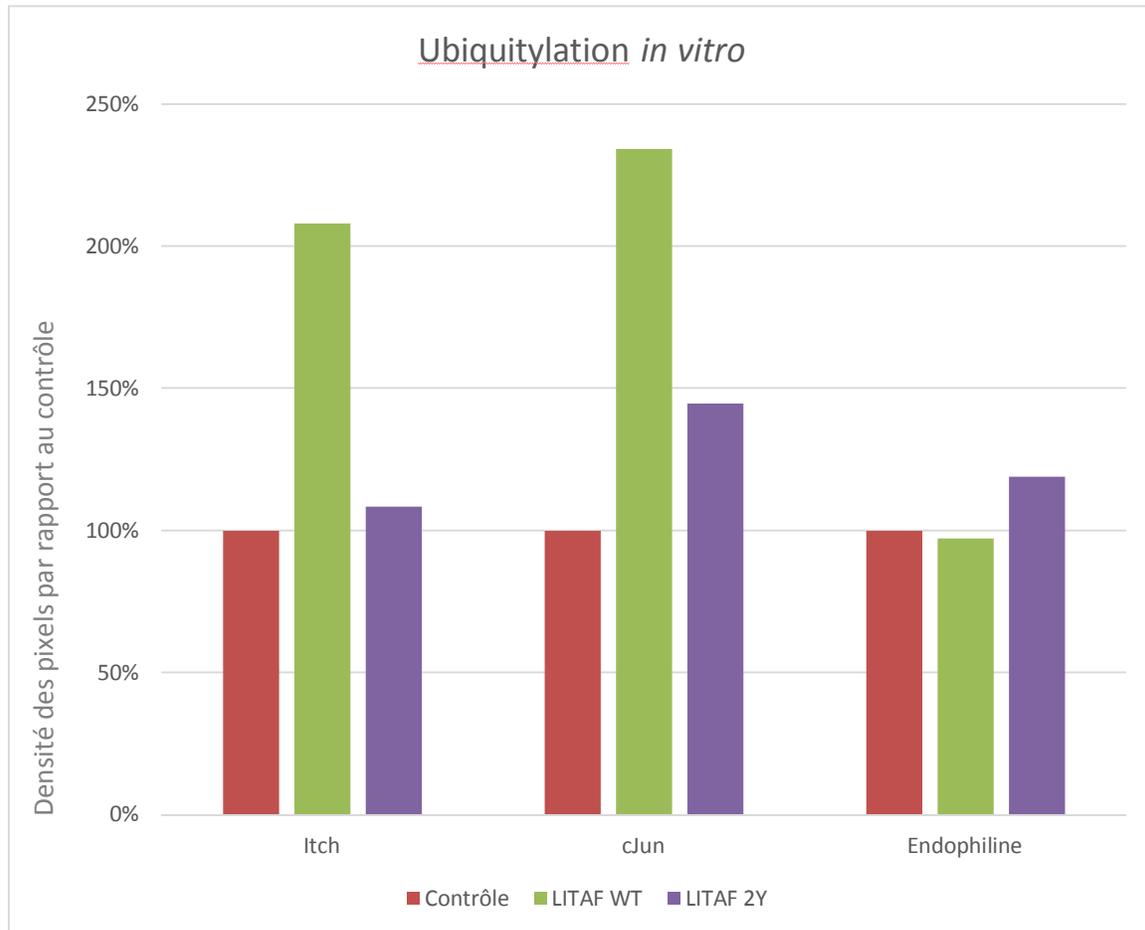


Figure 22. Analyse densitométrique des résultats d’ubiquitylation de Itch, de c-Jun et de l’endophiline sous l’influence de LITAF WT et LITAF 2Y *in vitro*. La quantité d’ubiquitylation provoquée par LITAF WT est en vert et la quantité d’ubiquitylation provoquée par LITAF 2Y est en violet. Le contrôle est en rouge. (Annie Angers et Claire Gazaille, communication personnelle).

4. Discussion

4.1. LITAF augmente l'activité autocatalytique des ligases de la famille Nedd4

4.1.1. Autoubiquitylation de Itch en présence de LITAF

Lors des manipulations initiales impliquant Itch et LITAF au laboratoire, il a été constaté que la co-expression des deux protéines menait souvent à une plus faible expression de Itch. Ces observations suggéraient que LITAF causait la dégradation de Itch, conformément aux observations de Mouchantaf *et al.* (2006) selon lesquelles Itch est bien dégradé dans la cellule suite à son autoubiquitylation. Mund *et al.* (2009) avaient d'ailleurs démontré l'autoubiquitylation de certaines ligases de la famille Nedd4 telles que Nedd4, Nedd4l, Itch, WWP1, WWP2 et Smurf2 par l'interaction avec les NDFIPs, des protéines qui interagissent également avec les domaines WW des ligases via leurs motifs PPXY. L'activation des ligases se traduit donc par leur taux d'autoubiquitylation et de dégradation. L'expérience sur le taux de dégradation (Figure 16) montre que l'ajout de la protéine LITAF recombinante accélère bel et bien la dégradation de Itch dans un extrait cellulaire après une durée de 2 heures. Inversement, en présence de LITAF 2Y, la dégradation de Itch est quasi nulle, montrant que l'interaction entre Itch et LITAF est nécessaire pour que la dégradation de Itch soit accélérée par LITAF. Ceci confirme les résultats obtenus par Eaton *et al.* (2011) où on dénotait une diminution de la quantité de Itch cellulaire en présence de LITAF.

Afin de vérifier si l'autoubiquitylation de Itch est la cause de sa dégradation, une expérience subséquente portant sur l'autoubiquitylation de la ligase a été menée en présence de LITAF (Figure 17). On constate que l'autoubiquitylation de Itch en présence de LITAF est

bien décelable suite aux résultats d'immunobuvardage puisqu'on distingue bien une bande, tandis qu'elle n'est pas présente en absence de LITAF, démontrant encore une fois que l'interaction entre LITAF et Itch est nécessaire pour l'activation de Itch. Le même constat peut être fait avec des quantités endogènes de Itch (Figure 18), où la ligase est autoubiquitylée en présence de LITAF, tandis qu'elle ne l'est pas en présence de LITAF 2Y.

Dans les expériences de dégradation (Figure 16) et d'autoubiquitylation (Figure 17), on constate à nouveau que la surexpression de LITAF cause une diminution des niveaux cellulaires de Itch. Cette baisse de la quantité de la ligase rend difficile l'interprétation des résultats, car même si LITAF augmente l'activité ligase de Itch, celle-ci ne pourrait pas être perçue lors des expériences à cause de la trop faible quantité de la ligase. Il importe donc de mener des expériences *in vitro* (Figure 21) pour pouvoir mesurer avec plus d'exactitude l'activité de Itch en présence de LITAF. Nos résultats ont pu démontrer que Itch est bel et bien autoubiquitylé en présence de LITAF et que cette autoubiquitylation est beaucoup plus difficilement décelable en absence de LITAF ou en présence de LITAF 2Y, confirmant ainsi les résultats obtenus *in vivo*. Ces observations sont conformes à celles de Mouchantaf *et al.* (2006), qui affirmaient que l'autoubiquitylation de Itch causait sa dégradation. De plus, nos résultats sont appuyés par une expérience de Mund *et al.* (2009) suggérant que les NDFIPs, des protéines dont la structure rappelle celle de LITAF dû à la présence des motifs PPXY, augmentent l'autoubiquitylation de différentes ligases de la famille Nedd4, dont Itch.

4.1.2. Comparaison avec Nedd4, WWP1 et WWP2

Sachant que les ligases WWP1 et WWP2 possèdent une structure très semblable à celle de Nedd4 et Itch (Benassola *et al.*, 2008) et sont évolutivement plus proches de Itch que n'importe quelle autre ligase de la famille Nedd4 (Marin, 2010), une interaction entre celles-ci et LITAF devrait également être observée. Comme anticipé à cause de la conservation des domaines WW, WWP1 et WWP2 interagissent aussi avec LITAF (Figure 15), et comme le démontre l'absence d'interaction avec le mutant, cette interaction est médiée par les domaines WW, tel qu'il a été démontré pour Itch et Nedd4 (Jolliffe *et al.*, 2000; Eaton *et al.*, 2011). L'interaction semble cependant être plus forte entre LITAF et Itch, WWP1 et WWP2 qu'entre LITAF et Nedd4. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le deuxième motif PPXY de LITAF n'est nécessaire pour l'interaction avec aucun des trois domaines WW de Nedd4 (Jolliffe *et al.*, 2000). Ces observations sont d'ailleurs supportées par le fait que la localisation de Nedd4 n'est pas affectée suite à son interaction avec LITAF, alors que c'est le cas pour Itch (Eaton *et al.*, 2011).

Contrairement à Itch, la présence de LITAF ne semble pas avoir un effet marqué sur la dégradation de Nedd4 après 2 heures (Figure 16), que ce soit en présence ou en absence du MG132 et des inhibiteurs de protéases classiques. Bien qu'une interaction entre LITAF et Nedd4 ait auparavant été démontrée (Shirk *et al.*, 2005), on sait que seul le premier motif PPXY de LITAF est nécessaire pour l'interaction entre les deux protéines (Jolliffe *et al.*, 2000). Ceci pourrait donc laisser entrevoir une plus faible interaction entre LITAF et Nedd4 qu'entre LITAF et Itch, et donc un taux de dégradation moins marqué. Il est important de préciser que la dégradation de Nedd4 est davantage visible après une incubation prolongée, ce qui est compatible avec l'observation de la plus faible interaction. Le temps requis pour son

activation ainsi que sa dégradation est donc plus long et cette dégradation est d'ailleurs bien moins marquée que dans le cas de Itch.

L'expérience portant sur l'autoubiquitylation (Figure 17) a pu montrer que la dégradation de Itch et de Nedd4 en présence de LITAF est bel et bien due à leur autoubiquitylation, avec une ubiquitylation considérablement plus forte du côté de Itch que de Nedd4, même si Nedd4 était présent en plus grande quantité dans le lysat cellulaire. Ceci prouve que Itch est davantage sensible que Nedd4 aux interactions avec LITAF. Par ailleurs, en absence de LITAF, on ne perçoit aucune autoubiquitylation de Itch ou Nedd4, montrant que LITAF est bel et bien responsable de l'activation et de l'augmentation du taux d'autoubiquitylation des ligases. Il importe cependant de préciser que bien qu'aucune autoubiquitylation des ligases ne soit observée, il existe probablement un taux de base d'ubiquitylation qui aurait pu être observé si les membranes avaient été exposées plus longtemps. En revanche, ce qui est sûr, c'est qu'en présence de LITAF cette autoubiquitylation est beaucoup plus élevée, car on la perçoit facilement dans des conditions où le taux de base n'est pas encore visible.

La même expérience a été menée du côté de WWP1 et WWP2 (Figure 17), des ligases qui sont structurellement très proches de Itch (Marin, 2010). Les ligases sont présentes en quantités comparables, avec une dominance de WWP2, et leur autoubiquitylation est très facilement décelable en présence de LITAF. Bien qu'une autoubiquitylation de WWP1 soit absente en absence de LITAF, on remarque une faible autoubiquitylation de WWP2 en absence de LITAF, ce qui suggère que d'autres mécanismes seraient responsables de l'activation de WWP2 et de son autoubiquitylation. On peut aussi penser que ceci résulte du

fait que WWP2 est présent en plus grande quantité que les autres ligases dans le lysat cellulaire et que la surexpression des ligases entraîne leur autoubiquitylation.

En somme, ces résultats suggèrent que LITAF permet d'activer Itch, Nedd4, WWP1, WWP2 et causer leur autoubiquitylation puis leur dégradation dans le cas de Itch. Il y a cependant une préférence pour Itch, WWP1 et WWP2. Il serait intéressant de vérifier si l'autoubiquitylation de WWP1 et de WWP2 en présence de LITAF mène à leur dégradation, puisque ces expériences n'ont pas été concluantes dans notre laboratoire. WWP1 est en effet faiblement exprimé dans les cellules HEK-293T alors que WWP2 ne l'est pas du tout (*The Human Protein Atlas*, 2014).

Une expérience réalisée avec des quantités endogènes de Nedd4 (Figure 19) a également été menée afin de comparer les résultats d'autoubiquitylation avec Itch endogène. Cette expérience permet d'écarter toute possibilité d'ubiquitylation pouvant être liée à la surexpression des ligases. Ainsi, il a été possible de vérifier que Nedd4 est bien autoubiquitylé en présence de LITAF mais non en présence de LITAF 2Y. Cette fois encore, la ligase est autoubiquitylée à des quantités inférieures à Itch en présence de LITAF, en tenant compte du fait que Nedd4 est présent en de plus grandes quantités dans le lysat cellulaire. Ce résultat démontre donc qu'à des quantités endogènes, LITAF possède une préférence pour Itch, comme lorsque les ligases étaient surexprimées. Ceci s'explique par le fait que seul le premier motif PPXY de LITAF interagit avec Nedd4 (Jolliffe *et al.*, 2000), tandis que les deux motifs PPXY de LITAF interagissent avec Itch (Eaton *et al.*, 2011), ce qui mène à une plus forte interaction entre LITAF et Itch qu'entre LITAF et Nedd4, et donc une plus forte autoubiquitylation de Itch.

Ces résultats observés avec des quantités endogènes de ligases appuient donc les résultats obtenus lorsque les ligases étaient surexprimées. En effet, Itch et Nedd4 sont bien autoubiquitylés en présence de LITAF, et la protéine semble interagir plus fortement avec Itch.

4.1.3. Comparaison avec les autres activateurs

Tel que déjà mentionné, d'autres protéines, outre LITAF, permettent d'augmenter l'activité des ligases en les faisant passer de leur conformation inactive à leur conformation active. On peut notamment penser aux protéines NDFIPs, plus précisément NDFIP1 et NDFIP2, qui peuvent augmenter l'activité autocatalytique de Itch et Nedd4 en leur permettant d'adopter une conformation active (Mund *et al.*, 2009). Le mécanisme exact selon lequel LITAF active Itch n'a pas été étudié précisément, mais il est probable qu'il soit très semblable à celui des NDFIPs, sachant que LITAF et NDFIP1/2 possèdent tous des motifs PPXY interagissant avec les domaines WW des ligases à domaine HECT, à la différence que LITAF possède 2 motifs PPXY responsables de ces interactions et que NDFIP1/2 en possèdent 3 (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2004). On peut donc penser que comme pour les NDFIPs, l'interaction entre LITAF et Itch permet le dépliement du domaine HECT, et que c'est ce phénomène qui permet d'augmenter l'activité ligase de Itch (Mund *et al.*, 2009).

Par ailleurs, puisque les NDFIPs possèdent un motif PPXY de plus que LITAF (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2004), il serait intéressant de voir si l'interaction entre NDFIP1/2 et les ligases de la famille Nedd4 est plus forte qu'entre LITAF et ces ligases. On sait d'ores et déjà que le deuxième motif PPXY de LITAF n'est pas nécessaire pour l'interaction avec Nedd4 (Jolliffe *et al.*, 2000), mais qu'en est-il des NDFIPs? Si l'interaction entre NDFIP1/2 et

Itch/Nedd4 est effectivement plus forte, on devrait observer une plus grande activité autocatalytique, mais aussi une plus grande activité catalytique des ligases. Les protéines NDFIPs pourraient donc potentiellement permettre à Itch et Nedd4 d'ubiquityler davantage leurs substrats, causant ainsi leur dégradation.

Comme pour LITAF, on sait que NDFIP1/2 se localisent aux lysosomes (Ohzono *et al.*, 2010). Sachant que l'interaction entre LITAF et Itch permet la translocation de ce dernier aux lysosomes (Eaton *et al.*, 2011), il est possible que ce phénomène puisse également être observé dans le cas des NDFIPs. En effet, Mund *et al.* (2009) ont montré que Nedd4 est recruté par NDFIP2 dans un compartiment vésiculaire qui pourrait être le lysosome et/ou l'endosome tardif. En présence d'un mutant de NDFIP2 dont les domaines PPXY ont été inactivés, Nedd4 reste plutôt cytoplasmique. NDFIP1/2, à la manière de LITAF, pourraient donc être impliqués dans la dégradation de Itch aux lysosomes, comme cela semble être le cas pour Nedd4. La translocation de Itch aux lysosomes pourrait être une façon de réguler à la baisse la quantité de la ligase, l'empêchant d'ubiquityler certains de ses substrats.

Numb, une protéine impliquée dans la différenciation cellulaire lors du développement neural, est un autre activateur de Itch. Contrairement à LITAF et aux NDFIPs, Numb active Itch via une partie de son domaine PTB (*phosphotyrosine-binding domain*), qui interagit cependant avec le même site d'interaction, c'est-à-dire le domaine WW2 de Itch (Di Marcotullio *et al.*, 2011). L'interaction entre les deux protéines permet notamment d'augmenter l'activité autocatalytique de Itch, qui se mesure par son taux d'autoubiquitylation. Les motifs PPXY ne sont donc pas les seuls responsables de l'activation de Itch et de l'augmentation de son activité autocatalytique. Il pourrait donc être intéressant de déterminer quel(s) domaine(s) WW permet(tent) à Itch de reconnaître LITAF.

4.2. LITAF et son influence sur la dégradation des substrats de Itch

Une autre façon de vérifier l'augmentation de l'activité ligase de Itch suite à son interaction avec LITAF est justement d'observer l'ubiquitylation de certains de ses substrats. Deux substrats connus de Itch ont donc été étudiés : c-Jun (Gao *et al.*, 2004) et l'endophiline (Angers *et al.*, 2004) pour voir les effets sur leur dégradation en présence de Itch et LITAF. Les résultats obtenus permettent de déterminer si LITAF peut agir en tant que régulateur de la dégradation de certains substrats de Itch et d'établir des hypothèse sur les impacts de cette régulation.

4.2.1. LITAF active la dégradation de c-Jun via Itch : impacts de la régulation du substrat

Nos résultats *in vivo* (Figure 16) indiquent qu'en présence de LITAF recombinant et de Itch, c-Jun est dégradé après 2h, et que cette dégradation est encore plus marquée après une incubation prolongée. Le même constat peut être fait suite aux expériences *in vitro* (Figure 21), où l'ubiquitylation de c-Jun par Itch est deux fois supérieure en présence de LITAF. Il est à noter que dans les expériences *in vivo*, l'ubiquitylation n'a pas été vue, mais le fait que c-Jun était indétectable suggère que la protéine avait été rapidement dégradée.

Suite à ces observations, il est intéressant de regarder les conséquences potentielles de la régulation de c-Jun par LITAF et Itch. c-Jun est un facteur de transcription qui joue un rôle capital dans la progression du cycle cellulaire, dans l'apoptose et dans le cancer (Wisdom *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 1999). Les cellules qui sont dépourvues de la protéine c-Jun voient souvent leur cycle cellulaire s'arrêter à la phase G1 (Wisdom *et al.*, 1999). Une dégradation

poussée de c-Jun mènerait donc à un arrêt de la prolifération cellulaire, alors que sa surexpression permettrait de l'accélérer. De plus, la régulation de c-Jun permettrait de moduler l'apoptose cellulaire, ce qui peut s'avérer être d'une grande importance dans le contrôle des cancers. En effet, la protéine empêche l'apoptose médiée par le TNF α dans les cellules du foie en bloquant l'activité proapoptotique de p53 (Eferl *et al.*, 2003). Par ailleurs, Shafiq *et al.* (2009) ont montré que Itch et c-Jun forment des complexes à l'intérieur des cellules en présence de la kinase JNK2 (*c-Jun N-terminal protein kinase 2*) en conditions basales. Ceci empêche c-Jun de réguler à la hausse sa propre transcription et permet la survie de diverses lignées de cellules cancéreuses. Cependant, la délétion de JNK2 abolit les complexes Itch-c-Jun et conduit à l'apoptose cellulaire (Shafiq *et al.*, 2009), ce qui explique que l'interaction entre Itch et c-Jun pourrait être essentielle pour la survie cellulaire. c-Jun joue aussi un rôle en tant que proto-oncogène (Wisdom *et al.*, 1999). Il est en effet surexprimé dans les cancers des poumons (Szabo *et al.*, 1996) et est impliqué dans la progression du cancer du sein (Jiao *et al.*, 2010). L'augmentation de la quantité de LITAF cellulaire pourrait potentiellement augmenter davantage l'activité catalytique de Itch et la dégradation de c-Jun et donc contrer ses effets sur le cancer. Notons aussi que c-Jun, conjointement avec JunB, sont essentiels pour la production de l'IL-4 et la différenciation des lymphocytes T_{H2}. Itch, en dégradant c-Jun, joue alors un rôle d'inhibiteur de l'IL-4 et donc de la différenciation des cellules T_{H2} (Gao *et al.*, 2004).

4.2.2. LITAF ne semble pas activer la dégradation de l'endophiline via Itch

Suite aux expériences *in vivo* (Figure 16), il a été possible de voir qu'en présence de LITAF et de Itch, l'endophiline est dégradée, mais que ceci est seulement décelable après une

incubation prolongée sans inhibiteurs de protéases classiques. Cette dégradation était bien plus marquée du côté de c-Jun. De plus, avec des quantités endogènes de Itch, l'endophiline n'a pas été ubiquitylée (Figure 20). Il est donc possible que la quantité d'endophiline ubiquitylée présente dans les cellules HEK-293T soit trop faible pour que son interaction avec l'anticorps soit visible. Une surexpression de Itch serait alors nécessaire pour permettre d'augmenter la quantité d'endophiline ubiquitylée et la rendre visible. Toutefois, *in vitro* (Figure 21), on remarque bien l'ubiquitylation de l'endophiline en présence de Itch, alors qu'elle est n'est pas visible en absence de la ligase, mais LITAF n'augmente pas l'ubiquitylation du substrat, contrairement à ce qui a pu être observé avec c-Jun. Il semble donc que la présence de LITAF n'augmente pas positivement l'activité de Itch envers l'endophiline.

Les résultats obtenus ne correspondent pas à notre hypothèse selon laquelle la présence de LITAF aurait dû augmenter l'ubiquitylation de l'endophiline via Itch. Pour expliquer ce phénomène, on peut se référer aux localisations cellulaires de l'endophiline et de LITAF. En effet, bien que l'endophiline soit impliquée dans le trafic cellulaire (Kjaerulff *et al.*, 2011), sa localisation cellulaire ne correspond pas à celle des lysosomes et elle ne devrait donc pas se retrouver aux mêmes endroits que LITAF (Lee *et al.*, 2012). Itch aurait bien été recruté par LITAF aux lysosomes (Eaton *et al.*, 2011), mais dû à l'absence de l'endophiline à cet endroit, l'ubiquitylation du substrat n'aurait pas eu lieu. Cependant, nos résultats *in vitro* ne démontrent eux non plus aucune augmentation de l'ubiquitylation de l'endophiline par Itch en présence de LITAF, indépendamment de la localisation cellulaire des protéines. Il est donc peu probable que les localisations cellulaires de l'endophiline et de LITAF soient les causes de l'absence d'augmentation de l'ubiquitylation de l'endophiline. Il importe donc d'étudier les domaines d'interaction entre l'endophiline et Itch. Contrairement à Itch et c-Jun qui

interagissent via une liaison WW/PPXY, Itch interagit via son domaine PRD avec le domaine SH3 de l'endophiline (Angers *et al.*, 2004). Mund *et al.* (2009) avaient démontré que la conformation inactive de Itch consiste en le repliement de son domaine HECT sur une région située entre le domaine PRD et le premier domaine WW. De ce fait, il est possible que le domaine PRD de Itch ne soit pas touché par sa conformation inactive, expliquant ainsi pourquoi la présence ou l'absence de LITAF ne change pas la quantité d'endophiline ubiquitylée par Itch. Ceci pourrait également expliquer le fait que, contrairement à l'endophiline, LITAF augmente considérablement la quantité de c-Jun ubiquitylé, sachant que les motifs WW de Itch sont touchés par sa conformation inactive. Il est à noter que lors d'observations préliminaires en laboratoire, l'ubiquitylation de la protéine Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), qui est une autre protéine à domaine SH3 (Matuoka *et al.*, 1992), n'a pas été augmentée en présence de Itch et LITAF, renforçant l'idée que les domaines d'interaction pourraient bien être en cause. Cependant, Mund *et al.* (2009) ont également observé que l'ubiquitylation de l'endophiline est augmentée par NDFIP2, ce qui suggère que le mécanisme d'activation de Itch par NDFIP1/2 et LITAF n'est peut-être pas identique après tout...

4.3. Implication de LITAF et Itch dans le syndrome de Charcot-Marie-Tooth

Sachant que les mutants de LITAF qui sont liés au syndrome de Charcot-Marie-Tooth sont délocalisés aux mitochondries (Lacerda *et al.*, 2014) et que LITAF et Itch interagissent ensemble (Eaton *et al.*, 2011), il est intéressant d'établir un lien entre ces protéines et le syndrome de Charcot-Marie-Tooth. En effet, chez les patients atteints de la maladie, il est

possible que Itch soit relocalisé aux mitochondries puisque l'interaction avec Itch n'est en principe pas affectée par ces mutations. Cette relocalisation de Itch pourrait résulter en l'accumulation de la ligase et de son activation excessive au niveau des mitochondries des neurones, résultant en la dégradation de diverses composantes de la gaine de myéline des axones.

Bien que les études aient établi un lien entre LITAF et le CMT1C (Saifi *et al.*, 2005), il est intéressant de noter que le syndrome de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (CMT2) est principalement lié à une mutation de la mitofusine 2, qui est une protéine associée aux mitochondries (Kijima *et al.*, 2004). Le CMT1C et le CMT2 ayant des symptômes identiques (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, 2015), cela renforce l'idée qu'une anomalie au niveau des mitochondries engendrée par LITAF et Itch serait responsable du CMT1C.

5. Conclusion et perspectives

Les objectifs de ce mémoire étaient de démontrer l'activation des ligases de l'ubiquitine de la famille Nedd4 par LITAF et de déterminer les conséquences de cette activation sur les substrats des ligases. Nous supposions donc que LITAF pouvait activer les ligases de la famille Nedd4, regroupant entre autres Nedd4, Itch, WWP1 et WWP2, et que cette activation des ligases résulterait en l'ubiquitylation de leurs substrats. Ce faisant, nous avons émis comme hypothèse que la protéine LITAF serait un régulateur des ligases de la famille Nedd4.

Nos résultats montrent que LITAF permet bel et bien l'augmentation de l'activité autocatalytique et donc l'activation de toutes les ligases de la famille Nedd4 testées, à savoir Nedd4, Itch, WWP1 et WWP2. Des expériences *in vivo* et *in vitro* additionnelles permettent de vérifier partiellement notre hypothèse selon laquelle les substrats de Itch sont ubiquitylés et dirigés vers la dégradation suite à l'expression de LITAF. En effet, on remarque que c-Jun est très rapidement dégradé en présence de LITAF. Bien que les expériences *in vivo* ne permettent pas de distinguer l'autoubiquitylation de c-Jun probablement à cause de sa dégradation trop rapide, on remarque *in vitro* que la présence de LITAF double la quantité de c-Jun ubiquitylé. Du côté de l'endophiline, on ne décèle aucune ubiquitylation du substrat suite à l'expression de LITAF et on observe une dégradation beaucoup plus faible et lente que c-Jun. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les substrats n'interagissent pas via les mêmes motifs avec les domaines WW de Itch. L'ubiquitylation et la dégradation des substrats de Itch par l'expression de LITAF semble donc dépendre du substrat étudié.

L'interaction entre LITAF et les ligases de la famille Nedd4 peut se révéler primordiale dans l'étude de certaines maladies, dont le syndrome de Charcot-Marie-Tooth de type 1C qui implique directement LITAF. Entre autres, l'interaction entre LITAF et Itch pourrait mener à une accumulation de la ligase au niveau des mitochondries, causant ainsi diverses anomalies. Des études menées sur l'expression de LITAF et Itch dans les nerfs périphériques et les impacts sur les substrats de la ligase pourraient faire la lumière sur le rôle joué par ces protéines dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth. De plus, sachant que LITAF et Itch colocalisent aux lysosomes lorsque cotransfectés et que ceci semble avoir un impact modeste sur la dégradation des substrats de Itch, il serait intéressant de voir si l'utilisation d'un mutant de LITAF lié au syndrome de Charcot-Marie-Tooth, LITAF G112S, causerait la relocalisation de Itch aux mitochondries et si ceci pourrait affecter la dégradation des substrats de la ligase ou même modifier son action en lui permettant l'accès à d'autres substrats. Une étude poussée dans cette direction permettrait de faire la lumière sur le rôle de LITAF et sur le rôle potentiel de Itch dans l'apparition du syndrome.

6. Références

- Abba, M. C., Drake, J. A., Hawkins, K. A., Hu, Y., Sun, H., Notcovich, C., Aldaz, C. M. (2004). Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression. *Breast Cancer Res*, 6(5), R499-513. doi: 10.1186/bcr899
- Ahmed, S. U., & Milner, J. (2009). Basal cancer cell survival involves JNK2 suppression of a novel JNK1/c-Jun/Bcl-3 apoptotic network. *PLoS One*, 4(10), e7305. doi: 10.1371/journal.pone.0007305
- Angers, A., Ramjaun, A. R., & McPherson, P. S. (2004). The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem*, 279(12), 11471-11479. doi: 10.1074/jbc.M309934200
- Bennett, C. L., Shirk, A. J., Huynh, H. M., Street, V. A., Nelis, E., Van Maldergem, L., Chance, P. F. (2004). SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol*, 55(5), 713-720. doi: 10.1002/ana.20094
- Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiante, G., Crook, T. (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 3(4), 387-402.
- Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., & Melino, G. (2008). The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*, 14(1), 10-21. doi: 10.1016/j.ccr.2008.06.001
- Bernassola, F., Salomoni, P., Oberst, A., Di Como, C. J., Pagano, M., Melino, G., & Pandolfi, P. P. (2004). Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J Exp Med*, 199(11), 1545-1557. doi: 10.1084/jem.20031943
- Bertolo, C., Roa, S., Sagardoy, A., Mena-Varas, M., Robles, E. F., Martinez-Ferrandis, J. I., Martinez-Climent, J. A. (2013). LITAF, a BCL6 target gene, regulates autophagy in mature B-cell lymphomas. *Br J Haematol*, 162(5), 621-630. doi: 10.1111/bjh.12440
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Karin, M. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*, 124(3), 601-613. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.021
- Chaudhary, N., & Maddika, S. (2014). WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DeltaNp73 levels. *Mol Cell Biol*, 34(19), 3754-3764. doi: 10.1128/MCB.00101-14

- Desrochers, G., Corbeil, L., & Angers, A. (2013). From a Conserved Structure to Regulation: CWH Ubiquitin Ligases Tightly Regulate Key Cellular Events. In: Berhardt, L.V., *Advances in Medicine and Biology*. Volume 62
- Di Marcotullio, L., Greco, A., Mazza, D., Canettieri, G., Pietrosanti, L., Infante, P., Gulino, A. (2011). Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*, *30*(1), 65-76. doi: 10.1038/onc.2010.394
- Eaton, H. E., Desrochers, G., Drory, S. B., Metcalf, J., Angers, A., & Brunetti, C. R. (2011). SIMPLE/LITAF expression induces the translocation of the ubiquitin ligase itch towards the lysosomal compartments. *PLoS One*, *6*(2), e16873. doi: 10.1371/journal.pone.0016873
- Eaton, H. E., Ferreira Lacerda, A., Desrochers, G., Metcalf, J., Angers, A., & Brunetti, C. R. (2013). Cellular LITAF interacts with frog virus 3 75L protein and alters its subcellular localization. *J Virol*, *87*(2), 716-723. doi: 10.1128/JVI.01857-12
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Lacerda, A. F., & Brunetti, C. R. (2012). Accumulation of endogenous LITAF in aggresomes. *PLoS One*, *7*(1), e30003. doi: 10.1371/journal.pone.0030003
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M., & Wagner, E. F. (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*, *112*(2), 181-192.
- Everett, L. M., Li, A., Devaraju, G., Caperell-Grant, A., & Bigsby, R. M. (1997). A novel estrogen-enhanced transcript identified in the rat uterus by differential display. *Endocrinology*, *138*(9), 3836-3841. doi: 10.1210/endo.138.9.5384
- Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Liu, Y. C. (2002). Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol*, *3*(3), 281-287. doi: 10.1038/ni763
- Fang, D., & Kerppola, T. K. (2004). Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, *101*(41), 14782-14787. doi: 10.1073/pnas.0404445101
- Flores, E. R., Sengupta, S., Miller, J. B., Newman, J. J., Bronson, R., Crowley, D., Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, *7*(4), 363-373. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.019
- Flores, E. R., Tsai, K. Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., & Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, *416*(6880), 560-564. doi: 10.1038/416560a

- Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y. C., & Karin, M. (2006). Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(6), 1717-1722. doi: 10.1073/pnas.0510664103
- Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C., & Karin, M. (2004). Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*, *306*(5694), 271-275. doi: 10.1126/science.1099414
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Muller, M. (2005). TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*, *24*(13), 2458-2471. doi: 10.1038/sj.emboj.7600708
- Guo, R., Yamashita, M., Zhang, Q., Zhou, Q., Chen, D., Reynolds, D. G., Xing, L. (2008). Ubiquitin ligase Smurfl mediates tumor necrosis factor-induced systemic bone loss by promoting proteasomal degradation of bone morphogenetic signaling proteins. *J Biol Chem*, *283*(34), 23084-23092. doi: 10.1074/jbc.M709848200
- Hansen, T. M., Rossi, M., Roperch, J. P., Ansell, K., Simpson, K., Taylor, D., Melino, G. (2007). Itch inhibition regulates chemosensitivity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, *361*(1), 33-36. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.104
- Harvey, K. F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C. N., Day, M. L., Parasivam, G., Kumar, S. (1999). All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na⁺. *J Biol Chem*, *274*(18), 12525-12530.
- Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S. H., Varma, R., Feske, S., Venuprasad, K., Rao, A. (2004). Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol*, *5*(3), 255-265. doi: 10.1038/ni1047
- Hooper, C., Puttamadappa, S. S., Loring, Z., Shekhtman, A., & Bakowska, J. C. (2010). Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets. *BMC Biol*, *8*, 72. doi: 10.1186/1741-7007-8-72
- Ingham, R. J., Gish, G., & Pawson, T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, *23*(11), 1972-1984. doi: 10.1038/sj.onc.1207436
- Irwin, M. S., Kondo, K., Marin, M. C., Cheng, L. S., Hahn, W. C., & Kaelin, W. G., Jr. (2003). Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, *3*(4), 403-410.
- Jenkinson, E. J., Jenkinson, W. E., Rossi, S. W., & Anderson, G. (2006). The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat Rev Immunol*, *6*(7), 551-555. doi: 10.1038/nri1883

- Ji, Z. Z., Dai, Z., & Xu, Y. C. (2011). A new tumor necrosis factor (TNF)-alpha regulator, lipopolysaccharides-induced TNF-alpha factor, is associated with obesity and insulin resistance. *Chin Med J (Engl)*, *124*(2), 177-182.
- Jiao, X., Katiyar, S., Willmarth, N. E., Liu, M., Ma, X., Flomenberg, N., Pestell, R. G. (2010). c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem*, *285*(11), 8218-8226. doi: 10.1074/jbc.M110.100792
- Jolliffe, C. N., Harvey, K. F., Haines, B. P., Parasivam, G., & Kumar, S. (2000). Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J*, *351 Pt 3*, 557-565.
- Kaneki, H., Guo, R., Chen, D., Yao, Z., Schwarz, E. M., Zhang, Y. E., Xing, L. (2006). Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem*, *281*(7), 4326-4333. doi: 10.1074/jbc.M509430200
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Hayasaka, K. (2005). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*, *116*(1-2), 23-27. doi: 10.1007/s00439-004-1199-2
- Kjaerulff, O., Brodin, L., & Jung, A. (2011). The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem Biophys*, *60*(3), 137-154. doi: 10.1007/s12013-010-9137-5
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, *37*(Pt 5), 937-953. doi: 10.1042/BST0370937
- Kwak, Y. D., Wang, B., Pan, W., Xu, H., Jiang, X., & Liao, F. F. (2010). Functional interaction of phosphatase and tensin homologue (PTEN) with the E3 ligase NEDD4-1 during neuronal response to zinc. *J Biol Chem*, *285*(13), 9847-9857. doi: 10.1074/jbc.M109.091637
- Lacerda, A. F., Hartjes, E., & Brunetti, C. R. (2014). LITAF mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease 1C show mislocalization from the late endosome/lysosome to the mitochondria. *PLoS One*, *9*(7), e103454. doi: 10.1371/journal.pone.0103454
- Laine, A., & Ronai, Z. (2007). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene*, *26*(10), 1477-1483. doi: 10.1038/sj.onc.1209924
- Latour, P., Gonnaud, P. M., Ollagnon, E., Chan, V., Perelman, S., Stojkovic, T., Maire, I. (2006). SIMPLE mutation analysis in dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease: three novel mutations. *J Peripher Nerv Syst*, *11*(2), 148-155. doi: 10.1111/j.1085-9489.2006.00080.x

- Lee, S. M., Chin, L. S., & Li, L. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease-linked protein SIMPLE functions with the ESCRT machinery in endosomal trafficking. *J Cell Biol*, *199*(5), 799-816. doi: 10.1083/jcb.201204137
- Lee, S. M., Olzmann, J. A., Chin, L. S., & Li, L. (2011). Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *J Cell Sci*, *124*(Pt 19), 3319-3331. doi: 10.1242/jcs.087114
- Levy, D., Reuven, N., & Shaul, Y. (2008). A regulatory circuit controlling Itch-mediated p73 degradation by Runx. *J Biol Chem*, *283*(41), 27462-27468. doi: 10.1074/jbc.M803941200
- Li, X., Huang, M., Zheng, H., Wang, Y., Ren, F., Shang, Y., Chang, Z. (2008). CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biol*, *181*(6), 959-972. doi: 10.1083/jcb.200711044
- Lui, W. O., Foukakis, T., Liden, J., Thoppe, S. R., Dwight, T., Hoog, A., Larsson, C. (2005). Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR(gamma) fusion oncogene. *Oncogene*, *24*(8), 1467-1476. doi: 10.1038/sj.onc.1208135
- Maillard, I., & Pear, W. S. (2003). Notch and cancer: best to avoid the ups and downs. *Cancer Cell*, *3*(3), 203-205.
- Marin, I. (2010). Animal HECT ubiquitin ligases: evolution and functional implications. *BMC Evol Biol*, *10*, 56. doi: 10.1186/1471-2148-10-56
- Marschang, R. E. (2011). Viruses infecting reptiles. *Viruses*, *3*(11), 2087-2126. doi: 10.3390/v3112087
- Matsumura, Y., Matsumura, Y., Nishigori, C., Horio, T., & Miyachi, Y. (2004). PIG7/LITAF gene mutation and overexpression of its gene product in extramammary Paget's disease. *Int J Cancer*, *111*(2), 218-223. doi: 10.1002/ijc.20251
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., & Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(19), 9015-9019.
- McGill, M. A., & McGlade, C. J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*, *278*(25), 23196-23203. doi: 10.1074/jbc.M302827200

- Meggouh, F., de Visser, M., Arts, W. F., De Coo, R. I., van Schaik, I. N., & Baas, F. (2005). Early onset neuropathy in a compound form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol*, 57(4), 589-591. doi: 10.1002/ana.20434
- Melino, G., De Laurenzi, V., & Vousden, K. H. (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 605-615. doi: 10.1038/nrc861
- Melino, G., Gallagher, E., Aqeilan, R. I., Knight, R., Peschiaroli, A., Rossi, M., Bernassola, F. (2008). Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ*, 15(7), 1103-1112. doi: 10.1038/cdd.2008.60
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T., & Knight, R. A. (2003). Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*, 28(12), 663-670. doi: 10.1016/j.tibs.2003.10.004
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J. A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Martinez-Climent, J. A. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood*, 109(1), 271-280. doi: 10.1182/blood-2006-06-026500
- Miller, D., Gray, M., & Storfer, A. (2011). Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. *Viruses*, 3(11), 2351-2373. doi: 10.3390/v3112351
- Moriwaki, Y., Begum, N. A., Kobayashi, M., Matsumoto, M., Toyoshima, K., & Seya, T. (2001). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem*, 276(25), 23065-23076. doi: 10.1074/jbc.M011660200
- Mouchantaf, R., Azakir, B. A., McPherson, P. S., Millard, S. M., Wood, S. A., & Angers, A. (2006). The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem*, 281(50), 38738-38747. doi: 10.1074/jbc.M605959200
- Mund, T., & Pelham, H. R. (2009). Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Rep*, 10(5), 501-507. doi: 10.1038/embor.2009.30
- Myokai, F., Takashiba, S., Lebo, R., & Amar, S. (1999). A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4518-4523.

- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2015). Charcot-Marie-Tooth Disease Fact Sheet. Récupéré sur http://www.ninds.nih.gov/disorders/charcot_marie_tooth/detail_charcot_marie_tooth.htm
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, 33(3), 416-421. doi: 10.1038/ng1099
- Oberst, A., Malatesta, M., Aqeilan, R. I., Rossi, M., Salomoni, P., Murillas, R., Melino, G. (2007). The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(27), 11280-11285. doi: 10.1073/pnas.0701773104
- Ohashi, N., Yamamoto, T., Uchida, C., Togawa, A., Fukasawa, H., Fujigaki, Y., Kitagawa, M. (2005). Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF-beta. *FEBS Lett*, 579(12), 2557-2563. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.069
- Ohzono, C., Etoh, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hirota, Y., Tanaka, Y., & Fujita, H. (2010). Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. *Biol Pharm Bull*, 33(6), 951-957.
- Osborne, B. A., & Minter, L. M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol*, 7(1), 64-75. doi: 10.1038/nri1998
- Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 55-72. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648), 300-305. doi: 10.1038/38525
- The Human Protein Atlas. (2014). Récupéré sur <http://www.proteinatlas.org/>
- Qi, H., Grenier, J., Fournier, A., & Labrie, C. (2003). Androgens differentially regulate the expression of NEDD4L transcripts in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 210(1-2), 51-62.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., Liu, Y. C. (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 275(46), 35734-35737. doi: 10.1074/jbc.M007300200
- Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A. K., Simms-Waldrip, T., Fu, C., & Sakamoto, K. M. (2008). Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Res*, 68(8), 2557-2560. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5989

- Rossi, M., Aqeilan, R. I., Neale, M., Candi, E., Salomoni, P., Knight, R. A., Melino, G. (2006). The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(34), 12753-12758. doi: 10.1073/pnas.0603449103
- Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D. R., Liu, Y. C., Vousden, K. H., Melino, G. (2005). The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J*, 24(4), 836-848. doi: 10.1038/sj.emboj.7600444
- Saifi, G. M., Szigeti, K., Wiszniewski, W., Shy, M. E., Krajewski, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Lupski, J. R. (2005). SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat*, 25(4), 372-383. doi: 10.1002/humu.20153
- Sato, Y., & Heuckeroth, R. O. (2008). Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth in vitro. *Dev Biol*, 320(1), 185-198. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.05.524
- Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P., & Rossier, B. C. (1996). Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J*, 15(10), 2381-2387.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 13(5), 607-619.
- Shearwin-Whyatt, L. M., Brown, D. L., Wylie, F. G., Stow, J. L., & Kumar, S. (2004). N4WBP5A (Ndfip2), a Nedd4-interacting protein, localizes to multivesicular bodies and the Golgi, and has a potential role in protein trafficking. *J Cell Sci*, 117(Pt 16), 3679-3689. doi: 10.1242/jcs.01212
- Shirk, A. J., Anderson, S. K., Hashemi, S. H., Chance, P. F., & Bennett, C. L. (2005). SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurosci Res*, 82(1), 43-50. doi: 10.1002/jnr.20628
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J*, 15(10), 2371-2380.
- Street, V. A., Bennett, C. L., Goldy, J. D., Shirk, A. J., Kleopa, K. A., Tempel, B. L., Chance, P. F. (2003). Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*, 60(1), 22-26.

- Stucchi, A., Reed, K., O'Brien, M., Cerda, S., Andrews, C., Gower, A., Becker, J. (2006). A new transcription factor that regulates TNF-alpha gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with CD and UC. *Inflamm Bowel Dis*, 12(7), 581-587. doi: 10.1097/01.MIB.0000225338.14356.d5
- Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J., & Linnoila, R. I. (1996). Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res*, 56(2), 305-315.
- Wang, D., Liu, J., Tang, K., Xu, Z., Xiong, X., Rao, Q., Wang, J. (2009). Expression of pig7 gene in acute leukemia and its potential to modulate the chemosensitivity of leukemic cells. *Leuk Res*, 33(1), 28-38. doi: 10.1016/j.leukres.2008.06.034
- Wang, J., Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., & Yang, W. (2010). Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem*, 285(16), 12279-12288. doi: 10.1074/jbc.M109.086405
- Wiesner, S., Ogunjimi, A. A., Wang, H. R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J. L., & Forman-Kay, J. D. (2007). Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell*, 130(4), 651-662. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.050
- Wisdom, R., Johnson, R. S., & Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J*, 18(1), 188-197. doi: 10.1093/emboj/18.1.188
- Zhang, P., Wang, C., Gao, K., Wang, D., Mao, J., An, J., Yu, L. (2010). The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem*, 285(12), 8869-8879. doi: 10.1074/jbc.M109.063321
- Zhao, L., Huang, J., Zhang, H., Wang, Y., Matesic, L. E., Takahata, M., Xing, L. (2011). Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells*, 29(10), 1601-1610. doi: 10.1002/stem.703
- Zhi, X., & Chen, C. (2012). WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci*, 69(9), 1425-1434. doi: 10.1007/s00018-011-0871-7