

Université de Montréal

Rôles fonctionnels de la ligase de l'ubiquitine ITCH dans
l'endocytose dépendante de la clathrine du récepteur du
facteur de croissance épidermique

Par

Riham Ayoubi

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Doctorat en Sciences Biologiques

Octobre, 2020

©Riham Ayoubi, 2020

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

***Rôles fonctionnels de la ligase de l'ubiquitine ITCH dans l'endocytose
dépendante de la clathrine du récepteur du facteur de croissance épidermique***

Présentée par

Riham Ayoubi

A été évaluée par un jury composé des personnes

Daniel Kierzkowski
Président-rapporteur

Annie Angers
Directrice de recherche

Peter McPherson
Codirecteur

Sophie Breton
Membre du jury

Christel Brou
Examinatrice externe

Résumé

ITCH est une ligase de l'ubiquitine impliquée dans différents processus cellulaires. Elle contient une région riche en prolines (PRR, *proline rich region*) qui lui permet de lier le domaine SH3 (*Src homology 3*) d'Endophiline et d'autres protéines à domaine SH3. Plusieurs de ces protéines sont impliquées dans l'endocytose clathrine-dépendante de récepteurs tel le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Après activation, l'EGFR est internalisé dans des vésicules enrobées de Clathrine et un complexe protéique formé par CBL, CIN85 et Endophiline participe à cet évènement. ITCH lie l'ubiquitine à CBL et à Endophiline pour vraisemblablement modifier leurs fonctions, ce qui suggère un lien direct entre cette ligase et l'endocytose de l'EGFR. Afin de déterminer le rôle d'ITCH dans ce processus, plusieurs expériences furent réalisées. Premièrement, la modalité de liaison entre la ligase ITCH et les protéines à domaine SH3 a été étudiée en détails. Une série de mutations dans la région PRR d'ITCH nous a aidé à identifier trois résidus arginines (R₂₅₂, R₂₅₅, R₂₅₈) nécessaires pour son interaction avec Endophiline et d'autres protéines à domaine SH3. Deuxièmement, des lignées cellulaires HeLa et Cos7 furent modifiées génétiquement par CRISPR pour empêcher l'expression d'ITCH. Ces lignées cellulaires knockout furent caractérisées et utilisées dans un essai d'endocytose de l'EGFR, puis examinées par spectrométrie de masse. L'internalisation d'EGFR fut suivie en microscopie confocale à l'aide d'un ligand EGF fluorescent dans les deux types de cellules ITCH^{-/-}. En absence d'ITCH, nous observons une diminution significative du niveau d'EGF internalisé par rapport aux cellules parentales. La surexpression d'ITCH dans les cellules ITCH^{-/-} rétablit l'internalisation normale de l'EGF, confirmant l'implication d'ITCH dans le processus, mais la surexpression des formes mutantes de ITCH incapable de lier Endophiline ou catalytiquement inactive ne rétablit pas l'internalisation de l'EGF. Ces résultats nous permettent de conclure que l'interaction ITCH-Endophiline et la fonction catalytique de ITCH sont nécessaires pour l'endocytose de l'EGFR. Ensemble, ces deux fonctions de ITCH régulent le trafic endocytique de l'EGFR. De plus, les cellules ITCH^{-/-} montrent un délai de dégradation de l'EGFR phosphorylé ainsi qu'une prolongation du temps d'activation de la kinase MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Finalement, pour explorer l'influence de

l'absence d'ITCH sur ses substrats et partenaires moléculaires nous avons effectué une comparaison protéomique des partenaires d'interaction et des protéines ubiquitylées à partir des lysats cellulaires ITCH^{-/-} et WT. Les résultats ont montré que le manque d'expression de la ligase ITCH altère la présence peptidique des protéines liées à la signalisation de l'EGFR, à la voie protéolytique dépendante de l'ubiquitine et à l'adhésion cellulaire. Cette étude révèle pour une première fois que la protéine ITCH est requise pour l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR.

Mots clés : Endocytose, EGFR, EGF, CBL, Endophiline, ITCH, ubiquitylation, ubiquitine, signalisation, trafic endocytaire, transferrine.

Abstract

ITCH is a ubiquitin ligase involved in various cellular processes including endocytosis. It contains a proline rich region (PRR) which allows it to bind the SH3 domain of endophilin and other SH3 domain-containing proteins involved in Clathrin-mediated endocytosis (CME). CME is an important regulatory mechanism for growth factor receptor activity. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is actively internalized in Clathrin-coated vesicles after activation. This endocytosis is facilitated by a protein complex formed by CBL, CIN85 and Endophilin. ITCH is known to ubiquitinate both CBL and endophilin, providing a potential functional link between the ligase and receptor internalization. In order to determine the role of ITCH in this process, several experiments were performed. First, the mapping of molecular binding sites between the ligase ITCH and SH3 domain proteins has been studied in detail. A series of mutations in the PRR region of ITCH helped us identify three arginine residues (R₂₅₂, R₂₅₅, R₂₅₈) as necessary for its interaction with endophilin and all the tested SH3-domain containing proteins. Secondly, HeLa and Cos7 cell lines were genetically modified by CRISPR to prevent ITCH expression. These knockout cell lines were characterized for use in an EGFR endocytosis assay and for mass spectrometry analysis. EGFR internalization was monitored by confocal microscopy using fluorescent EGF ligand in both ITCH^{-/-} cell types. In the absence of ITCH, a significant decrease in the level of internalized EGF compared to parental cells is visible. Overexpression of WT ITCH in the knockout cells restores normal internalization of EGF, confirming the involvement of ITCH in the process. Overexpression of Endophilin-binding defective or catalytically inactive ITCH does not restore the internalization of EGF in ITCH^{-/-} cells. These results show that the ITCH-Endophilin interaction as well as the catalytic function of ITCH are necessary for the endocytosis of EGFR. In addition, ITCH^{-/-} cells show a delay in the degradation of phosphorylated EGFR accompanied with an extended period of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. In a last set of experiments, we explored the influence of the absence of ITCH on its substrates and molecular partners. We performed a proteomic comparison of ITCH-binding partners and potential substrates using the ITCH^{-/-} and WT cell lysates. The results showed that the lack of ITCH expression alters the peptide count of proteins mainly related to EGFR signaling, the

ubiquitin-dependent proteolytic pathway and cell adhesion. This study shows for the first time that the protein ITCH is required for the clathrin-dependent endocytosis of EGFR.

Keywords: Endocytosis, EGFR, EGF, CBL, Endophilin, ITCH, ubiquitination, ubiquitin, signaling, endocytic trafficking, transferrin.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	X
1. INTRODUCTION	1
1.1. L'ubiquitylation	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Les différents types d'ubiquitylation	4
1.1.3. Les enzymes de la réaction d'ubiquitylation.....	4
1.2. La ligase de l'ubiquitine ITCH	8
1.2.1. La protéine ITCH	8
1.2.2. Les différentes fonctions d'ITCH	10
Les récepteurs et protéines transmembranaires substrats de ITCH	10
Les facteurs de transcription substrats de ITCH.....	11
1.2.3. Le trafic endocytaire dépendant de la Clathrine	12
1.2.4. L'Endophiline	15
1.3. Le récepteur du facteur de croissance épidermique	18
1.3.1. Les fonctions du récepteur à l'EGF	18
1.3.2. La structure du récepteur à l'EGF	20
1.3.3. Les voies de signalisation transmis par l'EGFR activé.....	20
1.4. Problématique et objectifs	25
2. LA CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE LA LIGASE DE L'UBIQUITINE ITCH ET LES PROTÉINES ENDOCYTIQUES À DOMAINE SH3	28

2.1. Introduction	28
2.1.1. L'interaction du domaine SH3 avec la région riche en prolines	28
2.1.2. Les partenaires à domaines SH3 d'ITCH	29
2.2. Matériels et méthodes	32
2.2.1. Mutagenèse dirigée	32
2.2.2. Essais de pull-down pour les tests d'interactions moléculaires	34
2.2.3. Essai de pull-down pour la détection d'ubiquitylation	35
2.2.4. Essai d'immunoprécipitation pour la détection d'ubiquitylation	35
2.3. Résultats	36
2.3.1. Interaction d'ITCH avec le domaine SH3 d'Endophiline A2	36
2.3.2. Liaison à d'autres protéines endocytiques à domaine SH3	40
2.3.3. L'ubiquitylation de l'Endophiline A1 par le mutant triple arginine	42
2.4. Discussion	45
3. RÔLE D'ITCH DANS L'ENDOCYTOSE DÉPENDANTE DE LA CLATHRINE DU RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE CROISSANCE ÉPIDERMIQUE	48
3.1. Introduction	48
3.1.1. La technique CRISPR/Cas9	48
3.1.2. Le rôle de l'ubiquitylation dans la régulation de l'EGFR et ses protéines adaptatrices	49
3.2. Matériels et méthodes	53
3.2.1. Knockout par CRISPR/Cas9	53
3.2.2. Caractérisation des lignées knockout	54
3.2.3. Immunofluorescence de l'EGFR à la membrane	54
3.2.4. Essai d'endocytose	54
3.2.5. Imagerie confocale et quantification	55
3.2.6. Essai de dégradation de l'EGFR	55
3.3. Résultats	56
3.3.1. Validation des lignées ITCH knockout	56
3.3.2. Niveaux endogènes d'EGFR et des substrats d'ITCH dans les cellules ITCH ^{-/-}	58
3.3.3. Internalisation de l'EGFR dans les lignées ITCH ^{-/-}	60
3.3.4. L'effet de l'absence de la ligase ITCH sur l'endocytose de la transferrine	65

3.3.5. Les résultats de sauvetage à l'aide d'ITCH	68
3.3.6. Signalisation de l'EGFR	70
3.4. Discussion	72
4. ANALYSE PROTÉOMIQUE DES LIGNÉES ITCH^{-/-}	77
4.1. L'étude des peptides et protéines par spectrométrie de masse	77
4.2. Matériels et méthodes	79
4.2.1. Pull-down ITCH	79
4.2.2. Immunoprécipitation de l'ubiquitine	79
4.2.3. Spectrométrie de masse LC-MS/MS	80
4.3. Résultats	80
4.3.1. Les protéines interagissant avec la protéine ITCH détectées par spectrométrie de masse	80
4.3.2. Comparaison des protéines ubiquitylées entre les cellules HeLa parentales et les cellules ITCH ^{-/-} .	85
4.4. Discussion	89
4.4.1. Protéines liant la fusion GST-ITCH	89
4.4.2. Les protéines immunoprécipitées par l'anti-ubiquitine	94
5. CONCLUSIONS	98
5.1. L'interaction ITCH-SH3 dépend des arginines fondamentales 252, 255 et 258 de la PRR	99
5.2. Le knockout du gène <i>ITCH</i> n'affecte pas les niveaux endogènes d'EGFR, CBL et Endophiline	99
5.3. Le knockout du gène <i>ITCH</i> perturbe l'endocytose dépendante de la clathrine de l'EGFR	99
5.4. L'endocytose dépendante de la clathrine du récepteur à la Transferrine ne dépend pas de la ligase de l'ubiquitine ITCH	100
5.5. La fonction catalytique d'ITCH et sa région riche en prolines sont collectivement requises pour sa fonction dans l'internalisation de l'EGFR	100
5.6. L'EGFR activé est plus stable en absence de la ligase de l'ubiquitine ITCH	100
5.7. Les rôles multiples de la ligase de l'ubiquitine ITCH	101
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
ANNEXES	117
Annexe 1	117

Liste des figures

FIGURE 1. LA RÉACTION D'UBIQUITYLATION ET LES FONCTIONS CELLULAIRES LIÉES À CETTE MODIFICATION.	5
FIGURE 2. LES DIFFÉRENTES CLASSES DES ENZYMES E3s.	7
FIGURE 3. ARCHITECTURES CONSERVÉES DES PROTÉINES CWH (LA SOUS-FAMILLE NEDD4).	9
FIGURE 4. LA STRUCTURE D'ITCH.	10
FIGURE 5. LES PROTÉINES D'INTERACTION AVEC LA LIGASE DE L'UBIQUITINE ITCH.	13
FIGURE 6. FORMATION DE LA VÉSICULE DE CLATHRINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.	15
FIGURE 7. LA STRUCTURE DES DOMAINES DE LA FAMILLE DES ENDOPHILINES.	18
FIGURE 8. LA STRUCTURE DE L'EGFR.	21
FIGURE 9. LES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR L'EGFR.	23
FIGURE 10. LES ACIDES AMINÉS ESSENTIELS DES DOMAINES PRR PERMETTANT LEURS LIAISONS AUX DOMAINES SH3 DANS DEUX ORIENTATIONS OPPOSÉES ("PLUS" ET "MOINS").	29
FIGURE 11. THERMOGRAMMES ITC REPRÉSENTATIFS OBTENUS PAR L'AJOUT SUCCESSIF DE PRR D'ITCH À UN ENSEMBLE DE DOMAINES SH3.	32
FIGURE 12. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA MUTAGENÈSE DIRIGÉE.	33
FIGURE 13. INTERACTION DU DOMAINE SH3 D'ENDOPHILINE A2 AVEC LES DIFFÉRENTS MUTANTS DE LA LIGASE ITCH.	37
FIGURE 14. INTERACTION DU MUTANT TRIPLE ARGININE DE LA LIGASE ITCH AVEC DES NIVEAUX CROISSANTS DES DOMAINES SH3 D'ENDOPHILINE A2 ET D'AMPHIPHYSINE II.	39
FIGURE 15. INTERACTIONS DES DOMAINES SH3 D'AMPHIPHYSINE II, PACSIN I, ENDOPHILINE A1 ET B-PIX AVEC LES DIFFÉRENTS MUTANTS DE LA LIGASE ITCH.	41

FIGURE 16. PULL-DOWN AUX BILLES Ni-NTA POUR DÉTERMINER L'UBIQUITYLATION D'ENDOPHILINE A1 PAR LE MUTANT ITCH TRIPLE ARGININE.	43
FIGURE 17. IMMUNOPRÉCIPITATION D'ENDOPHILINE A1 EN PRÉSENCE D'UBIQUITINE SUREXPRIMÉE POUR DÉTERMINER L'UBIQUITYLATION D'ENDOPHILINE A1 PAR LE MUTANT ITCH TRIPLE ARGININE.	45
FIGURE 18. L'UBIQUITYLATION DE L'EGFR PAR LA LIGASE DE L'UBIQUITINE C-CBL.	50
FIGURE 19. PRODUCTION DE LA LIGNÉE ITCH ^{-/-} PAR CRISPR/CAS9.....	57
FIGURE 20. LES NIVEAUX ENDOGÈNES DE L'EGFR ET DE QUELQUES SUBSTRATS D'ITCH.	58
FIGURE 21. IMMUNOFLUORESCENCE POUR COMPARER LE NIVEAU DE BASE DE LA PROTÉINE EGFR DANS LES LIGNÉES HeLa PARENTALE ET ITCH ^{-/-}	60
FIGURE 22. ESSAI D'ENDOCYTOSE DE L'EGF À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DANS LES CELLULES HeLa.....	62
FIGURE 23. ESSAI D'ENDOCYTOSE DE L'EGF À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DANS LES CELLULES Cos7.....	64
FIGURE 24. ESSAI D'ENDOCYTOSE DÉPENDANTE DE LA CLATHRINE DE L'EGF SUR UNE MOSAÏQUE CELLULAIRE ENTRE LES LIGNÉES PARENTALE ET ITCH ^{-/-}	65
FIGURE 25. ESSAI D'ENDOCYTOSE DE LA TRANSFERRINE.	67
FIGURE 26. SAUVETAGE DE L'INTERNALISATION DE L'EGF À L'AIDE D'ITCH.	70
FIGURE 27. LES NIVEAUX ENDOGÈNES DES PROTÉINES INDICATRICES DE L'ACTIVATION ET LA SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR À L'EGF.	71
FIGURE 28. PONCEAUX REPRÉSENTATIFS DU PULL-DOWN ITCH COMPLÈTE ET DE L'IMMUNOPRÉCIPITATION ANTI-UBIQUITINE À PARTIR DES CELLULES HeLa WT ET ITCH ^{-/-}	82
FIGURE 29. REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES CATÉGORIES DE PROTÉINES IDENTIFIÉES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE SELON LA FONCTION ET LE NOMBRE DE PEPTIDES DANS LES CELLULES HeLa WT ET ITCH ^{-/-}	88
FIGURE 30. MODÈLE DE RÉGULATION DE L'ENDOCYTOSE DÉPENDANTE DE LA CLATHRINE DE L'EGFR PAR LA LIGASE ITCH.	102

Liste des tableaux

TABLEAU 1. LES AMORCES UTILISÉES POUR GÉNÉRER LA MUTATION ITCH.	35
--	----

TABLEAU 2. LISTE DES ANTICORPS UTILISÉS.	36
TABLEAU 3. LES PROTÉINES À FONCTION ENDOCYTIQUE MODIFIÉES PAR L'UBIQUITYLATION.	52
TABLEAU 4. AMORCES UTILISÉES POUR LE SÉQUENÇAGE GÉNOMIQUE DE LA LIGNÉE ITCH ^{-/-}	53
TABLEAU 5. LISTE DES ANTICORPS UTILISÉS.	56
TABLEAU 6. PROTÉINES INTERAGISSANT AVEC LA FUSION GST-ITCH PLUS ABONDANTES COMPARÉ À LA LIGNÉE WT.....	83
TABLEAU 7. PROTÉINES DÉTERMINÉES À ABONDANCE SIMILAIRE DANS LA LIGNÉE HELA WT ET ITCH ^{-/-} PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE...	84
TABLEAU 8. RÉSULTATS DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE MONTRANT LES PROTÉINES CONJUGUÉES À L'UBIQUITINE À NOMBRE DE PEPTIDES SUPÉRIEUR DANS LA LIGNÉE HELA WT À LA LIGNÉE ITCH ^{-/-}	86
TABLEAU 9. RÉSULTATS DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE MONTRANT LES PROTÉINES CONJUGUÉES À L'UBIQUITINE À NOMBRE DE PEPTIDES SUPÉRIEUR DANS LA LIGNÉE HELA ITCH ^{-/-} PAR RAPPORT À LA LIGNÉE WT.	87

Liste des sigles et des abréviations

18H	18 Harwell
ACK2	Cdc42-associated kinase 2
AIP4	Atrophin-1 Interacting Protein 4
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
AMP	Adenosine Monophosphate
APC	Antigen-presenting cells
APF 1	ATP-dependent Proteolytic Factor 1
AREG	Amphiregulin
ARNg	ARN guides

ATP	Adenosine Triphosphate
BAD	BCL2 antagonist of cell death
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
Bif-1	Bax Interacting Factor-1
BTC	Betacellulin
CA	Non catalytique
Cas9	CRISPR associated
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
CIN85	CBL-interacting Protein 85
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CWH	C2-WW-HECT
CXCR4	CXC chemokine Receptor type 4
DAG	Diacylglycerol
DNAJA1	DnaJ homologue subfamily A member 1
DSB	DNA double-stranded breaks
E	Acides glutamiques
E1-L 2	E1-like protein 2
EGF	Epidermal Growth Factor

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPI	Epigen
EPS15	EGFR Pathway Substrate clone number 15
Epsins	Eps15-interacting proteins
ERAD	ER-associated degradation
ErbB	Erythroblastosis oncogene B
EREG	Epiregulin
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2
FAF-X	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
FAF2	FAS-associated factor 2
FAK	Focal adhesion kinase
FKHR	Forkhead
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
G	Guanine
GAB-1	GRB2 associated binding protein 1
GAK	Cyclin G-associated Kinase
GPCR	G Protein-coupled Receptor
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
HB-EGF	Heparin-binding EGF

HDR	Homology-directed repair
HECT	Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
HER	Human Epidermal Factor
HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α
HIS	Histidine
HLA	Human Leukocyte Antigen class I histocompatibility antigen
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HSC70	Heat Shock Cognate 70
IgG	Immunoglobulin G
IL-4	Interleukine 4
Indel	Insertion/deletion
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IQGAP1	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
JAK/STAT	Janus kinase / signal transducer and activator of transcription
JNK 1	c-Jun N-terminal protein Kinase 1
LAPTM4B	Lysosomal-associated Protein Transmembrane 4 beta
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LSB	Loading SDS Sample Buffer

m/z	masse/charge
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK1/2	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1/2
Mg-ATP	Magnesium ATP
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKP1	MAPK phosphatase 1
MS	Mass spectrometry
mTORC1	mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
MVP	Major vault protein
N4BP1	Nedd4-binding Partner 1
Ndfip	Nedd4 family-interacting proteins
NPLOC4	Nuclear Protein Localization Protein 4 homolog
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
OPTN	Optineurin
PAM	Protospacer Adjacent Motif
Pb	Paires de bases
PBS	Phosphate-buffered Saline
PEG10	Paternally expressed gene 10

PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3K/AKT	Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC	Protein kinase C
PLC- γ 1	Phospholipase C- γ 1
Plk1	Polo-like kinase 1
PPII	Polyproline type II
PRR	Proline Rich Region
PTB	PhosphoTyrosine Binding
PTEN	Phosphatase and Tensin homologue
R	Arginines
Rin1	Ras interaction/interference 1
RING	Really Interesting New Gene
RNAPII	RNA polymerase II
RPB	DNA-directed RNA polymerase II subunit
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
SCA10	Spinocerebellar ataxia 10

SH2	Src-homology 2
SH3	Src homology 3
SHC	Src homology 2 domain containing
SHP	Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase
SNX9	Sorting Nexin 9
SOS	Son of Sevenless
SQSTM1	Sequestosome 1
SRE	Serum Response Element
STAM	Signal Transducing Adaptor Molecule
STAP2	Signal-transducing adaptor protein 2
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
t-Bid	Truncated C-terminal Bid
TCF	T-Cell Factor
TCR	T Cell Receptor
TERA	Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th2	T helper2
Tm	Melting Temperature

Ub	Ubiquitine
UBC	Ubiquitin Conjugation
UBD	Ubiquitin-binding Domains
UBL	Ubiquitin-like
UFD1	Nploc4-Vcp-Ubiquitin fusion degradation protein 1
UIM	Ubiquitin-interacting motifs
UPS	Ubiquitin–proteasome system
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked
VCP	Valosin-containing protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WBP2	WW Domain Binding Protein 2
WWP1	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase
YAP	Yes-associated protein

1. Introduction

L'ubiquitylation est une réaction par laquelle une protéine d'ubiquitine est rajoutée à un substrat protéique pour changer son destin ou son rôle dans la cellule. Le processus d'internalisation des récepteurs activés à partir de la membrane plasmique est un moyen de communication entre l'espace extra et intracellulaires. Dépendamment de la fonction du récepteur internalisé, ce cargo acheminé envoie un/des cascade(s) de signaux vers le noyau pour activer/désactiver des gènes de prolifération, différenciation, etc. Ce processus est souvent hautement régulé, et l'ubiquitylation est l'un des mécanismes régulateurs qui influence le déroulement de ses différentes étapes.

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre comment l'ubiquitylation influence la signalisation cellulaire à travers la régulation des récepteurs activés, comme le récepteur activé à l'EGF (EGFR ; *Epidermal Growth Factor Receptor*). Le complexe Endophiline/CIN85-CBL-ITCH est le modèle choisi pour notre étude. La ligase de l'ubiquitine ITCH appartient à la famille des ligases de l'ubiquitine CWH (*C2-WW-HECT*), connue pour lier ses substrats à l'aide de ses domaines WW (*Tryptophan*). Toutefois, ITCH contient une région riche en prolines, non conservée chez les autres membres de la famille, reconnue par les domaines SH3 (*Src homology 3*) de certaines protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la Clathrine.

La protéine à domaine SH3 liant le plus fortement la PRR (*proline rich region*) de ITCH est l'Endophiline (1). Endophiline participe à l'établissement de la courbure de la membrane nécessaire pour former les vésicules en utilisant son domaine N-BAR (*Bin/amphiphysin/Rvs*) qui déforme le double feuillet lipidique. Elle permet aussi le recrutement d'autres protéines essentielles pour l'endocytose, comme Synaptojanine et Dynamine, via son domaine SH3 (2, 3). La ligase de l'ubiquitine ITCH fut identifiée comme partenaire d'interaction d'Endophiline dans un crible d'une banque d'expression avec le domaine SH3 d'Endophiline A1 (4). Quand surexprimées, les deux protéines s'engagent dans une interaction PRR/SH3 qui facilite l'ubiquitylation d'Endophiline par ITCH. De plus, elles se colocalisent avec l'EGF dans les compartiments endocytiques lors d'essais d'internalisation, ce qui laisse supposer un rôle de la

ligase ITCH dans la régulation de l'endocytose de l'EGFR (4). ITCH utilise aussi ses domaines WW pour lier CBL, connectant ITCH à un autre acteur du complexe CBL-CIN85/Endophiline (5). CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*) est la ligase de l'ubiquitine responsable de l'ubiquitylation et de la dégradation lysosomale du récepteur à l'EGF et la formation du complexe CBL-CIN85/Endophiline est nécessaire à la régulation négative de l'EGFR (6, 7).

Une étude détaillée des profils d'interaction entre la région riche en prolines et certaines protéines endocytiques à domaines SH3 nous a révélé l'importance de trois résidus spécifiques pour la réussite de ces liaisons (Annexe 1) (1). Ces expériences étaient menées en utilisant la région PRR purifiée de la protéine ITCH, j'ai alors modifié ces arginines aux positions 252, 255 et 258 en acides glutamiques dans la protéine complète et examiné la capacité de ce mutant à lier et ubiquityler le partenaire majeur de la ligase ITCH, Endophiline. Ensuite, afin d'investiguer le rôle d'ITCH dans le processus d'endocytose de l'EGFR, j'ai éliminé le gène *ITCH* dans les cellules HeLa et Cos7 et j'ai testé la compétence de ces cellules à internaliser l'EGFR de façon dépendante et indépendante de la Clathrine. J'ai aussi effectué des essais de sauvetage du phénotype dans la lignée *ITCH*^{-/-} pour déterminer la contribution de la région PRR et de la fonction ligase de ITCH dans l'internalisation de l'EGFR. Enfin, j'ai voulu examiner l'effet global de l'élimination de ITCH en comparant les protéines récupérées par la protéine ITCH dans un essai de pull-down à partir des lysats cellulaires d'une lignée WT ou *ITCH*^{-/-}. Une telle comparaison permettrait de découvrir de nouvelles voies dans lesquelles ITCH pourrait être impliquée, et d'élargir notre connaissance des protéines régulées ou régulant ITCH au sein des voies déjà connues. J'ai aussi effectué une comparaison similaire des peptides liés à l'ubiquitine immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine, affinant ainsi les résultats à un groupe de protéines modifiées par l'ubiquitine. Les travaux effectués dans ce projet de recherche démontrent la contribution de la ligase de l'ubiquitine ITCH dans le trafic endocytique de l'EGFR en montrant que son internalisation via la voie de la Clathrine est dépendante de la protéine ITCH. Une version préliminaire de l'article à soumettre est montrée en Annexe 2.

1.1. L'ubiquitylation

1.1.1. Définition

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle par laquelle une molécule de 76 acides aminés (8.6 kDa), l'ubiquitine, ou une chaîne de polyubiquitines se lie par liaison covalente aux résidus lysine d'une protéine cible. Cette réaction est une voie majeure conduisant à la dégradation protéique. Cette dégradation peut influencer plusieurs processus cellulaires parmi lesquels: le cycle cellulaire, le trafic vésiculaire, la présentation de l'antigène et la transduction du signal (8). La découverte des mécanismes biochimiques régissant l'ubiquitylation a valu le prix Nobel de chimie aux chercheurs Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose, en 2004. L'histoire a commencé par la recherche d'une voie de dégradation protéique différente des lysosomes et qui utilise de l'énergie. En étudiant les réticulocytes, des cellules sanguines immatures déficientes en lysosomes, il a été montré que la dégradation des protéines exige deux fractions complémentaires: une activité protéase par le facteur de protéolyse dépendant de l'ATP 1 (APF 1 : *ATP-dependent proteolytic factor 1*) qui stimule la protéolyse et une petite protéine stable à la chaleur (9). À la suite de l'étude du mécanisme d'action d'APF 1, cette protéine s'est révélée identique à l'ubiquitine (9-12).

L'ubiquitylation est un processus dépendant de l'ATP qui consiste en la formation d'un lien peptide entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupe ϵ -amine des résidus lysines de la protéine à ubiquityler. La réaction commence par la formation d'une liaison thiol-ester entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine active de la première enzyme du système, l'enzyme d'activation E1. Cela étant, la molécule d'ubiquitine est transférée sur le groupe cystéinyl de la deuxième enzyme E2 nommée l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Enfin, à travers l'action de l'ubiquitine ligase E3, l'ubiquitine et le substrat sélectionné seront liées par un lien isopeptidique (Figure 1). Cette capacité d'E3 à reconnaître et à se lier à la fois au substrat et à l'enzyme E2 suggère que cette enzyme fournit la spécificité de la réaction d'ubiquitylation. À ce point, la réaction mène à l'addition d'une seule molécule d'ubiquitine, ce qu'on nomme la monoubiquitylation.

1.1.2. Les différents types d'ubiquitylation

Plusieurs ubiquitines peuvent être ajoutées à d'autres lysines dans la protéine cible résultant en une multi-ubiquitylation. Après que l'ubiquitine initiale soit conjuguée à un substrat, elle peut à son tour être liée sur une des sept lysines par d'autres ubiquitines. Un lien isopeptidique se forme entre la glycine 76 de la nouvelle molécule d'ubiquitine et le groupe ϵ -NH₂ de l'une des sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 or K63) de l'ubiquitine initiale, formant ainsi une chaîne de polyubiquitine (Figure 1) (13).

La monoubiquitylation peut avoir plusieurs rôles régulateurs du substrat, tel que le changement de sa localisation subcellulaire, sa conformation, son activité et ses interactions protéiques. La formation d'une chaîne de polyubiquitine sur la lysine 48 conduit généralement à cibler le substrat pour une dégradation dans le protéasome (14, 15). La formation d'une chaîne de polyubiquitine sur la lysine 63 fournit au substrat lié la capacité d'agir comme un échafaudage des complexes de signalisation, régulateur de la localisation des protéines, l'activation de certaines kinases et la réparation ou la transcription d'ADN à travers des mécanismes indépendants du protéasome (Figure 1) (16-18).

1.1.3. Les enzymes de la réaction d'ubiquitylation

Les enzymes d'activation E1 sont bien conservées chez les eucaryotes. Depuis de nombreuses années on a cru qu'une seule enzyme E1 existait dans les cellules eucaryotes et la réaction catalysée par E1 est bien étudiée. Récemment, il a été montré qu'une protéine ressemblant à E1, appelée E1-L 2 (*E1-like protein 2*), peut également activer l'ubiquitine (19). La réaction demande du Mg-ATP (*magnesium-adenosine triphosphate*) suivie par l'ubiquitine, ce qui forme une ubiquitine adénylate qui sert de donneur d'ubiquitine à la cystéine active de l'enzyme E1. Chaque E1 porte deux ubiquitines, une adénylate et un thiol-ester. L'échange ATP-AMP (*adenosine monophosphate*) permet à E1 de conjuguer celle qui est liée au thiol à l'enzyme de conjugaison suivante, E2 (16).

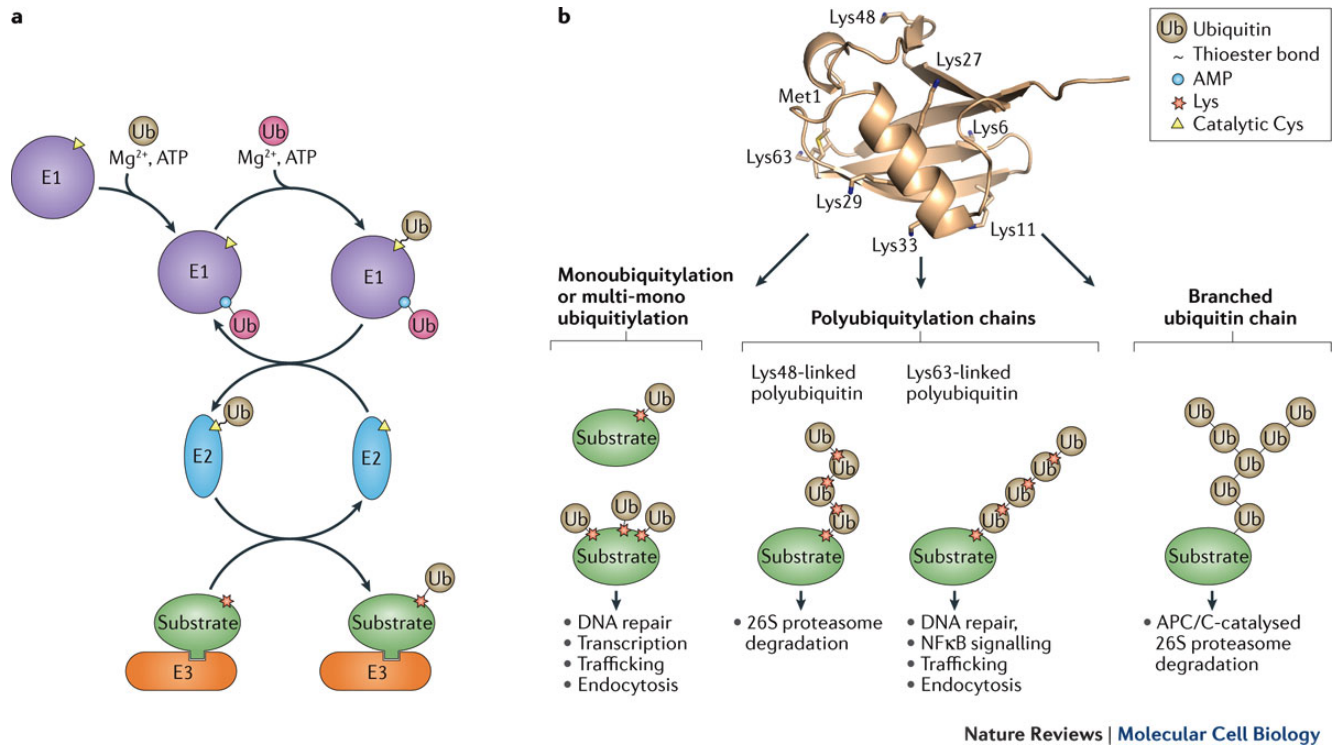


Figure 1. La réaction d'ubiquitylation et les fonctions cellulaires liées à cette modification.

A) La réaction d'ubiquitylation ; une enzyme d'activation de l'ubiquitine E1 catalyse deux cycles d'adénylation de l'ubiquitine en présence de Mg^{2+} et d'ATP pour lier deux molécules d'ubiquitine : l'une (en beige) forme une liaison thiol-ester avec la cystéine catalytique de l'enzyme E1 et l'autre (en rose) est liée de manière non covalente au domaine d'adénylation d'E1 via son extrémité carboxyle modifiée par l'AMP. E1 se lie ensuite à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et transfère l'ubiquitine de sa cystéine catalytique à la cystéine catalytique d'E2 pour former E2~ubiquitine (~ indique une liaison thiol-ester). L'E2~ubiquitine se dissocie de E1 et E1 recommence son cycle catalytique. Une ubiquitine ligase (E3) de type RING recrute E2~ubiquitine et un substrat pour catalyser le transfert d'ubiquitine vers une lysine de ce substrat. À la suite du transfert, E2 se dissocie d'E3 et E3 lie une autre E2~ubiquitine pour catalyser le prochain cycle d'ubiquitylation de substrat. Une ubiquitine ligase de type HECT lie l'ubiquitine et assure elle-même son transfert au substrat (non montré). B) Les résultats possibles de l'ubiquitylation d'un substrat ; les substrats ubiquitylés interagissent avec des partenaires qui possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine, modifiant ainsi les interactions protéine-protéine et les fonctions cellulaires des substrats. Une seule molécule d'ubiquitine peut être attachée à un substrat sur une seule (monoubiquitylation) ou plusieurs (multi-monoubiquitylation) lysine(s). De plus,

les sept résidus de lysine à la surface de l'ubiquitine ainsi que la méthionine amino-terminale (Met1) peuvent servir de sites accepteurs, conduisant à la formation de chaînes de polyubiquitine. Ces chaînes peuvent être homogènes où un seul site sur l'ubiquitine est modifié (comme la polyubiquitine liée à la Lys48 ou Lys63) ou elles peuvent être ramifiées où deux molécules d'ubiquitine sont attachées à différents sites accepteurs sur la molécule d'ubiquitine. Différentes liaisons d'ubiquitine varient en structure et recrutent donc des partenaires différents pour produire des signaux en aval uniques (20-22). Ces modifications sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires non protéolytiques, y compris l'endocytose, le tri aux endosomes et la réparation de l'ADN. La polyubiquitylation (poly-Ub) résulte de la fixation d'une chaîne de molécules d'ubiquitine à un ou plusieurs résidus Lys. Les chaînes formées par Lys48 (K48) ciblent les protéines modifiées vers la dégradation par le protéasome. Les chaînes liées par Lys63 (K63) sont impliqués dans la réparation de l'ADN et l'activation des protéines kinases.

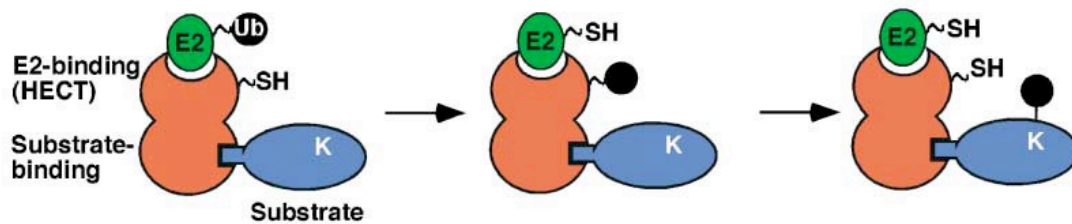
Figure tirée de (22).

Contrairement à la famille des E1, les membres de la famille des protéines E2 et E3 sont beaucoup plus nombreux, la famille des E3s étant la plus grande (23). Les humains ont environ 40 E2 impliquées dans le transfert de l'ubiquitine ou des protéines de type UBL (*Ubiquitin-like*) (par exemple, SUMO et NEDD8). Toutes les E2 partagent un domaine central conservé et constitué d'environ 150 acides aminés qui est nommé le domaine UBC (*Ubiquitin Conjugation*). Ce domaine central contient la cystéine catalytique, qui forme une liaison thiol-ester avec l'ubiquitine. Le résidu de cystéine actif est niché dans une rainure catalytique entourée d'acides aminés hautement conservés qui assurent à la fois de la formation de thiol-ester (réception d'ubiquitine à partir de l'enzyme activatrice E1) et l'ubiquitylation du substrat (formation de liaison isopeptidique avec un résidu lysine du substrat) (24).

Les E3s jouent un rôle crucial dans la définition de la spécificité des protéines cibles à ubiquityler. D'un point de vue mécanique, les E3 forment deux groupes : les E3 à domaine HECT (*the homologous to E6-AP carboxyl terminus*) et les E3 à domaine RING (*really interesting new gene*). Les membres de chaque famille se différencient par leurs séquences, structures et propriétés catalytiques distinctes. Les ligases de l'ubiquitine à domaine HECT contiennent une

région de 350 résidus qui maintient un résidu de cystéine strictement conservé situé à environ 35 résidus de l'extrémité C-terminale. Cette cystéine constitue l'élément thiol-ester essentiel pour la catalyse de la réaction. La famille des E3s à domaine RING possède un ensemble de résidus cystéine et histidine avec un espacement caractéristique qui stabilise leur conformation globulaire en interagissant avec deux ions zinc. Tandis que les ligases RING fonctionnent comme des adaptateurs moléculaires pour apporter E2 à proximité des substrats, les ligases HECT catalysent directement l'ubiquitylation des protéines en acceptant l'ubiquitine d'une enzyme E2 pour former l'intermédiaire ubiquitine-thiol-ester (Figure 2) (12).

A. HECT domain E3s



B. RING domain E3s

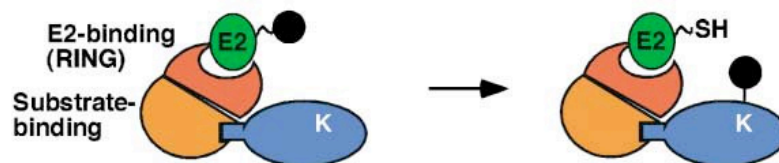


Figure 2. Les différentes classes des enzymes E3s.

A) Les E3s à domaine HECT (*Homologous to E6AP C-Terminus*) lient les E2 via le domaine HECT conservé et acceptent l'ubiquitine sur un résidu cystéine localisé du côté N-terminal du domaine ; une autre région de la ligase lie le substrat (bleu) auquel l'ubiquitine est ensuite liée. B) Les E3s à domaine RING sont des protéines d'échafaudage qui utilisent le domaine RING (orange) pour lier l'E2 et un autre domaine (jaune) pour lier le substrat. L'ubiquitine est transférée au substrat directement par E2.

Figure tirée de (25).

1.2. La ligase de l'ubiquitine ITCH

1.2.1. La protéine ITCH

La ligase de l'ubiquitine ITCH ou AIP4 (*atrophin-1 interacting protein 4*) est le sujet d'intérêt de cette thèse. Cette protéine a été identifiée à l'origine par des études génétiques dans le but d'examiner le locus *agouti* qui aboutit à un changement de couleur des souris lorsqu'il est muté. Plus précisément, la mutation 18H (*18 Harwell*) du gène *agouti* sur le chromosome 2 est causée par une inversion chromosomale induite par les radiations et associée à une couleur plus sombre des souris. Ceci mène à une délétion de 18 et 20 paires de bases, respectivement des côtés proximal et distal du site d'inversion. La mutation interrompt ainsi l'expression des gènes *agouti* et *Itch*. Les souris ayant cette mutation souffrent de sévères maladies inflammatoires et immunitaires et manifestent un grattement persistant de la peau (*Itchy skin*), d'où le nom de la protéine. Les souris meurent à ~6-8 mois, à cause d'une hypoxie associée à une inflammation pulmonaire (26).

ITCH appartient aux ligases NEDD4, un groupe parmi les ligases HECT qui partagent toutes la même succession de domaines (C2, WW, HECT), d'où leur désignation par CWH. Il existe 9 membres du groupe Nedd4 chez les mammifères, NEDD4, NEDD4-2, ITCH, WWP1, WWP2, SMURF1, SMURF2, NEDL1 et NEDL2. Parmi ces ligases, plusieurs affectent des voies de signalisation essentielles pour la régulation de la prolifération cellulaire, une implication directe dans la croissance et le cancer (27).

La sous-famille NEDD4

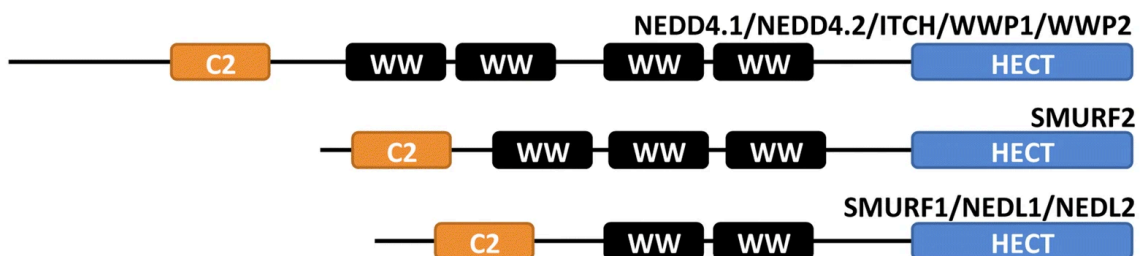


Figure 3. Architectures conservées des protéines CWH (la sous-famille NEDD4).

Aperçu de l'organisation des domaines des ligases HECT chez les mammifères. Les ligases HECT sont caractérisées par la présence d'un domaine HECT conservé (*homologous to E6AP C-terminus*) qui est situé à l'extrémité C-terminale des protéines. La sous-famille NEDD4 comprend neuf membres ayant chacun un domaine C2 N-terminal et entre deux et quatre domaines WW.

Figure tirée de (28).

Le gène *ITCH* code une protéine de 854 acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 113 kDa (Figure 4). Comme les autres ligases de la famille HECT, les domaines WW d'*ITCH* reconnaissent un motif à base de prolines PPXY (où X est n'importe quel acide aminé). *ITCH* est la seule ligase de la famille CWH qui contient une région riche en prolines (PRR). Cette région est formée d'une vingtaine d'acides aminés et interagit avec le domaine SH3 de plusieurs protéines impliquées dans l'endocytose. Au niveau subcellulaire, *ITCH* se localise aux endosomes précoces et tardifs, aux lysosomes et plus rarement au réseau trans-golgien (29).

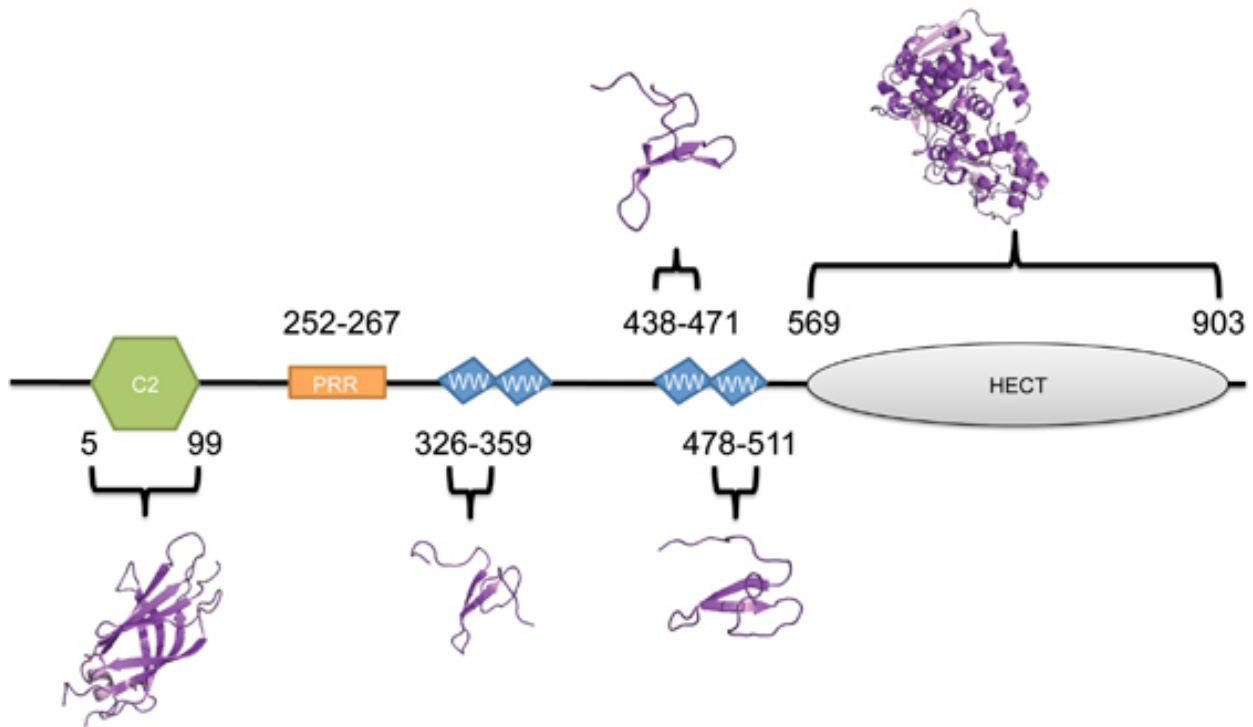


Figure 4. La structure d'ITCH.

ITCH est composé d'un domaine C2 N-terminal, d'une région riche en prolines (PRR), quatre domaines WW, et un domaine HECT. Les structures tridimensionnelles de ces domaines sont montrées en magenta. Les positions des domaines conservés sont montrées au-dessous et au-dessus de la représentation schématique de la protéine.

Figure tirée de (30).

1.2.2. Les différentes fonctions d'ITCH

Les récepteurs et protéines transmembranaires substrats de ITCH

Plusieurs protéines et récepteurs membranaires à la surface de la cellule sont internalisés par l'endocytose pour être soit dégradées soit recyclées vers la surface, et l'ubiquitylation est l'un des processus régulateurs de cette réaction. La ligase ITCH est un régulateur de l'endocytose. Son rôle dans ce mécanisme est bien défini pour certains récepteurs mais moins connu pour d'autres, comme dans le cas de l'EGFR à l'étude dans ce projet de recherche.

Le GPCR (*G protein-coupled receptor*) CXCR4 (*CXC chemokine receptor type 4*) est un récepteur directement régulé par ITCH. CXCR4 est phosphorylé aux résidus sérine/thréonine de son extrémité C-terminale à l'aide d'une kinase des GPCR. Cette phosphorylation favorise l'attachement direct du domaine WW d'ITCH à la région C-terminale de CXCR4, ce qui mène à l'ubiquitylation de CXCR4 et à sa dégradation lysosomale (31).

ITCH contrôle la dégradation du récepteur Notch en absence de son ligand. Notch est un récepteur de surface cellulaire interagissant avec des ligands transmembranaires tels que Delta (appelé *Delta-like* chez l'homme). Les étapes précoces d'internalisation de Notch ne dépendent pas de la présence de ITCH mais plutôt les étapes tardives de son ciblage vers les lysosomes suite à la formation de chaînes de polyubiquitine à travers la lysine 29 de l'ubiquitine (32). La voie Notch régule la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (33).

La famille des récepteurs ErbB (*Erythroblastosis oncogene B*), à laquelle appartient EGFR (ou ErbB1), est une famille de régulateurs importants de la différenciation et de la prolifération

cellulaire et les membres de cette famille jouent un rôle dans la pathogenèse des cancers humains (34). La kinase JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*) est responsable de la phosphorylation et de l'augmentation de l'activité de ITCH (35). Après stimulation à l'EGF, cette kinase pourrait phosphoryler et activer ITCH qui va à son tour ubiquityler une autre ligase de l'ubiquitine CBL (36). Une fois phosphorylée et activée, c-CBL ubiquityle l'EGFR induisant son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes (37). De façon importante, ITCH utilise cette fois-ci sa région riche en prolines pour établir une liaison atypique avec la protéine endocytaire Endophiline A1 et les deux protéines se localisent au niveau des endosomes à la suite d'une stimulation à l'EGF (4). De plus, la ligase ITCH catalyse l'ubiquitylation directe de l'isoforme CYT-1 du récepteur ErbB4 et le dirige vers une dégradation lysosomale (38).

La régulation du trafic endocytaire de la protéine transmembranaire TRPV4 est aussi régulée par ITCH. TRPV4 est un canal ionique responsable de l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules non excitables et son ubiquitylation par ITCH n'accélère pas sa dégradation mais altère sa localisation subcellulaire et son trafic endocytaire (39).

Les facteurs de transcription substrats de ITCH

Outre son rôle dans l'endocytose et la régulation des récepteurs membranaires, ITCH joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Les souris ITCH^{-/-} montrent une déficience de la différenciation des cellules immunitaires T_{H2} (*T helper2*) et une augmentation de la production d'IL-4 (*interleukine 4*), IL-5, IgG (*immunoglobulin G*) et IgE, normalement associés à l'auto-immunité (40, 41). Le facteur de transcription JunB, responsable de la régulation de la transcription du gène *IL-4*, est un substrat d'ITCH ayant un motif PXXY. À la suite de l'activation des cellules T, les kinases JNK phosphorylent et activent ITCH, ce qui mène à une ubiquitylation et à la dégradation de JunB et c-Jun. Par conséquent, les niveaux d'IL-4 augmentent chez les souris mutantes qui perdent leur tolérance pour l'antigène du soi (35, 42, 43).

ITCH régule aussi indirectement la voie de signalisation du récepteur TGF- β (Transforming growth factor- β). Une fois ubiquitylé par ITCH, le facteur de transcription TIEG1 induit

l'expression d'un autre facteur de transcription essentiel pour l'induction des cellules T naïves en cellules T régulatrices (*Treg cells*), Foxp3. Des cellules T ITCH^{-/-} sont moins sensibles à la TGF- β et montrent un niveau d'expression moindre de Foxp3. ITCH coopère alors avec TIEG1 pour stimuler l'expression de Foxp3 et induire la transformation des cellules T naïves en réponse au TGF- β (44). Cette modulation est un autre exemple d'une ubiquitylation qui contrôle une voie de signalisation de façon non protéolytique.

Un autre facteur de transcription sous la régulation d'ITCH est Gli1, un facteur qui affecte la voie de signalisation Hedgehog pour maintenir et renouveler les cellules souches neurales. La protéine développementale Numb stabilise le complexe ITCH-Gli1 et dirige Gli1 vers une dégradation protéasomale. La diminution du niveau de Gli1 supprime l'expression des gènes cibles de Hedgehog, arrêtant ainsi la croissance et favorisant la différenciation cellulaire (45).

D'autres substrats d'ITCH sont les protéines de type p63 et p73 qui sont responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN (46, 47). Cependant, quelquefois, ITCH a un effet inhibiteur de l'apoptose via un autre substrat, t-Bid (*truncated C-terminal Bid*), une protéine proapoptotique ubiquitylée et dégradée par ITCH. La dégradation ITCH-dépendante de t-Bid augmente après traitement à l'EGF (48). ITCH joue ainsi un rôle dans la balance entre la survie et l'apoptose cellulaire.

1.2.3. Le trafic endocytaire dépendant de la Clathrine

L'EGFR stimulé utilise l'endocytose dépendante de la Clathrine pour atteindre les endosomes précoces afin d'être recyclé vers la membrane cellulaire ou ciblé aux endosomes tardifs et lysosomes afin d'être dégradé (49). Différentes protéines transmembranaires peuvent être acheminées vers l'intérieur de la cellule en utilisant cette route. Plusieurs processus physiologiques dépendent de ce mécanisme, comme la prise des nutriments, la communication intercellulaire, la motilité, l'adhésion et la signalisation cellulaire. Bien que cette voie d'endocytose soit nommée d'après la protéine qui différencie le type de vésicules, la Clathrine, approximativement cinquante autres protéines sont recrutées dans ce mécanisme (50).

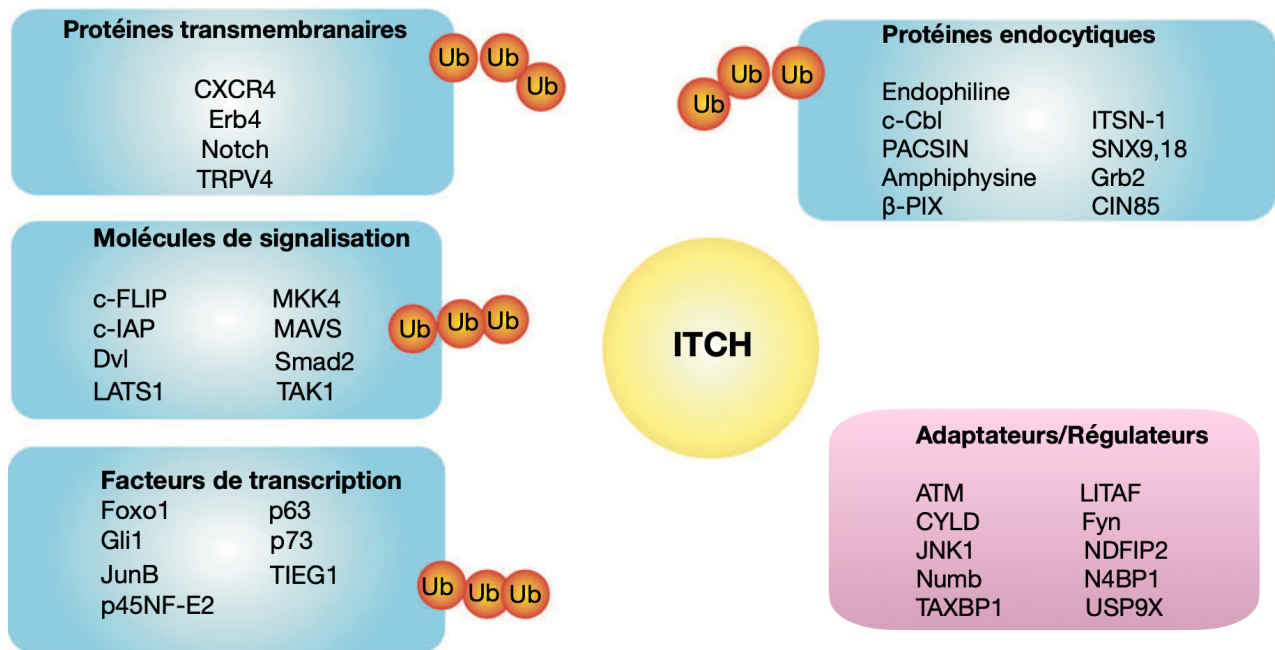


Figure 5. Les protéines d'interaction avec la ligase de l'ubiquitine ITCH.

Les substrats et régulateurs d'ITCH. Les substrats protéiques pour l'activité de la ligase E3 ITCH sont notés, y compris les protéines transmembranaires, les molécules de signalisation et les facteurs de transcription. D'autres protéines de liaison sont également indiquées en tant que protéines adaptatrices pour la localisation d'ITCH, des kinases pour sa phosphorylation ou des enzymes de déubiquitylation.

Figure adaptée de (51).

La formation du puit de Clathrine est initiée par la protéine adaptatrice 2, AP2 (*adaptor protein 2*), qui recrute la Clathrine à la membrane plasmique et favorise son assemblage en un manteau de Clathrine. Cette protéine hautement conservée et abondante au site de formation de la vésicule de Clathrine, s'insère à la membrane plasmique pour interagir avec la région cytoplasmique d'un RTK (*receptor tyrosine kinase*) stimulé directement à l'aide de ses sous-unités μ et σ ou indirectement à travers d'autres protéines intermédiaires. Les récepteurs couplés aux protéines G, GPCR lient les membres de la famille des arrestines, l'arrestine $\beta 1$ et

l'arrestine $\beta 2$, pour être recrutés aux puits. Les arrestines β se lient simultanément aux récepteurs stimulés et à la Clathrine.

À la suite de son recrutement par AP2, la Clathrine polymérise pour stabiliser une courbure de la membrane assistée par d'autres effecteurs de la courbure comme EPS15 (*EGFR pathway substrate clone number 15*), epsins (*eps15-interacting proteins*) (domaine ENTH) et les protéines à domaine N-BAR. Ces protéines participent à la courbure de la membrane plasmique pour former le col du puit de Clathrine. Une fois bien formée, la vésicule portant les récepteurs activés sera prête à être détachée de la membrane. Cet évènement est dépendant de la Dynamine, une protéine recrutée par les protéines Amphiphysine, Endophiline et SNX9 (*Sorting Nexin 9*). Ces protéines utilisent leurs domaine SH3 pour lier la PRR de la dynamine. Grâce à son activité GTPase, la Dynamine permet l'hydrolyse de la GTP en GDP stimulant ainsi la fission vésiculaire. Afin que la vésicule puisse fusionner avec les endosomes, le désassemblage de la Clathrine par l'ATPase HSC70 (*heat shock cognate 70*) est crucial. GAK (*cyclin G-associated kinase*) ou Auxilin dans les neurones sont responsables du recrutement de HSC70. La phosphatase des lipides, Synaptojanine est recrutée par Endophiline pour libérer les protéines autour de la membrane vésiculaire (Figure 6) (52).

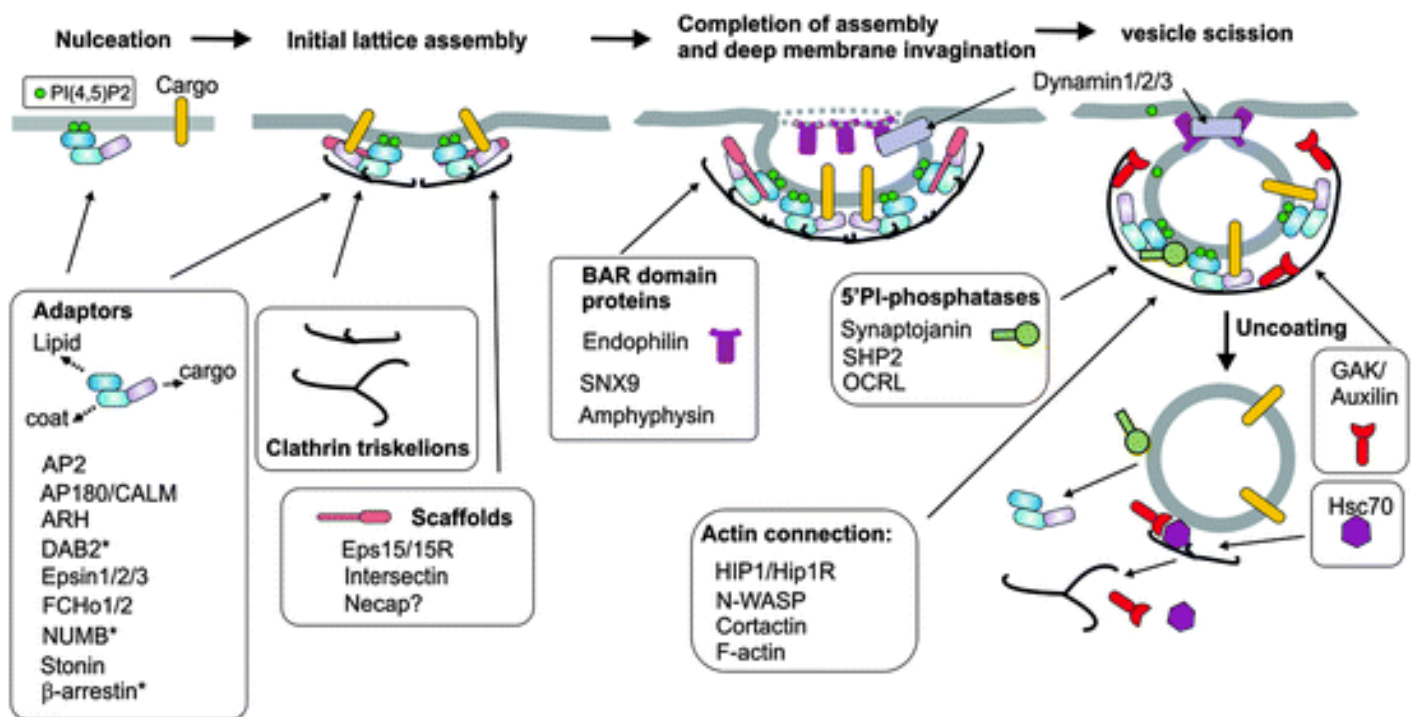


Figure 6. Formation de la vésicule de Clathrine au niveau de la membrane plasmique.

Représentation schématique des étapes consécutives du cycle d'assemblage et de démontage de la vésicule de Clathrine dans les cellules de mammifères, basée sur l'analyse systématique de Merrifield et ses collègues (53) et de nombreuses autres études. Divers adaptateurs, échafaudages et autres protéines accessoires sont recrutés sur le site de formation ou d'assemblage des structures de Clathrine à différentes étapes du processus (indiquées par des flèches). Les protéines adaptatrices sont présentées sous une forme modulaire générique composée de cargos, de couches de Clathrine et d'interfaces de liaison aux lipides. Les points Astérisque indiquent les adaptateurs qui nécessitent une liaison AP2 pour relier leur cargo à un puit enrobé de Clathrine. Les protéines d'échafaudage Eps15/Eps15R ne lient pas directement les lipides mais interagissent avec plusieurs adaptateurs associés à la membrane et peuvent interagir avec le cargo.

Figure tirée de (54).

1.2.4. L'Endophiline

L'Endophiline est un substrat de la ligase ITCH et la compréhension de la fonction de cette interaction dans le contexte de l'internalisation de l'EGFR est l'un de nos objectifs.

L'Endophiline est parmi les protéines à domaine SH3 les plus caractérisées. Tous les membres de la famille des Endophilines possèdent un domaine BAR N-terminal qui détecte et induit la courbure de la membrane (55) et un domaine SH3 C-terminal qui représente le module de reconnaissance des partenaires moléculaires (56). Les hélices amphipathiques du domaine N-BAR supportent la scission membranaire (Figure 7) (57). De nombreux processus impliquent les Endophilines, dont la récupération des vésicules synaptiques, la signalisation des RTK, la dynamique du réseau mitochondrial, l'apoptose et l'autophagie. De plus, le dérèglement de la fonction de l'Endophiline est liée au cancer et à certaines maladies neurodégénératives (58).

Les Endophilines ont été découvertes en utilisant un peptide riche en proline pour la recherche des domaines SH3 exprimés par une banque d'ADNc d'embryon de souris (59). Deux familles d'Endophilines sont actuellement connues ; les Endophilines A exprimées par les trois gènes, *Endophiline A1*, *A2*, et *A3* et les Endophilines B par les gènes *Endophiline B1* et *B2*. Les

Endophilines A1 et A2 sont surtout connues pour leurs implications dans l'endocytose des récepteurs. L'Endophiline A1 est essentiellement exprimée au niveau du cerveau, tandis que l'Endophiline A2 est exprimée dans tous les tissus. L'expression de l'Endophiline A3 est élevée dans le cerveau et les testicules et cette protéine est impliquée dans la dégradation du RTK, c-Met (60, 61). Endophiline B1 et B2 sont présentes dans la plupart des organes, y compris le cerveau (62). Endophiline B1 ou Bif-1 (*Bax Interacting Factor*) participe à la régulation de la biogenèse des autophagosomes en interagissant avec Beclin-1 et s'associe à la membrane mitochondriale pour favoriser l'autophagie (63, 64).

L'endocytose des vésicules synaptiques est un processus crucial au cours de la transmission synaptique. Plusieurs modes de récupération sont proposés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones centraux : l'endocytose dépendante de la Clathrine classique et bien définie dans la littérature ainsi que d'autres non-dépendantes de la Clathrine pour lesquels les mécanismes sont moins compris. Peu de temps après leur découverte, les Endophilines A ont été liées à l'endocytose des vésicules synaptiques. Elles participent à la déformation de la membrane et au bourgeonnement des vésicules parce qu'elles contiennent un domaine BAR connu pour sa capacité à courber les membranes. Dans des tests *in vitro* à base de liposomes, elles sont capables d'invaginer les bicouches lipidiques en forme des tubules étroits de diamètre similaire à celui du col d'une vésicule de Clathrine (65). Cet effet est observé aussi dans des cellules où des tubules positifs pour GFP-Endophiline A2 se sont dynamiquement formés, allongés et rétractés sur une échelle de temps de quelques minutes (66). Cependant, parce que les vésicules peuvent être générées, bien que de manière inefficace en absence d'Endophiline, certaines fonctions d'Endophiline dans la génération/détection de la courbure peuvent également être remplies par d'autres protéines contenant un domaine BAR, par exemple, l'Amphiphysine, SNX9 / SNX18, Pacsin et Tuba (67). Toutes ces protéines présentent une combinaison similaire d'un domaine BAR et d'un domaine SH3, ce qui suggère un haut niveau de redondance dans leurs fonctions.

Outre leur rôle dans la courbure de la membrane plasmique, les Endophilines s'associent à des partenaires moléculaires pour former les complexes nécessaires à la réussite de l'internalisation

des cargos. Endophiline A utilise son domaine SH3 pour lier les PRR des deux acteurs majeurs de l'endocytose dépendante de la Clathrine, la Synaptojanine et la Dynamine (56). La Dynamine est une grande GTPase impliquée dans la scission des vésicules nouvellement formées durant l'endocytose tardive, alors que la Synaptojanine est une phosphatidylinositol 5-phosphatase impliquée dans le désassemblage de la vésicule récupérée (3, 68, 69). La perturbation de la fonction d'Endophiline, par injection des anticorps dans un synapse stimulé, bloque l'invagination précoce des puits de Clathrine. Sur la base de ces expériences dans les axones de lamproie géants, il a été proposé qu'Endophiline agit aux stades précoces du bourgeonnement induit par la Clathrine (70). Cependant, des études d'imagerie et de génétique plus récentes chez la drosophile, *Caenorhabditis elegans* et la souris favorisent des actions tardives d'Endophiline, principalement dans le démantèlement du manteau de Clathrine via le recrutement de la Synaptojanine. En fait, chez la drosophile et chez *C. elegans*, les mutants d'Endophiline présentent un recyclage des vésicules synaptiques défectueux (71, 72). Chez la souris, le knockout des trois gènes *Endophiline A* cause aussi une accumulation de vésicules synaptiques avant l'étape de démantèlement du manteau de Clathrine. Cette accumulation cause un ralentissement des cycles de ré-internalisation au niveau des synapses ce qui entraîne une déficience de la transmission synaptique. Ces souris triple knockout se distinguent de leurs compagnons de lit immédiatement après la naissance en raison de leur taille légèrement plus petite, de leurs problèmes respiratoires et du manque de lait dans leur estomac. Ils meurent immédiatement ou quelques heures après la naissance (73). Cette endocytose défectueuse et l'accumulation des vésicules de Clathrine causé par un manque d'Endophiline fonctionnelle est un phénotype qui ressemble beaucoup à la perte de la Synaptojanine (73).

L'Endophiline a également un rôle central dans l'endocytose indépendante de la Clathrine et, plus récemment, dans l'endocytose ultrarapide. Une fonction d'Endophiline A2 dans l'endocytose indépendante de la Clathrine a été décrite en étudiant l'internalisation des toxines bactériennes *Shiga* et *Cholera*. Elle contribue, avec la Dynamine et l'Actine, à la scission des tubules induits par ces toxines (74). Synaptojanine et Endophiline ont été décrites comme les médiateurs d'une voie indépendante de la Clathrine, l'endocytose ultrarapide où des vésicules

se forment en 50 millisecondes. Elles sont nécessaires pendant cette endocytose pour rétrécir le col de l'invagination membranaire afin de favoriser la scission de la vésicule (75).

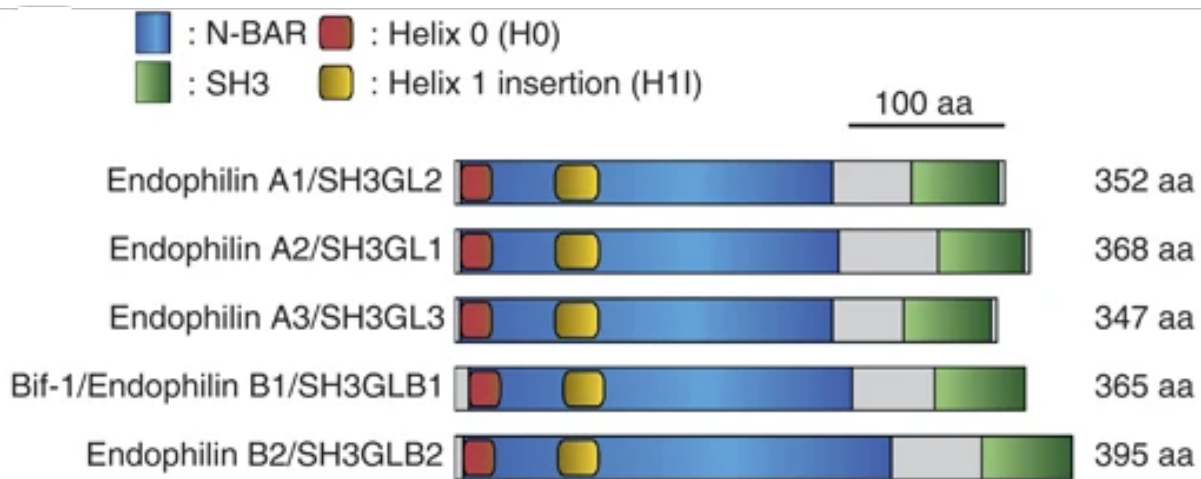


Figure 7. La structure des domaines de la famille des Endophilines.

Représentation schématique des Endophilines A et B chez l'Homme. Toutes les Endophilines sont composées d'un domaine N-BAR du côté N-terminal et d'un domaine SH3 C-terminal. Les régions d'insertion à la membrane plasmique, l'hélice 0 (H0) et l'hélice 1 (H1) sont situées dans le domaine N-BAR et bien conservées entre les familles A et B.

Figure tirée de (76).

1.3. Le récepteur du facteur de croissance épidermique

1.3.1. Les fonctions du récepteur à l'EGF

Les RTK sont des protéines qui contiennent un domaine N-terminal extracellulaire qui accepte un ligand spécifique, ainsi qu'un domaine intracellulaire responsable de l'activité tyrosine kinase. L'EGFR est un RTK qui appartient plus précisément à la famille HER/ErbB (*human epidermal factor/ avian erythroblastosis oncogene B*). Cette famille comporte l'EGFR (HER-1,

ErbB1), l'EGFR-2 (HER-2, ErbB2), HER-3 et HER-4, toutes étant des glycoprotéines transmembranaires (77).

Tout type cellulaire, à l'exception des cellules hématopoïétiques, exprime des membres de la famille ErbB (78). La présence des gènes *EGFR* est cruciale pour l'embryogenèse des vertébrés et certaines mutations qui empêchent l'expression de ces gènes chez la souris causent une fatalité embryonnaire ou périnatale due à des problèmes respiratoires (79, 80), ainsi qu'une apparition de défauts structuraux lors du développement des tissus de la peau, des poumons, du pancréas, du tractus gastro-intestinal et du système nerveux central (81-85). L'activation de l'EGFR stimule la transduction de différentes voies de signalisation et contrôle ainsi des fonctions physiologiques multiples comme la prolifération, la migration et l'apoptose cellulaire, ainsi que l'homéostasie tissulaire et la différenciation durant le développement. Une signalisation aberrante de l'EGFR est liée aux cancers. Différents types de cancers sont causés par une surexpression de l'EGFR : cancer du sein, cerveau, cou, poumons (*NSCLC : non small cell lung cancer*), reins, colon et ovaires (86). Souvent, ces mutations oncogéniques sont responsables d'une signalisation élevée due à une endocytose perturbée du récepteur.

L'autophagie est un processus par lequel une cellule réagit rapidement aux changements environnementaux afin de maintenir son homéostasie. Dans des milieux riches en nutriments, l'EGFR activé stimule la prolifération et inhibe l'autophagie. L'EGFR actif agit en phosphorylant Beclin-1, inhibant ainsi cette protéine qui fait partie du complexe d'initiation de l'autophagie VPS34 (87). Le récepteur peut aussi agir indirectement en activant AKT, qui à son tour active la voie mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) responsable de l'inhibition de l'autophagie (88, 89). À l'opposé, en cas de privation du sérum, l'EGFR sans ligand stimule l'autophagie. Dans de telles conditions, un nombre de récepteurs EGFRs inactifs continuent à être internalisés indépendamment du ligand et seront dégradés par les LAPTM4B (*lysosomal-associated protein transmembrane 4 beta*) au niveau des endosomes précoces ou tardifs. Avant d'être dégradés, ces récepteurs internalisés sont disponibles pour lier l'inhibiteur de l'autophagie Rubicon, libérant ainsi Beclin-1 pour initier le processus (90, 91).

1.3.2. La structure du récepteur à l'EGF

Le chromosome 7 du génome humain code une protéine précurseur d'EGFR formée de 1210 résidus. À la suite d'un clivage de la région N-terminale, la protéine EGFR mature de 1186 résidus s'insère à la membrane cellulaire. L'EGFR est formé de trois régions ; extracellulaire (*ectodomain*), transmembranaire et cytoplasmique (*endodomain*). La région extracellulaire est composée de 621 acides aminés et contient quatre domaines nommés les domaines I, II, III et IV. Les domaines I et III sont riches en Leucine et sont responsables de la liaison du ligand, alors que les domaines II et IV sont riches en Cystéine et ne rentrent pas en contact avec le ligand. Une portion hydrophobe de 23 acides aminés dans la région transmembranaire traverse la membrane cellulaire alors que les 542 résidus restants sont cytoplasmiques et incluent les tyrosines nécessaires pour l'activité kinase du récepteur (Figure 8) (92).

1.3.3. Les voies de signalisation transmises par l'EGFR activé

À l'aide de son domaine extracellulaire, l'EGFR reconnaît sept différents facteurs de croissance ; EGF (*epidermal growth factor*), HB-EGF (*heparin-binding EGF*), TGF- α (*transforming growth factor α*), amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), betacellulin (BTC) et epigen (EPI). En absence de ligand, le récepteur existe en conformation d'auto-inhibition. La liaison du ligand change cette conformation et permet une trans-autophosphorylation entre les domaines intracellulaires des deux récepteurs (92-94).

Les tyrosines phosphorylées dans le domaine C-terminal de l'EGFR forment des sites de liaison pour des protéines qui contiennent un domaine SH2 (*Src-homology 2*) ou un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*). Ces protéines adaptatrices recrutent des effecteurs de signal responsables de l'initiation des cascades de signalisation. Parmi les voies de signalisation stimulées par l'addition de l'EGF, nous citons : MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K/AKT (*phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B*), PLC- γ 1 (*phospholipase C- γ 1*), et JAK/STAT (*Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*) (Figure 9).

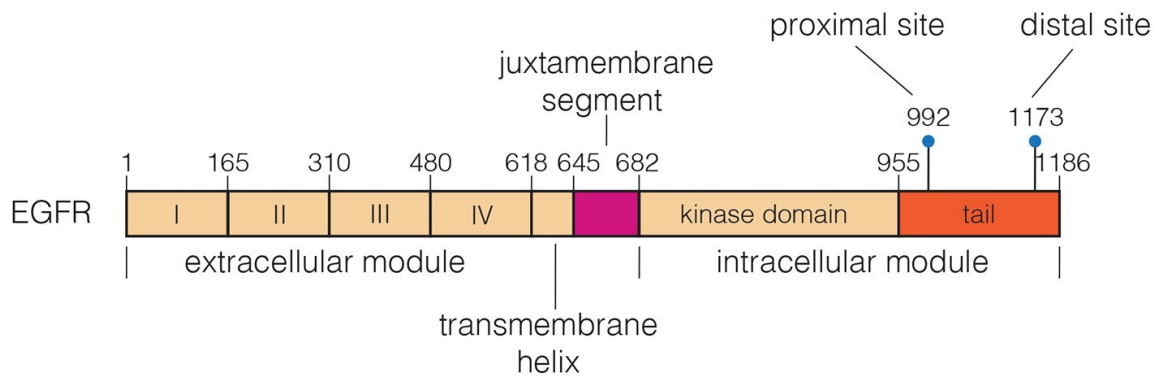


Figure 8. La structure de l'EGFR.

Les différents domaines d'une protéine EGFR.

Figure tirée de (95).

La voie MAPK est la voie la plus importante pour la survie et la prolifération cellulaire. Pour activer cette voie, les protéines adaptatrices GRB2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*) et SOS (*Son of Sevenless*) forment un complexe qui lie directement les phosphotyrosines pY1068/1086 de l'EGFR activé. GRB2 peut aussi lier la pY1148 du récepteur indirectement à l'aide d'une autre protéine adaptatrice, SHC (*Src homology 2 domain containing*) (96, 97). Ceci résulte en une activation de la protéine SOS qui va échanger RAS-GDP pour RAS-GTP et déclencher l'activation de la cascade RAF, MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) et ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) (98, 99). Les MAPKs phosphorylent et activent par la suite des facteurs de transcription liés à la migration et la prolifération cellulaire (100).

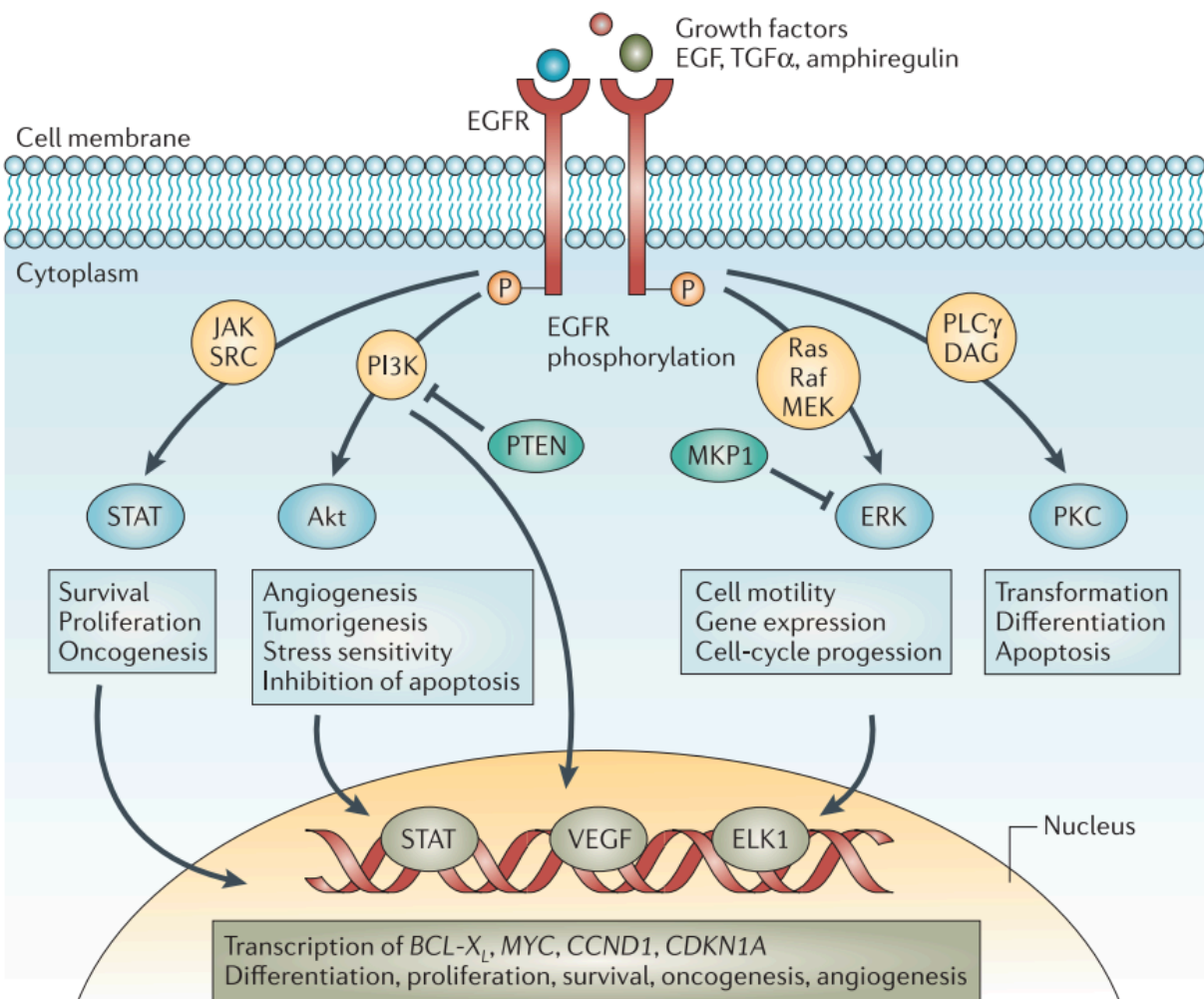
Dans la voie PI3K, l'EGFR forme un dimère avec le récepteur ErbB3 qui contient un site de liaison pour la kinase PI3K. La sous-unité régulatrice de cette kinase, p85 lie les phosphotyrosines du ErbB3 directement ou indirectement à travers GAB-1 (*GRB2 associated binding protein 1*) (101). Une fois liée, la sous-unité catalytique de cette kinase phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3), qui à son tour active la sérine/thréonine kinase Akt (102, 103). La voie PI3K/AKT régule la croissance et la migration cellulaire (104).

La phospholipase PLC- γ 1 contient un domaine SH2 à travers lequel elle interagit directement avec la pY1173 du récepteur activé (105). Une fois phosphorylée par le récepteur, elle hydrolyse PIP2 en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol, un cofacteur responsable de l'activation de PKC (*protein kinase C*). Les conséquences de l'activation de PKC dépendent du contexte cellulaire (106).

Finalement, l'EGFR catalyse aussi l'activation des STAT. Il s'agit d'une famille de facteurs de transcription qui existent sous forme inactive dans le cytoplasme et sont obligatoirement phosphorylés par un RTK pour être activés. Après avoir été phosphorylés sur la tyrosine, les molécules STAT forment des homo ou hétérodimères dépendants des interactions intermoléculaires SH2-phosphotyrosine du récepteur. L'association des molécules STAT avec ces résidus de phosphotyrosines du récepteur est implicite mais n'a pas été directement démontrée. Cette activation cause leur translocation vers le noyau où les homo ou hétérodimères, mais pas les monomères, sont compétents pour se lier à l'ADN et stimuler l'expression des gènes cibles. On ne sait pas si les STAT se dimérisent à la surface du RTK ou après dissociation (107, 108).

De façon intéressante, les Endophilines A participent aussi à la signalisation des RTKs comme l'EGFR. À la suite de sa liaison à l'EGF, l'EGFR est autophosphorylé ce qui recrute et active la ligase CBL. CBL ubiquityle l'EGFR déclenchant ainsi son internalisation et contribue donc à l'activation des voies de signalisation en aval comme MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). En plus de servir comme une ligase de l'ubiquitine, CBL recrute également l'Endophiline via la protéine adaptatrice CIN85. Cette protéine intermédiaire lie l'Endophiline de façon constitutive mais lie CBL surtout après stimulation du récepteur formant ainsi le complexe CBL–CIN85/Endophiline. Une inhibition de ces interactions empêche l'internalisation et la dégradation du récepteur et cause une augmentation de l'expression des gènes de transcription *SRE* (*serum response element*) dépendants de l'EGF (7). Les chercheurs de notre laboratoire ont montré qu'à la suite de l'activation par l'EGF, JNK stimule ITCH par phosphorylation. Et quand ITCH est surexprimée avec l'un de ses substrats CBL ou Endophiline dans une lignée cellulaire, ceci mène à leur ubiquitylation et dégradation (4, 36). D'où l'intérêt

dans mon projet d'empêcher cet effet en arrêtant l'expression d'ITCH et d'observer les conséquences sur le processus d'internalisation du récepteur à l'EGF à partir de la surface membranaire. Nous suggérons qu'en absence d'ITCH, la ligase CBL ne pourrait pas être envoyée vers une dégradation protéasomale et qu'Endophiline manquerait un partenaire moléculaire auquel elle se lie avec une grande affinité. La perturbation de ces événements pourrait affecter à la fois le trafic et la signalisation endocytaire de l'EGFR.



CCND1, gene encoding cyclin D1; CDKN1A, gene encoding p21; JAK, Janus kinase; TGF α , transforming growth factor- α .

Figure 9. Les principales voies de signalisation activées par l'EGFR.

- La phosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) peut activer directement ou indirectement le STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), STAT3 et STAT5. Les protéines STAT activées se déplacent vers le noyau et régulent directement l'expression de gènes cruciaux pour la survie, la prolifération, la transformation et l'oncogenèse cellulaire (109, 110).
- L'EGFR active la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) qui phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour former le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, qui à son tour active Akt en liant son domaine PH (*pleckstrin homology*). L'Akt phosphorylé a plusieurs effets, à la fois au niveau du cytoplasme et du noyau, parmi lequel l'inhibition des facteurs proapoptotiques tels que BAD (*BCL2 antagonist of cell death*), procaspase-9 et la famille Forkhead (FKHR) de facteurs de transcription (FOXO). L'activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) par Akt est également importante pour stimuler la prolifération cellulaire, et les facteurs VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et HIF1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) sont importants dans l'angiogenèse (111, 112).
- La voie Ras –MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) est activée après l'activation de l'EGFR par deux mécanismes, soit par le recrutement direct de GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) à travers le domaine SH2 ou par le recrutement indirect de GRB2 via l'adaptateur SHC. Ras est activé par la phosphorylation qui est médiée par SOS (*son of Sevenless*). Le Ras activé se lie à RAF, qui à son tour déclenche la phosphorylation de MEK1/2 et ERK1/2. Les ERK1/2 phosphorylées se déplacent vers le noyau et activent différents facteurs de transcription tel que ELK1. Plusieurs protéines du cytosquelette sont également activées par ERK1/2 (113, 114).
- PLC γ (*phospholipase c- γ*) se lie à la tyrosine kinase de l'EGFR phosphorylée via son domaine SH2 pour devenir active. Une fois activée, PLC γ hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en DAG (*diacylglycerol*) et IP3 (*inositol triphosphate*). IP3 intervient dans la libération du calcium des réserves intracellulaires, affectant une multitude d'enzymes dépendantes du Ca²⁺, alors que le DAG est un cofacteur pour l'activation sérine/thréonine de la kinase PKC (*protein kinase-C*). L'activation de PKC entraîne une progression du cycle cellulaire, une transformation, une différenciation et une apoptose (115).

Figure tirée de (109).

1.4. Problématique et objectifs

ITCH est une ligase de l'ubiquitine jouant un rôle régulateur de différents processus cellulaires parmi lesquels l'endocytose. L'EGFR est un récepteur qui signale la transduction de différentes voies de prolifération, croissance, migration et survie cellulaire. La liaison du ligand au domaine extracellulaire provoque des changements allostériques dans la partie intracellulaire du récepteur entraînant l'activation de la tyrosine kinase intracellulaire. Le réseau de signalisation médié par l'EGFR est extrêmement complexe, finement régulé et peut entraîner une prolifération chronique des cellules en cas de dérégulation. Les facteurs de croissance stimulent l'EGFR et l'endocytose suivante du récepteur l'achemine vers les endosomes pour être ciblé vers une dégradation lysosomale ou pour le recyclage, deux événements qui mettent fin à la signalisation. c-Cbl est la ligase de l'ubiquitine qui cible les EGFR vers la dégradation lysosomale en les marquant avec plusieurs molécules d'ubiquitine (5). ITCH pourrait participer à la régulation de ce processus en modifiant la ligase CBL et autres protéines du trafic endocytique. Il est connu qu'elle signale la dégradation protéasomale de CBL. Toutefois, l'importance de son interaction avec d'autres protéines comme l'Endophiline, reste inconnue. Endophiline, une protéine impliquée dans l'internalisation de l'EGFR, utilise son domaine SH3 pour interagir avec la région riche en prolines de ITCH. Endophiline est une protéine à domaine BAR qui participe à la courbure de la membrane plasmique à des étapes précoces et/ou tardives de la formation de la vésicule de Clathrine. Elle participe aussi à la fission de la vésicule de Clathrine en utilisant son domaine SH3 pour recruter la GTPase dynamine. De même, elle recrute la phosphoinositide phosphatase synaptojanine pour faciliter le démantèlement de la vésicule, un événement crucial pour la continuation des cycles d'endocytose. En fait, l'absence d'Endophiline produit des défauts synaptiques profonds, notamment une accumulation de vésicules endocytiques enrobées de Clathrine et incapables de recycler, accompagnée d'une défaillance ultérieure de la transmission synaptique.

Les autres protéines impliquées dans l'endocytose de l'EGFR et qui utilisent aussi leurs domaines SH3 pour reconnaître la PRR d'ITCH sont des acteurs à différentes étapes de l'internalisation dépendante de la Clathrine. Comme Endophiline, Amphiphysine est une

protéine qui recrute la dynamine aux puits endocytiques. Pacsin recrute N-WASP, le régulateur clé de l'assemblage de l'actine sans lequel la réaction endocytique est perturbée. Les liaisons SH3-PRR sont communes et cruciales pour connecter les complexes protéiques qui accompagnent la Clathrine dans l'acheminement du récepteur à l'espace intracellulaire.

Premièrement, différents motifs dans la région PRR d'ITCH lient les domaines SH3 des substrats avec des affinités variées. Retrouver une forme d'ITCH qui lie moins l'Endophiline nous permettrait d'identifier le rôle fonctionnel du complexe ITCH-Endophiline dans un modèle $ITCH^{-/-}$. Les résultats publiés dans l'article présenté en Annexe 1 montraient une analyse de l'interaction entre la région riche en prolines purifiée d'ITCH et les différentes protéines à domaine SH3 choisies. Mon premier objectif au cours de mes études doctorales était donc de mieux caractériser l'identité moléculaire de ces interactions établies par la PRR d'ITCH mais cette fois-ci au sein de la ligase complète. Nous pouvons aussi confirmer des résultats précédents générés dans notre laboratoire dans lesquels la liaison Endophiline SH3-ITCH PRR a été définie comme une interaction de haute affinité *in vitro* (Annexe 1). Dans ce but, une série de mutations dans la protéine ITCH fut effectuée et les mutants en PRR furent testés pour leurs capacités à lier le domaine SH3 d'Endophiline en comparaison avec Amphiphysine, Pacsin et β -Pix, des protéines connues pour lier la PRR d'ITCH à travers leur domaine SH3. Ces tests d'interaction nous ont permis de comparer l'affinité de ITCH et celle des quatre mutants (arginines R₂₅₂E, R₂₅₅E, R_{252,255,258}E et R_{265,266}E) pour le SH3 d'Endophiline par rapport aux SH3 des autres protéines testées dans le contexte de la protéine entière. À l'aide de ces mutations ponctuelles, nous avons identifié les résidus de la région PRR qui sont essentielles pour l'interaction avec le domaine SH3 d'Endophiline A1 et A2 ainsi que les SH3 des autres protéines testées. Ces résultats approuvaient et facilitaient l'analyse des données générées à l'aide de la PRR tronquée.

Le second objectif était de démontrer les rôles fonctionnels des interactions établies par ITCH dans l'endocytose dépendante de la Clathrine. Nous avons auparavant démontré que ITCH lie plusieurs protéines qui fonctionnent dans ce processus. Nous voulions donc déterminer l'effet de l'absence de la protéine ITCH sur l'endocytose dépendante de la Clathrine. L'expression du

gène *ITCH* fut abolie par CRISPR/Cas9 dans les cellules HeLa et Cos7 et l'internalisation du complexe EGF-EGFR observée en microscopie confocale dans des essais d'endocytose de l'EGF fluorescente. Afin de spécifier si l'absence de ITCH altère la voie dépendante ou indépendante de Clathrine ou les deux, différentes concentrations d'EGF furent testées. La capacité des cellules *ITCH*^{-/-} à performer dans les différentes voies d'internalisation fut jugée en comparant avec les cellules parentales de deux types cellulaires, Hela et Cos7. Des essais de sauvetage à l'aide d'ITCH non catalytique et ITCH mutant liant moins les protéines à domaine SH3 furent effectués. Seule la protéine ITCH WT était capable de rétablir un niveau d'EGF internalisé normal dans les cellules *ITCH*^{-/-}. Ces essais permettent d'impliquer les liaisons aux protéines à domaine SH3 et la fonction catalytique d'ITCH dans l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR.

Le troisième objectif était de vérifier l'impact de l'absence d'ITCH sur le profil protéique et l'ubiquitinome général des cellules. Pour approfondir notre connaissance sur le potentiel régulateur de la ligase de l'ubiquitine ITCH, nous avons effectué deux types d'analyses protéomiques à partir des lysats cellulaires *ITCH*^{-/-} comparés aux WT. L'une pour chercher l'interactome et l'autre pour l'ubiquitinome d'ITCH. Ces analyses nous ont permis de relier ITCH à plusieurs processus cellulaires et de découvrir son engagement dans de nouveaux mécanismes. Ces résultats approfondissent notre connaissance sur l'importance du système d'ubiquitylation et son large impact sur les événements cellulaires.

2. La caractérisation de l'interaction entre la ligase de l'ubiquitine ITCH et les protéines endocytiques à domaine SH3

2.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons étudié les interactions de la protéine ITCH avec le domaine SH3 de son partenaire Endophiline en comparaison avec trois autres protéines à domaine SH3, Amphiphysine, Pacsin et β -Pix. Les objectifs étaient de caractériser les résidus d'ITCH impliqués dans l'interaction afin de produire un mutant incapable de lier Endophiline dans la cellule.

2.1.1. L'interaction du domaine SH3 avec la région riche en prolines

Les domaines SH3 sont des domaines protéiques composés d'une soixantaine d'acides aminés hautement conservés, mais quelques sites clés varient permettant à ces différentes protéines de lier un large éventail de cibles moléculaires. Les domaines SH3 reconnaissent typiquement les séquences riches en prolines contenant les motifs PxxP. Ces motifs adoptent une conformation hélicoïdale de polyproline (PPII : *polyproline type II*) et sont divisés en deux classes: la classe I représentée par le consensus $Rx\emptyset PxxP$ et la classe II par le consensus $Px\emptyset PxR$ (où \emptyset est un acide aminé hydrophobe) (Figure 10). La nature pseudo symétrique de ces motifs leur permet de lier un domaine SH3 dans des orientations opposées mais le mode de liaison reste le même (116, 117).

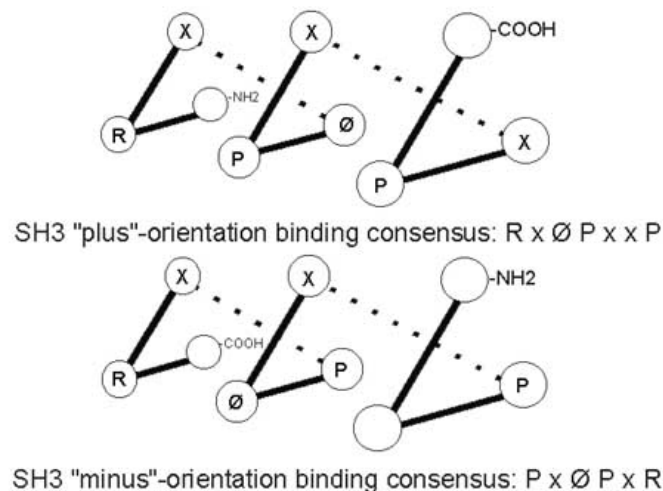


Figure 10. Les acides aminés essentiels des domaines PRR permettant leurs liaisons aux domaines SH3 dans deux orientations opposées ("plus" et "moins").

R = arginine, P = proline, ϕ = acide aminé hydrophobe aliphatique.

Figure tirée de (117).

Les interactions SH3-PRR synchronisent le recrutement et les fonctions des protéines participant aux différentes étapes de l'endocytose. La GTPase dynamine par exemple, contient une PRR qu'elle utilise pour lier au moins quatre protéines endocytiques : Endophiline, Pacsin, Intersectine et Amphiphysine (118-120). Trois de ces protéines, Endophiline, Amphiphysine et Pacsin, contiennent également un domaine BAR, un module protéique avec des propriétés de génération et de détection de la courbure membranaire (121). Ces protéines aident ainsi à la déformation de la membrane lipidique pour créer ces vésicules endocytiques (122). Endophiline et Amphiphysine dirigent la dynamine vers le site d'invagination où l'activité GTPase de la dynamine permet de resserrer le cou de la vésicule et d'effectuer une action de torsion ou d'étirement qui favorise la fission membranaire (123).

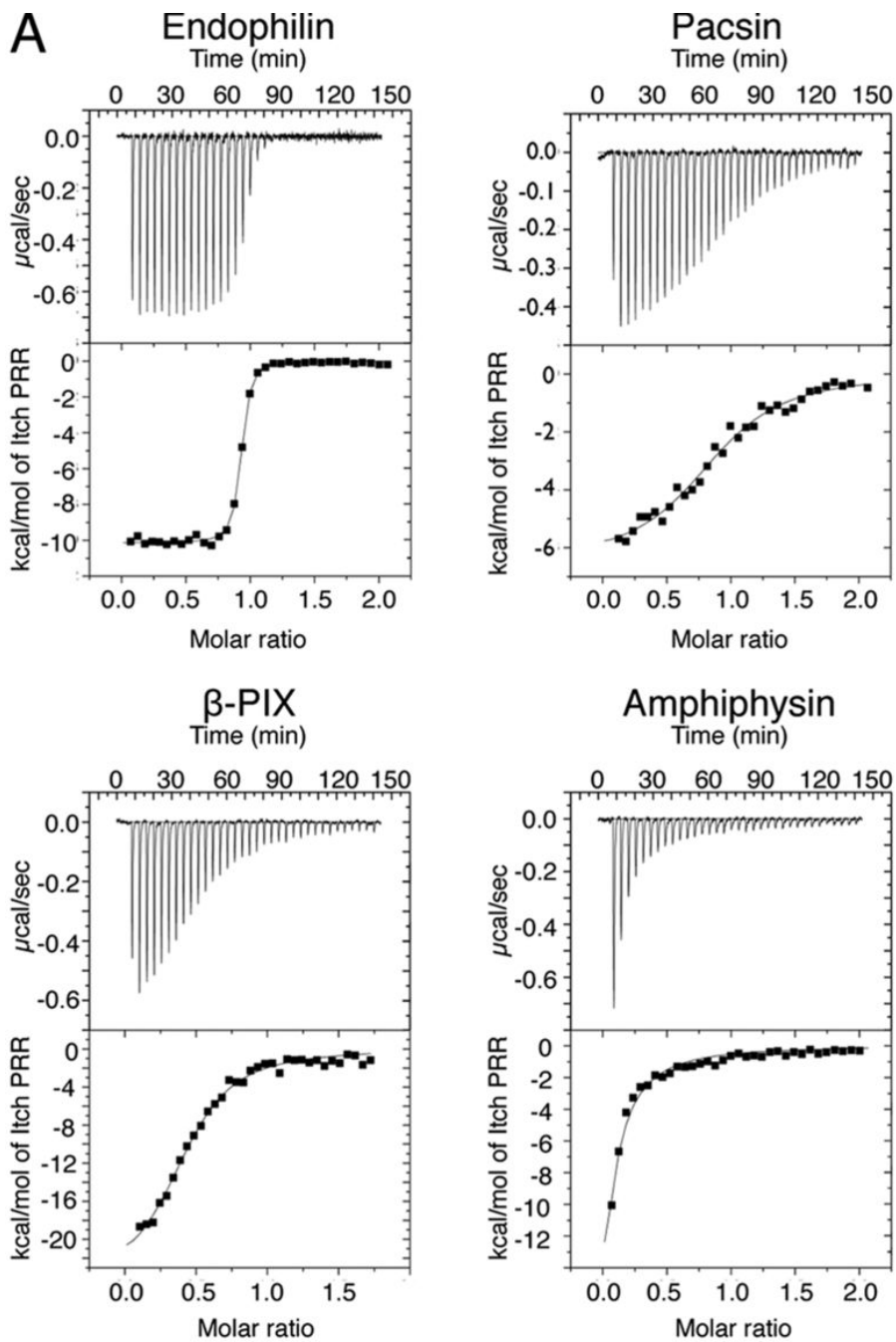
2.1.2. Les partenaires à domaines SH3 d'ITCH

Typiquement, une ligase de type CWH lie son substrat à travers les domaines WW. Exceptionnellement, ITCH utilise aussi sa région PRR pour lier le domaine SH3 de certains substrats, parmi lesquelles des protéines qui jouent un rôle dans l'endocytose dépendante de la Clathrine. Précédemment, une spectrométrie de masse à partir des extraits de cerveau de rat fut réalisée dans notre laboratoire afin de répertorier les nouvelles protéines à domaine SH3 qui interagissent avec la PRR d'ITCH. À partir de ces résultats, les interactions de la PRR d'ITCH avec Endophiline (A1, A2, A3 et B2), Grb2, Amphiphysine II, Pacsin I, Intersectine, β -Pix, CIN85 (*Cbl-interacting protein*) et SNX9 furent confirmées (1). Ensuite, dans le but d'investiguer le degré de sélectivité de ce type d'interactions et à l'aide des tests ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*), la PRR d'ITCH a été testée pour son affinité envers les domaines SH3 purifiés d'Endophiline, Pacsin, β -Pix, and Amphiphysine. Les thermogrammes ont indiqué une affinité

comparable de la PRR envers les SH3 de Pacsin et β -Pix (1 à 4 μ M). L'affinité de la PRR d'ITCH pour Endophiline était de loin la plus élevée avec un K_D de 45.74nM (Figure 11). Cette étude a ainsi démontré que l'affinité de la PRR d'ITCH envers les domaines SH3 varie considérablement et qu'elle a une nette préférence pour l'Endophiline (Annexe 1) (1).

De façon intéressante, les 20 acides aminés de la région riche en prolines d'ITCH, PSRPPRPSRPPPPTPRRP, présentent quatre sites potentiels de liaison aux SH3, trois de classe II et un de classe I. En étudiant la préférence des domaines SH3 pour ces motifs, nous avons déterminé que ITCH lie Endophiline spécifiquement à travers le motif de classe II, RPPRPSR (résidues 252–258). Alors que Amphiphysine et Pacsin lient aussi cette région, β -Pix lie une portion relativement plus étendue entre les peptides 252 et 266. En conséquence, et pour disséquer davantage les préférences de PRR pour les SH3 des protéines testées, différentes arginines dans une construction GST-FLAG-PRR ont été mutées et utilisées dans des essais de pull-down pour récupérer les protéines à domaine SH3 dans des lysats de cerveau de rat. Bien que la liaison de la plupart des SH3 liant ITCH ont montré différentes sensibilités à la mutation des résidus arginines dans le motif PRR, seule la mutation triple $R_{252,255,258}E$ abolissait l'interaction avec Endophiline. Toutefois, tous les autres SH3 testés étaient également incapables de lier le triple mutant (Annexe 1) (1, 120).

Tous ces essais ayant été menés avec la PRR isolée. Il était donc nécessaire d'examiner l'effet de ces mutations dans le contexte de la protéine complète afin de pouvoir réaliser des expériences *in vivo*. J'ai ainsi muté ces arginines dans la protéine ITCH complète dans le but d'obtenir une forme d'ITCH incapable de lier Endophiline et qui pourrait être utilisée dans un système cellulaire. Des essais de pull-down à l'aide des GST-SH3 de l'Endophiline en comparaison avec d'autres partenaires d'ITCH m'ont permis de retrouver une ligase de l'ubiquitine active mais incapable de rejoindre ses partenaires à domaine SH3 dans la cellule.



B

	Peptide 249-269		Peptide 224-276 Desrochers et al, 2015	
	K _D	N ^(a)	K _D	N ^(a)
Endophilin	33.16 ± 1.86 nM	0.96 ± 0.07	45.74 ± 2.66 nM	0.95 ± 0.02
Pacsin	3.80 ± 0.74 μM	0.98 ± 0.11	4.33 ± 0.13 μM	0.96 ± 0.01
β-PIX	1.59 ± 0.39 μM	0.43 ± 0.03	1.44 ± 0.04 μM	0.49 ± 0.02
Amphiphysin	NQ	NQ	NQ	NQ

^(a) Stoichiometry

NQ: Not quantifiable

Figure 11. Thermogrammes ITC représentatifs obtenus par l'ajout successif de PRR d'ITCH à un ensemble de domaines SH3.

A, Résultats représentatifs obtenus par ITC pour la liaison du peptide 249-269 au domaine SH3 d'Endophiline, Pacsin, β-Pix et Amphiphysine. B, Paramètres thermodynamiques d'interaction à partir de l'analyse ITC du peptide 249-269 compilées avec les résultats obtenus précédemment en utilisant le peptide 224-276 (120). K_D : la constante de dissociation calculée, a : ratio molaire des interactions PRR-SH3 (stœchiométrie observée).

Figure tirée de (1).

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Mutagenèse dirigée

Selon les instructions du kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, USA), quatre mutations ponctuelles d'une ou plusieurs arginines dans la séquence ITCH complète furent effectuées (Figure 13A). En bref, le vecteur pEGFP-C2 contenant l'ADNc ITCH (4) fut répliqué dans des bactéries *Escherichia Coli* dam⁺ de façon à ce que les Adénines (A) des séquences

GATC soient méthylées. Quatre paires d’amorces furent utilisées ciblant chacune des arginines de la PRR d’ITCH pour amplifier l’ADN et introduire les mutations (Tableau 1) . Les produits de PCR furent digérés ensuite pendant 2h avec l'enzyme DpnI à 37°C. Cette enzyme digère l'ADN méthylé donc l'ADN matrice et ne digère pas les brins nouvellement synthétisés (non méthylés). Un exemple de mutagenèse est montré pour l’un des mutants dans la Figure 12. Les ADN mutants furent ensuite insérés dans des bactéries compétentes DH5α (Invitrogen). L'ADN fut mis en contact avec les bactéries pour 30 min dans la glace suivi par un choc thermique de 45sec à 42°C. Le vecteur pEGFP-C2 contenant un gène de résistance à la Kanamycine, les bactéries furent mises en culture toute une nuit sur du milieu LB agar contenant l'antibiotique Kanamycine. Certaines colonies bactériennes sélectionnées furent incubées toute la nuit dans du milieu nutritif LB dans le but d'extraire les plasmides. Après extraction de l'ADN plasmidien, la présence des mutations dans les séquences fut vérifiée par séquençage Sanger (IRIC).

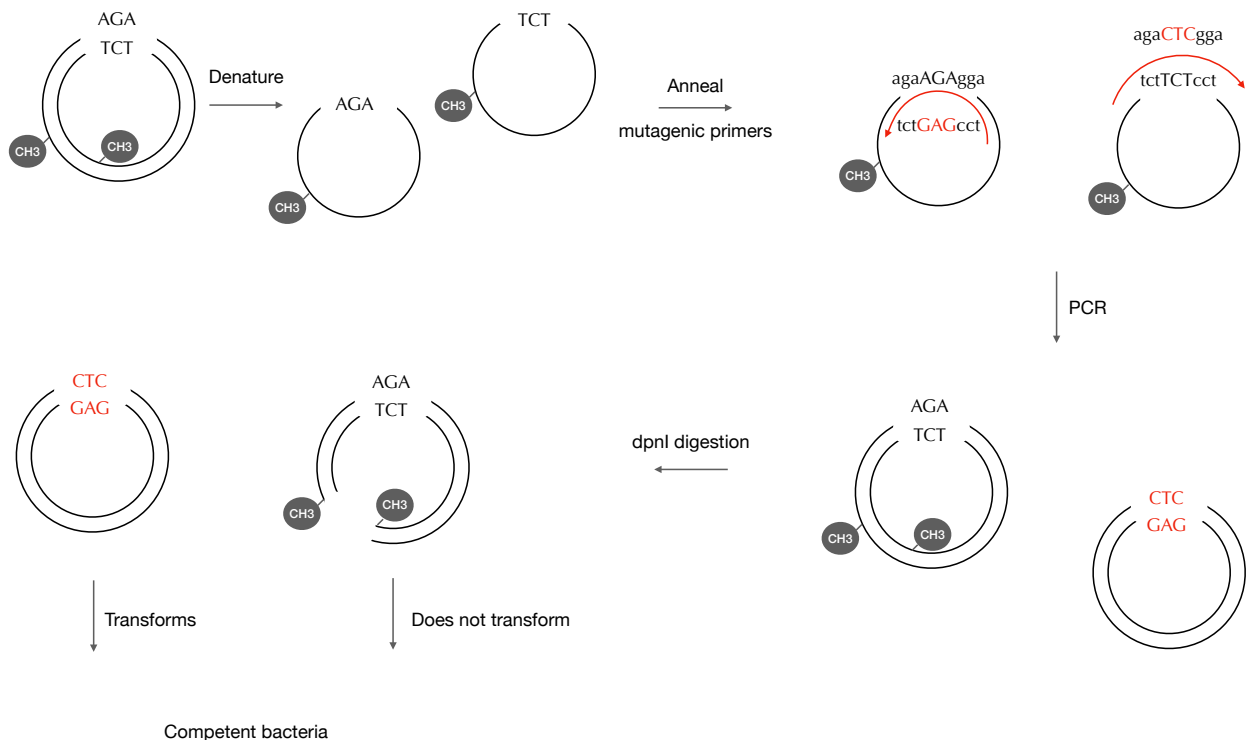


Figure 12. Représentation schématique de la mutagenèse dirigée.

L'ADNc du gène cible est répliqué dans des bactéries *Escherichia Coli* dam+ de façon à ce que les Adénines (A) des séquences GATC soient méthylées. L'ADNc est amplifié par PCR à l'aide d'amorces contenant l'altération de séquence à introduire. Ici, l'amorce modifie une arginine (AGA) en acide glutamique (CTC). L'enzyme DpnI digère les brins méthylés uniquement. Les brins d'ADN nouvellement synthétisés et non méthylés ne sont pas digérés et peuvent être transformés dans des bactéries compétentes.

2.2.2. Essais de pull-down pour les tests d'interactions moléculaires

Afin de déterminer les arginines les plus importantes pour la liaison entre la PRR d'ITCH et le domaine SH3 des protéines choisies, les cellules HEK293T furent transfectées avec le vecteur GFP couplé à ITCH sauvage, ou aux mutants R₂₅₂E, R₂₅₅E, R_{265,266}E et R_{252,255,258}E (Figure 13A). Pour toutes ces expériences de pull-down, les cellules HEK293T furent transfectées avec les constructions désirées à l'aide de la méthode calcium/phosphate. 48h après la transfection, les cellules furent lavées 3x avec du PBS (*phosphate-buffered saline*, 20 mM NaH₂PO₄, 0.9% NaCl, pH 7.4) et suspendues dans le tampon A (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, inhibiteurs des protéases). Les lysats furent agités pour 20min en présence de TritonX-100 à une concentration finale de 1% puis centrifugés à 15000rpm à l'aide d'une microcentrifugeuse. Les surnageants furent incubés avec des billes de Sepharose couplées à la Glutathione (GSH) et liées à la GST seule (contrôle négatif) ou à la protéine de fusion GST-SH3 à tester toute la nuit à 4°C. Les billes furent ensuite lavées 3x avec 1ml du tampon A additionné de TritonX-100 (1% final), éluées dans du LSB (*loading SDS sample buffer* ; 3% SDS, 1% beta-mercaptoéthanol, 115mM sucrose, 65mM tris-HCL pH6.8 et 0.1% colorant bleu de bromophénol) incubées 10min à 95°C et migrés sur gel SDS-PAGE pour Western-Blot. Les protéines GFP-ITCH ont été révélées avec l'anticorps anti-GFP.

La GST et les fusions GST-SH3 d'Endophiline A1, Amphiphysine II, Pacsin et β -Pix furent liées aux billes GSH toute la nuit à 4°C pour être utilisées dans le test de pull-down à partir des extraits des cellules exprimant les mutants GFP-ITCH. Les extraits cellulaires furent incubés avec les quantités indiquées des protéines de fusion puis migrés sur un gel SDS-PAGE. À la suite d'un

transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, un immunomarquage avec l'anticorps contre la GFP fut appliqué (Tableau 2) afin de visualiser GFP-ITCH.

Tableau 1. Les amorces utilisées pour générer la mutation ITCH.

Mutation	Séquences des amorces	Tm
full-ITCH-R252E	FWD 5'-ATCACTCTCAAATGGTGGTTTTAAACCTTCTGAGCCTCCAAGACCTTCCAC-3'	81
	REV 5'-GTGAAGGTCTGGAGGCTCAGAAGGTTTTAAACCACCATTTGAGAGTGAT-3'	81
full-ITCH-R255E	FWD 5'-GTTTTAAACCTTCTAGACCTCCAGAGCCTTCCAGACCACCACCACC-3'	82
	REV 5'-GGTGGTGGTGGTCTGAAGGCTCTGGAGGCTAGAAGGTTTTAAAC-3'	82
full-ITCH-R252-255-258E	FWD 5'-CTCCATCACTCTCAAATGGTGGTTTTAAACCTTCTGAGCCTCCAGAGCCTTCCAGACCACCACCACCACCCCA-3'	93
	REV 5'-TGGGGTGGGTGGTGGTGGCTCTGAAGGCTCTGGAGGCTCAGAAGGTTTTAAACCACCATTTGAGAGTGATGGAG-3'	93
full-ITCH-R265-266E	FWD 5'-CACGACCACCACCACCACCACCCAGAGGAGCCAGCATCTGTCAATGGTTCA-3'	92
	REV 5'-TGAACCATTGACAGATGCTGGCTCTCTGGGGTGGGTGGTGGTGGTCGTG-3'	92

(Tm : *melting temperature*).

2.2.3. Essai de pull-down pour la détection d'ubiquitylation

Des cellules 293T furent transfectées avec les vecteurs 6HIS-Myc-ubiquitine, GFP-Endophiline A1 et GFP-ITCH WT, CA ou R_{252,255,258E} et extraites de la même façon que 2.2.2 mais dans un tampon 10mM tris-HCL pH8, 100mM NaH₂PO₄, 8M Urée et 10mM Imidazole. Les lysats furent incubés toute la nuit à 4°C avec des billes de Nickel-Sepharose puis lavés 3x à l'aide de la solution de lyse cellulaire mais à une concentration finale de 20mM d'Imidazole. Les billes furent éluées dans du LSB, incubées 10min à 95°C et migrés sur gel SDS-PAGE pour l'immunodétection. Les complexes Endophiline-ubiquitine ont été révélées par un anticorps anti-Endophiline (Tableau 2).

2.2.4. Essai d'immunoprécipitation pour la détection d'ubiquitylation

Les cellules 293T furent surexprimées avec HIS-Myc-ubiquitine, GFP-Endophiline A1 et GFP-ITCH WT, CA ou R_{252,255,258E}. 48h post-transfection, les cellules transfectées furent lysées dans le tampon A et les lysats incubés avec l'anticorps anti-GFP et les billes protéine A-Sepharose toute la nuit à 4°C. Pour les contrôles négatifs, les billes protéine A-Sepharose furent incubées avec le lysat cellulaire sans anticorps, ou avec l'anticorps sans lysat cellulaire. Les billes furent ensuite

lavées 3x dans 1ml de tampon A additionné de triton X-100 à une concentration finale de 1% et migrés sur gel SDS-PAGE pour Western-Blot. L'anticorps anti-Myc a révélé les complexes Endophiline-ubiquitine. Une portion (10%) du lysat cellulaire fut révélée avec les anticorps anti-GFP et anti-myc (**Tableau 2**) pour vérifier l'expression des protéines.

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés.

Protéine	Numéro de Catalogue	Compagnie	Concentration utilisée
pan-endophiline	36-3400	Invitrogen	1:1000
GFP	A6455	Invitrogen	1:15000
Myc	05-419	Millipore	1:1000

2.3. Résultats

2.3.1. Interaction d'ITCH avec le domaine SH3 d'Endophiline A2

Dans le but d'étudier la région PRR d'ITCH et de déterminer les résidus qui sont essentiels pour son interaction avec les domaines SH3 des protéines endocytiques, une série de mutations ponctuelles furent créées par changement de certaines arginines (R) de la PRR dans la protéine complète par des acides glutamiques (E) (Figure 13A). Les cellules HEK293T furent transfectées avec le vecteur GFP-ITCH WT ou GFP-ITCH R_{252E}, R_{255E}, R_{265,266E} et R_{252,255,258E}. La protéine de fusion GST-Endophiline A2 SH3 fut utilisée dans un essai de pull-down pour récupérer les différentes formes d'ITCH. L'immunoblot anti-GFP montre que la mutation triple Arginine (R_{252,255,258E}) abolit l'interaction avec le SH3 d'Endophiline A2, confirmant ainsi que la ligase utilise le motif RPPRPSR (résidus 252–258) pour lier Endophiline. Les mutations ponctuelles des arginines 252 et 255 affectent la liaison à un degré comparable. Ces deux mutants montrent une réduction visible du niveau d'interaction comparé aux protéines sauvage et non catalytique (CA) qui lient SH3 de la même manière. Finalement, la mutation qui touche les deux dernières arginines de la séquence R_{265,266E} semble affecter relativement peu l'interaction (Figure 13B).

Une expérience similaire fut effectuée mais en utilisant différentes concentrations de la protéine de fusion pour lier ce mutant afin de comparer l'affinité des domaines SH3 d'Endophiline et Amphiphysine pour le mutant R_{252,255,258E}. La Figure 14 nous montre que le degré de liaison aux protéines contrôle WT et CA ayant une PRR intacte, augmente graduellement avec les concentrations de la protéine de fusion utilisée. De façon importante, l'expérience montre que même une quantité excédentaire (20µg) du SH3 d'Endophiline A2 ne permet de révéler la récupération que d'une quantité minimale de la protéine ITCH triple mutante (Figure 14B).

La même expérience fut réalisée avec une fusion GST-SH3 de la protéine Amphiphysine II. Aucune interaction avec le mutant R_{252,255,258E} en présence de la plus forte concentration de la protéine de fusion n'a pu être détectée (Figure 14C). Ce résultat est conséquent avec les résultats publiés par notre laboratoire montrant une affinité beaucoup plus élevée du SH3 d'Endophiline pour ITCH (120) tout en montrant que la mutation R_{252,255,258E} bloque efficacement l'interaction avec l'ensemble des SH3.

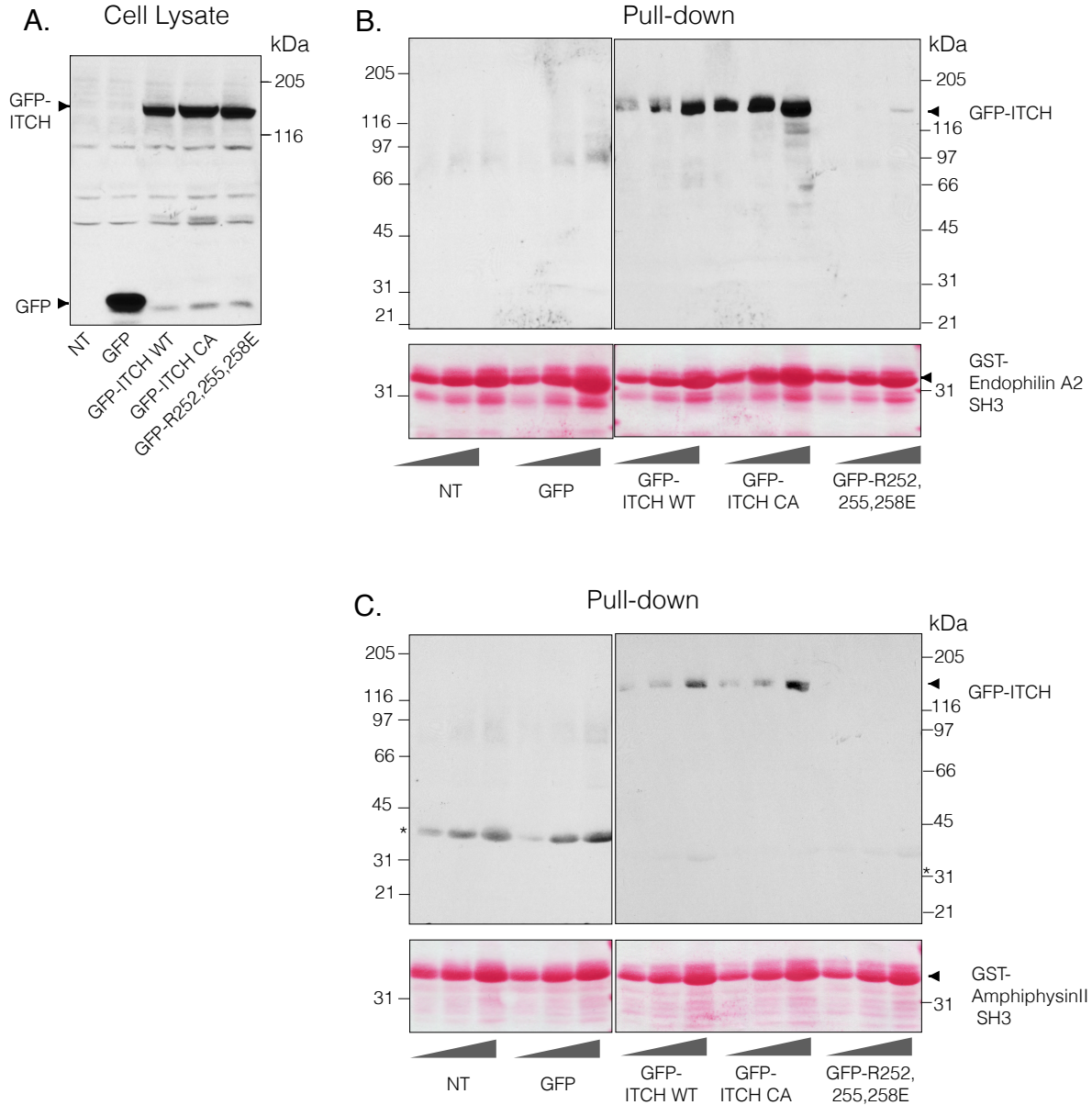


Figure 14. Interaction du mutant triple arginine de la ligase ITCH avec des niveaux croissants des domaines SH3 d'Endophiline A2 et d'Amphiphysine II.

Des cellules HEK293T transfectées avec les constructions GFP-ITCH WT, GFP-ITCH CA et GFP-ITCH R252,255,258E. A) Un Immunoblot anti-GFP montrant les niveaux de surexpression des protéines ITCH sur 10% des protéines extraites. B) Récupération des fusions GFP-ITCH avec 5, 10 ou 20µg de billes Glutathion-Sepharose liées à GST-SH3 Endophiline A2 ou C) GST-SH3 d'Amphiphysine II. Pour chaque protéine de fusion, la partie du bas montre les niveaux des protéines de fusion GST-SH3 par coloration

au rouge de ponceau. Les Immunoblot anti-GFP dans les parties du haut montrent le manque de récupération de GFP- ITCH R_{252,255,258}E par les protéines de fusion.

*Réactivité non spécifique de l'anticorps avec les billes de Glutathion.

2.3.2. Liaison à d'autres protéines endocytiques à domaine SH3

D'autres protéines à domaine SH3 avaient été identifiées comme partenaire d'interaction de la PRR de ITCH (1). Dans des essais de pull-down à partir d'extraits cellulaires exprimant les mutants, deux différentes concentrations des domaines SH3 d'Endophiline, Amphiphysine, Pacsin et β -Pix fusionnés à la GST (1 et 10 μ g) furent testées pour obtenir une meilleure idée sur le degré d'importance de chacun des résidus pour l'interaction (Figure 15). Une interaction est considérée forte si visible avec 1 μ g de fusion GST-SH3, plus faible si visible juste avec 10 μ g et nulle si invisible même à 10 μ g.

Nous observons que parmi les quatre protéines étudiées, les interactions ITCH WT-Endophiline A1, β -Pix et Amphiphysine II sont fortes, l'interaction avec Pacsin est faible. Cet effet est visible avec les deux concentrations de la protéine de fusion où par exemple, la bande est la moins abondante pour Pacsin à 10 μ g et invisible à 1 μ g. En remplaçant l'arginine 252 par l'acide glutamique, la liaison aux SH3 d'Amphiphysine II et Pacsin est grandement affectée. Les interactions ITCH R₂₅₂E-Amphiphysine II et Pacsin sont parmi les plus faibles où les domaines SH3 de ces deux protéines ne récupèrent aucune quantité visible du mutant R₂₅₂E même en présence de 10 μ g de protéine de fusion. La β -PIX réussit à lier ce mutant seulement quand 10 μ g de son domaine SH3 est utilisé. L'Endophiline A1 est la protéine la moins affectée par la mutation de l'arginine 252, vu que son SH3 lie quand même ce mutant à un degré visible à 1 μ g de la protéine de fusion. Le mutant ITCH R₂₅₅E est le plus faible à lier Amphiphysine II et Pacsin, où aucune bande n'est visible pour ces protéines de fusion. Mais cette fois-ci, l'Endophiline A1 est plus sensible à la mutation de l'arginine 255 et lie cette forme de ITCH de façon faible. La liaison au SH3 de β -Pix est moins affectée aussi par cette mutation. Une mutation qui touche les trois arginines 252, 255 et 258 ne réussit à lier aucune des protéines de fusion aux concentrations testées. Finalement, la modification des arginines 265 et 266 rend la liaison

d'ITCH aux SH3 d'Amphiphysine II et β -PIX faible. Comme pour les autres mutants, la Pacsin ne lie pas GFP-ITCH R_{265,266E}. Le domaine SH3 d'Endophiline A1 lie fortement le mutant R_{265,266E} (Figure 15).

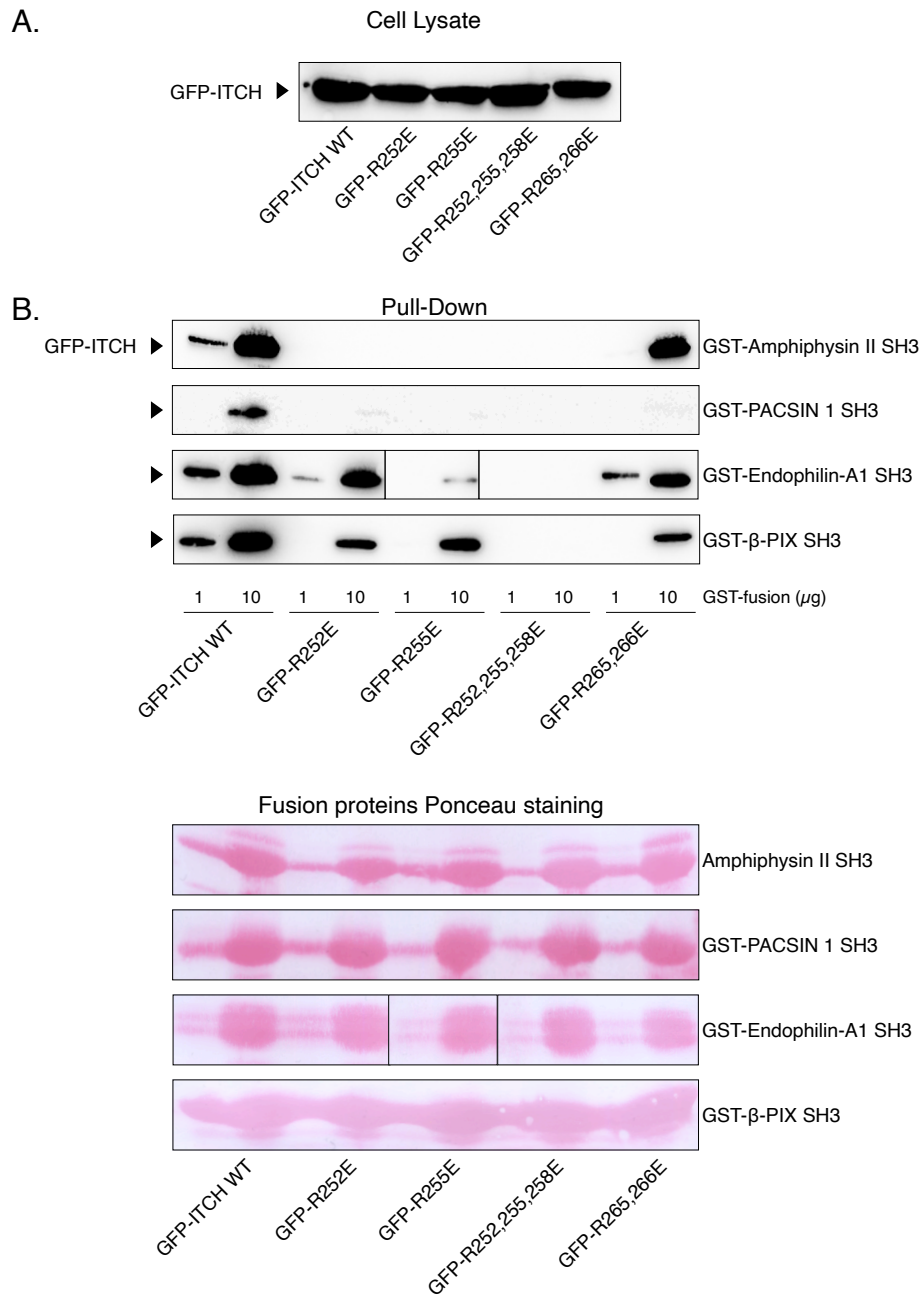


Figure 15. Interactions des domaines SH3 d'Amphiphysine II, Pacsin I, Endophiline A1 et β -PIX avec les différents mutants de la ligase ITCH.

Des cellules HEK293T furent transfectées avec les différentes constructions GFP-ITCH WT, GFP-ITCH CA, GFP-ITCH R_{252E}, R_{255E}, R_{252,255,258E} et R_{265,266E}. À la suite de l'extraction, les protéines furent incubées avec 1 ou 10µg de billes GST couplées aux SH3 des protéines indiquées. A) Un Immunoblot anti-GFP fut réalisé sur 10% des protéines extraites afin de vérifier les niveaux d'expression des constructions GFP-ITCH dans les cellules transfectées. Des immunoblots anti-GFP furent réalisés pour détecter les protéines GFP-ITCH récupérées par les protéines de fusion GST-SH3 (panneaux du haut). Les panneaux du bas montrent la coloration au ponceau des protéines de fusion correspondantes.

2.3.3. L'ubiquitylation de l'Endophiline A1 par le mutant triple arginine

Notre laboratoire a montré que la protéine Endophiline A1 est ubiquitinée par la ligase ITCH après surexpression des deux protéines dans une lignée cellulaire (4, 36). J'ai donc vérifié la capacité du mutant triple arginine à catalyser l'ubiquitylation d'Endophiline. Les résultats dans les figures précédentes montrent que le mutant ITCH R_{252,255,258E} est incapable de lier le SH3 d'Endophiline A1 (Figure 14) de façon efficace et possède une capacité limitée à lier le SH3 d'Endophiline A2 (Figure 13). Une première approche fut d'utiliser des billes Nickel pour récupérer la 6HIS-ubiquitine fusionnée aux protéines ubiquitylées à partir de cellules HEK293T qui surexpriment 6HIS-ubiquitine en combinaison avec ITCH WT, CA ou R_{252,255,258E}. Dans la Figure 16, nous remarquons que seule la forme sauvage d'ITCH était capable d'ubiquityler Endophiline A1. La présence d'Endophiline dans la fraction des protéines liées aux billes a été révélée par l'anticorps anti-GFP. GFP-Endophiline n'était pas récupérée à partir des lysats cellulaires où la forme non catalytique ou mutante en arginines était surexprimée.

Dans une deuxième approche, l'ubiquitylation d'Endophiline A1 était révélée par immunoprécipitation de GFP-Endophiline suivie par un immunoblot à l'aide de l'anticorps anti-Myc pour détecter Myc-ubiquitine liée à Endophiline. Avec cette approche, une quantité significative d'Endophiline ubiquitylée est détectable en présence du mutant triple arginine, bien qu'inférieure à celle obtenue avec la forme sauvage d'ITCH. Au contraire, le contrôle négatif non catalytique d'ITCH ne donne aucun signal GFP-Endophiline-ubiquitine (Figure 17).

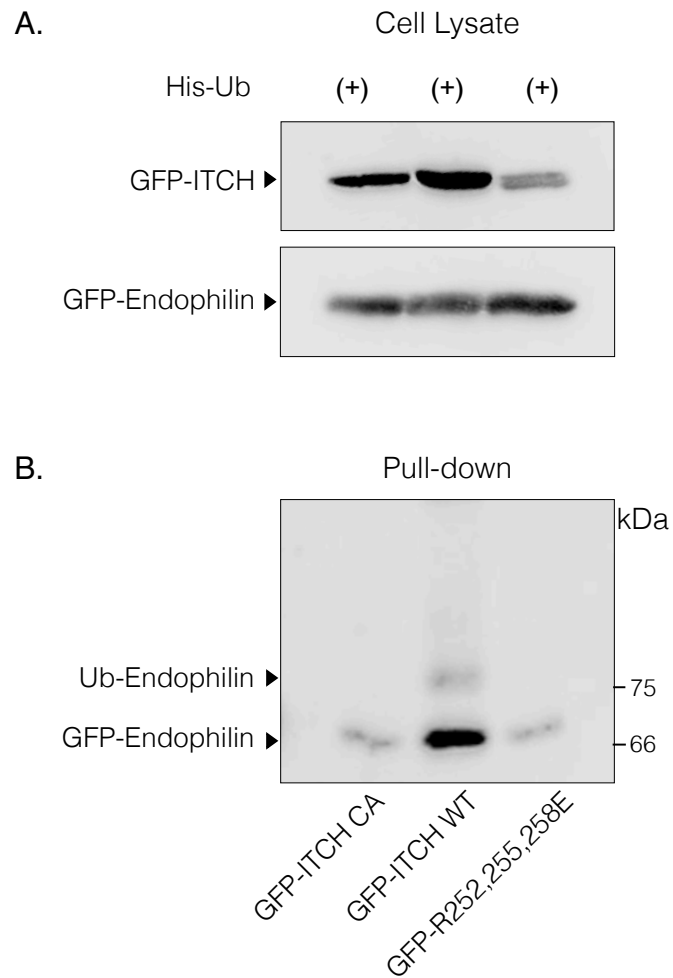


Figure 16. Pull-down aux billes Ni-NTA pour déterminer l'ubiquitylation d'Endophiline A1 par le mutant ITCH triple arginine.

Des cellules HEK293T surexprimées avec HIS-myc-Ubiquitine, GFP-Endophiline A1 et GFP-ITCH WT ou CA ou R_{252,255,258}E. A) L'immunoblot anti-GFP détecte les niveaux d'ITCH et Endophiline A1 surexprimés (panneau du haut et du milieu). B) L'anticorps contre le GFP détecte le niveau d'Endophiline-ubiquitine récupéré par les billes Nickel (affinité au tag HIS). L'addition d'ubiquitine à Endophiline est visible en cas de surexpression de ITCH WT seulement.

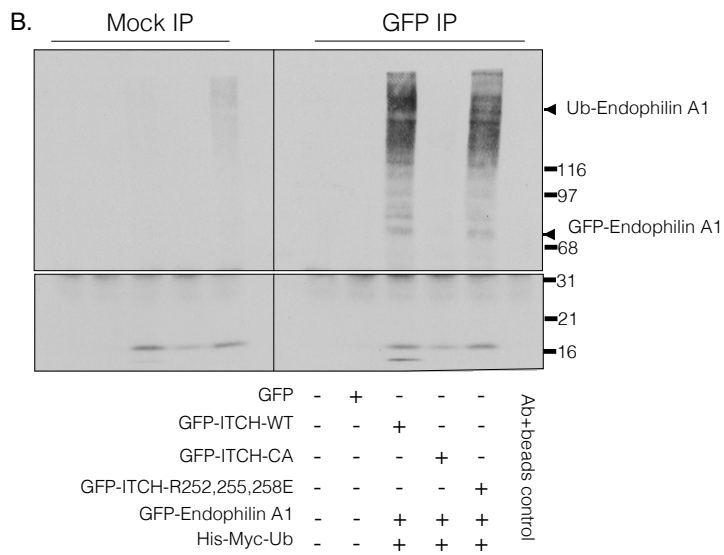
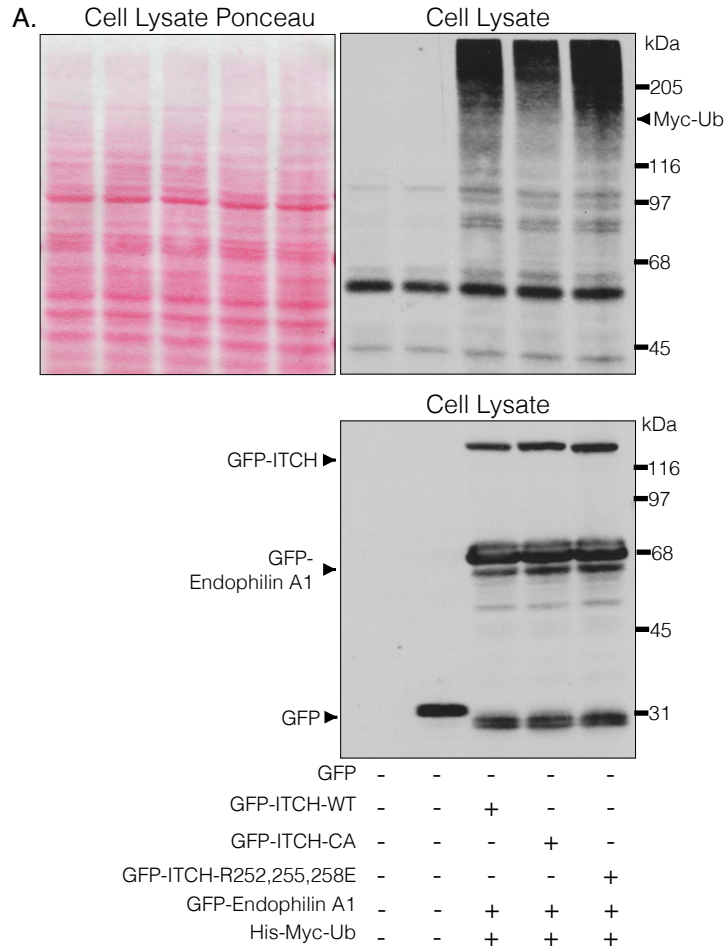


Figure 17. Immunoprécipitation d'Endophiline A1 en présence d'ubiquitine surexprimée pour déterminer l'ubiquitylation d'Endophiline A1 par le mutant ITCH triple arginine.

Des cellules HEK293T surexprimées avec HIS-Myc-Ubiquitine, GFP-Endophiline A1 et GFP- ITCH WT ou CA ou R_{252,255,258}E. A) Un Immunoblot anti-GFP pour détecter les niveaux de Myc-ubiquitine (panneau du haut) ITCH et Endophiline A1 surexprimés (panneau du bas). B) La partie Mock IP du panneau montre les contrôles négatifs où les lysats ont été incubés avec les billes seules sans anticorps. Dans la partie GFP IP, l'anti-Myc détecte le niveau de GFP-Endophiline ubiquitylée. Une ubiquitylation d'Endophiline A1 est visible en présence de ITCH WT et R_{252,255,258}E.

2.4. Discussion

Les domaines d'interaction des protéines participent à et régulent presque toutes les fonctions cellulaires essentielles, y compris la croissance cellulaire, la différenciation, la motilité, la polarité et l'apoptose. Les interactions SH3-PRR dirigent une grande partie des complexes protéiques formés lors de l'endocytose et la signalisation cellulaire. L'établissement des principes qui régissent la reconnaissance de ces domaines est souvent essentiel à la compréhension de leurs diverses fonctions dans la cellule. La reconnaissance de la région riche en prolines par les domaines SH3 représente un profil d'interaction typique où le consensus polyproline de classe I ou II occupe les trois poches hydrophobes du SH3 (124). Par exemple, la protéine endocytyque Dynamine est responsable de la fission de la vésicule de Clathrine et cette fonction est dépendante de son recrutement par des domaines SH3. En fait, deux motifs de classe II dans sa PRR C-terminale sont essentiels pour son recrutement par Amphiphysine (125) mais l'Endophiline et la Syndapine (Pacsin) lient une région étendue N-terminale d'orientation non spécifique dans la Dynamine (118). Cet exemple montre l'importance de la spécificité de ces interactions pour localiser une protéine au bon endroit, au bon moment.

Le sujet de cette thèse, la protéine ITCH contient une région riche en prolines qui lie différentes protéines à domaine SH3. La sélectivité de cette interaction est une question importante, car si nous comprenons les règles régissant la spécificité, nous serons en mesure de développer des

moyens pour inhiber des interactions spécifiques *in vivo*. La région riche en prolines dans la ligase ITCH est une séquence de 20 acides aminés qui contient quatre motifs de liaison aux domaines SH3 ; trois de la classe II et un de la classe I. Dans un effort pour comprendre comment ITCH lie les domaines SH3, Desrochers et al avaient testé plusieurs protéines cibles pour leur capacité à lier différents peptides de la région riche en prolines d'ITCH, ainsi que différents mutants en arginine de la région. Un certain degré de spécificité de ces interactions SH3-PRR était souligné dans cette étude, certaines protéines liant des groupes peptidiques différents dans la PRR d'ITCH. En faisant des essais pull-down à partir de lysats de cerveau de rat avec des protéines de fusion entre la GST et des variations de séquences de la PRR de ITCH, les PRR mutants R₂₅₂E, R₂₅₅E et R_{265,266}E liaient moins l'Endophiline. La PRR triple mutante R_{252,255,258}E perd complètement son affinité pour l'Endophiline A1, Amphiphysine II, Pacsin et β -Pix (1).

En connaissant que ces résidus participent à cette interaction, les mutations ont été reproduites dans la protéine ITCH complète dans la présente étude. Les résultats montrés dans ce chapitre confirment la séquence peptidique contenant les arginines 252, 255 et 258 comme cruciale pour la liaison des domaines SH3 d'Endophiline A1 et A2, β -Pix, Amphiphysine II et Pacsin avec la région riche en prolines de la ligase de l'ubiquitine ITCH. Ces résultats montrent aussi que les mutants ITCH R₂₅₂E, R₂₅₅E et R_{265,266}E liaient moins les SH3 d'Endophiline A1, A2 et β -Pix. Étant le seul mutant à ne pas lier Endophiline et l'ensemble des autres SH3 testés, ITCH R_{252,255,258}E sera utilisé dans l'étude rapportée au chapitre 3.

Les essais d'ubiquitylation d'Endophiline A1 par un mutant ITCH où la région PRR a été supprimée n'a montré précédemment qu'un niveau d'ubiquitylation résiduel comparé à ITCH WT (4). Cette ubiquitylation résiduelle avait été attribuée à la présence d'ITCH endogène dans la cellule. Les résultats obtenus ici avec le mutant triple arginine vont aussi dans ce sens. Selon la méthode utilisée, l'ubiquitylation d'Endophiline en présence du mutant a soit été abolie, soit légèrement diminuée. Cette différence peut certainement être attribuée à la sensibilité de la méthode. Beaucoup moins d'Endophiline ubiquitylée étant vraisemblablement récupérée par le pull-down de 6HIS-ubiquitine que par l'immunoprécipitation directe de GFP-Endophiline. Il reste

difficile de déterminer si l'ubiquitylation résiduelle d'Endophiline en présence du mutant est attribuable à l'interaction résiduelle du mutant surexprimé ou à la protéine ITCH endogène présente dans les cellules.

3. Rôle d'ITCH dans l'endocytose dépendante de la Clathrine du récepteur du facteur de croissance épidermique

3.1. Introduction

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle qui régule l'internalisation, le trafic et la dégradation des récepteurs. L'ubiquitylation des acteurs de l'internalisation de l'EGFR par la ligase de l'ubiquitine ITCH et ses conséquences sont le sujet d'étude dans ce chapitre. En général, l'élimination d'une protéine d'un système cellulaire permet de révéler la fonction accomplie par cette protéine au niveau du mécanisme étudié. Pour étudier la fonction d'ITCH, nous avons éliminé l'expression de la ligase ITCH dans les cellules HeLa et Cos7 et observé les conséquences sur le déroulement de l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR. Pour déterminer le rôle d'ITCH dans le processus, nous avons aussi effectué des expériences de sauvetage du phénotype observé. Finalement, nous avons examiné l'influence du knockout d'ITCH sur la dégradation et la signalisation du récepteur activé.

3.1.1. La technique CRISPR/Cas9

L'expression du gène *ITCH* fut arrêté dans les lignées HeLa et Cos7 à l'aide de la méthode CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated*). Cas9 est une endonucléase à domaine catalytique capable d'induire des cassures double brin ciblées de l'ADN (DSB; *DNA double-stranded breaks*) à des locus génomiques spécifiques. Cette nucléase est guidée par de petits ARN conçus spécifiquement pour s'apparier par complémentarité avec l'ADN cible. Cette séquence ARN guide de 20 nucléotides détermine la spécificité de la nucléase. Elle doit immédiatement précéder un motif PAM (*protospacer adjacent motif*) 5'-NGG pour médier le clivage Cas9 à ~3 pb en amont du PAM (3 pb 5' du PAM). La séquence PAM est nécessaire pour suivre immédiatement le locus d'ADN cible mais elle ne fait pas partie de la séquence guide formée de 20 nucléotides. Deux exemples d'ARN guides suivis de PAM sont soulignés en rouge dans la Figure 19C.

À la suite de son clivage par Cas9, le locus cible subit généralement l'une des deux principales voies de réparation des dommages à l'ADN, la NHEJ (*nonhomologous end joining*) prône à l'erreur ou la HDR (*homology-directed repair*) haute-fidélité. La HDR peut être utilisée pour obtenir un résultat d'édition spécifique, sinon la cellule répare les DSB par le processus NHEJ qui engendre des mutations d'insertion/suppression (indel; insertion/deletion). Les indel dans un exon codant peuvent entraîner un décalage de cadre de lecture ou des codons d'arrêt prématurés, ce qui rend la NHEJ très efficace pour le knockout d'un gène. La capacité de concevoir des systèmes et des organismes biologiques présente un énorme potentiel d'applications dans les domaines de la science fondamentale, de la médecine et de la biotechnologie (126).

3.1.2. Le rôle de l'ubiquitylation dans la régulation de l'EGFR et ses protéines adaptatrices

Le récepteur activé à l'étude dans ce projet, l'EGFR, lie son ligand ce qui induit sa dimérisation et son auto-phosphorylation. Certaines tyrosines phosphorylées de l'EGFR forment un site de liaison pour la ligase de l'ubiquitine, CBL. Cette ligase se lie à la queue C-terminale du récepteur soit directement à travers la phosphotyrosine 1045, soit indirectement à travers GRB2 qui lie la phosphotyrosine 1068 ou 1086 (127, 128) (Figure 18). À la suite de sa liaison, CBL est phosphorylée par le récepteur, ce qui stimule son activité ligase permettant ainsi la multi-monoubiquitylation ou la polyubiquitylation de l'EGFR et son élimination par la dégradation dans les lysosomes (6).

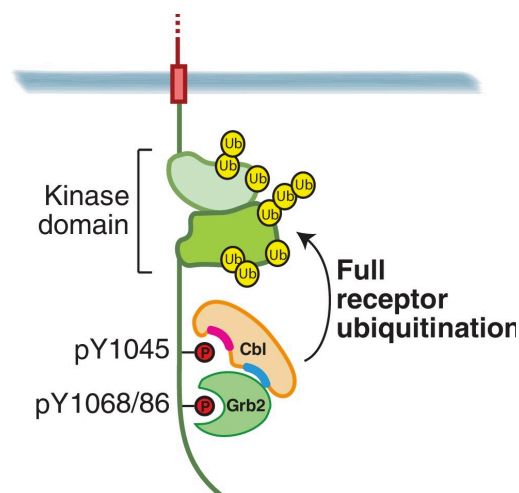


Figure 18. L'ubiquitylation de l'EGFR par la ligase de l'ubiquitine c-CBL.

Représentation schématique de l'interaction CBL-EGFR.

Figure tirée de (92).

La modification du récepteur à l'EGF par CBL est importante et des mutants de CBL sans activité ligase sont considérés comme oncogènes parce qu'ils bloquent la dégradation de l'EGFR et le redirigent vers la membrane plasmique (129). De même, des mutants de l'EGFR incapables de lier CBL ne sont pas ubiquitylés et ne se dirigent pas vers la dégradation lysosomale mais sont plutôt recyclés à la membrane plasmique (130). De plus, un knockdown de CBL réduit le taux d'internalisation du récepteur de 40-50% par rapport au contrôle, montrant ainsi que l'internalisation de l'EGFR est dépendante de la protéine CBL (131). Et l'ubiquitylation du récepteur par CBL fait partie du mécanisme essentiel par lequel l'EGFR est internalisé (132). Outre son rôle comme ligase de l'ubiquitine, CBL agit aussi comme protéine adaptatrice et recrute la protéine CIN85. CIN85, un autre substrat de la ligase ITCH, recrute AP2 et Endophiline pour diriger le récepteur vers les puits enrobés de Clathrine et faciliter son internalisation par endocytose.

Une fois ubiquitylé, l'EGFR serait reconnu par les domaines de liaison à l'ubiquitine UBD (*ubiquitin-binding domains*) ou les motifs de liaison à l'ubiquitine UIM (*ubiquitin-interacting motifs*), des protéines EPS15 et epsin qui recrutent encore d'autres protéines endocytiques ainsi que des enzymes d'ubiquitylation qui sont responsables de la modification des molécules en aval. Ainsi, plusieurs protéines impliquées dans l'internalisation des récepteurs sont modifiées par ubiquitylation (Tableau 3). Cette ubiquitylation peut influencer la régulation négative de l'EGFR en permettant des interactions supplémentaires ou en induisant la dégradation de ces protéines, modifiant la stœchiométrie du complexe. Un grand nombre d'exemples montrant l'importance de l'ubiquitylation dans le règlement fin de ce processus existent dans la littérature. Dans les neurones par exemple, une augmentation du niveau de la ligase de l'ubiquitine Parkin dans les souris mutantes en Endophiline a permis de découvrir qu'Endophiline A1 et ses partenaires moléculaires dynamine1 et synaptojanine1 sont monoubiquitylés et régulés par Parkin (133). La protéine adaptatrice EPS15 est ubiquitylée

par la ligase Parkin aussi. Cette dernière lie le motif UIM d'EPS15 à l'aide de son domaine UBL ce qui aboutit à sa monoubiquitylation. Le groupe responsable de cette découverte suggérait un modèle dans lequel cette modification d'EPS15 l'empêche de lier les résidus ubiquitylés du récepteur activé, ce qui pourrait causer un délai d'internalisation et de dégradation de l'EGFR, ainsi qu'une augmentation de la signalisation par PI3K/AKT (134). À l'opposé, certains montrent que la monoubiquitylation d'Eps15 ne déclenche pas sa libération des cargos (135). Eps15 est monoubiquitylée aussi par la ligase NEDD4, une modification dont la fonction reste inconnue (136).

Dans ce projet de recherche, nous étudions la ligase de l'ubiquitine ITCH dont l'un des substrats est la ligase CBL. D'un côté, une ubiquitylation de CBL par ITCH cause sa dégradation dans les protéasomes, un évènement considéré comme une régulation négative de la dégradation de l'EGFR (5). De même, ITCH dirige les protéines SNX9 et Endophiline vers une dégradation protéasomale après surexpression des protéines dans une lignée cellulaire (36, 137). Étant impliquées dans l'internalisation et la dégradation du récepteur, la dégradation de ces deux protéines pourrait impliquer une régulation négative de l'internalisation du récepteur (7, 138). Par ailleurs, Intersectine1 est un autre substrat monoubiquitylé de la ligase ITCH, ce qui n'entraîne pas sa dégradation mais affecte plutôt les liaisons intermoléculaires de ce substrat et favorise l'internalisation du récepteur (139).

Si les protéines CBL et Endophiline sont des substrats dégradés suite à l'ubiquitylation par la ligase de l'ubiquitine ITCH, quels seront leurs niveaux endogènes dans une lignée ITCH^{-/-} ? De plus, si ITCH est un partenaire moléculaire de plusieurs protéines à fonction endocytaire (CBL, SNX9, Endophiline, Intersectine, Amphiphysine), comment le processus d'internalisation de l'EGFR sera-t-il affecté par un knockout d'ITCH ? Nous avons aussi examiné comment un mutant ITCH incapable de lier les protéines SH3 agit dans ce processus et si une modification du régulateur CBL altère la dégradation de l'EGFR.

Tableau 3. Les protéines à fonction endocytique modifiées par l'ubiquitylation.

Protein	Function	Ubiquitylation	Ubiquitin ligase	ITCH binding partner?
EPS15	AP2 clustering and scaffolding proteins	Monoubiquitination	Parkin/NEDD4 (134, 140)	No
Epsin	ENTH domain-containing membrane-bending protein that is a cargo-specific adaptor for monoubiquitylated receptors	Monoubiquitination	Unknown (141)	No
Intersectin	AP2 clustering and scaffolding proteins	Isoform ITSN1-s is monoubiquitinated	ITCH (139)	Yes
SNX9	BAR domain-containing protein that binds AP2 and dynamin	Degradative Ubiquitination	ITCH (137)	Yes
Dynamin	Self-polymerizing mechanoenzyme that triggers vesicle scission upon GTP hydrolysis	Monoubiquitination	Parkin (133)	No
Synaptojanin	Lipid phosphatase recruited to clathrin-coated pits by AP2 and endophilin	Monoubiquitination	Parkin (133)	No
Endophilin	N-BAR domain-containing protein that bends the membrane and recruits dynamin and synaptojanin	Monoubiquitination	Parkin/ ITCH (4, 133)	Yes
HSC70	ATPase triggering uncoating of clathrin cages	Degradative Polyubiquitination	CHIP (142)	No

modifié de (52)

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Knockout par CRISPR/Cas9

Les ARN guides (ARNg) utilisés furent conçus à l'aide de l'outil Benchling (RRID:SCR_013955) (*benchling.com*) et clonés dans le vecteur pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (126). Les deux ARNg GTGAAAATAGGAGAGTCAGT et TGAGAGCTGGAATACAAACC bordent l'exon7 du gène *ITCH* dans la lignée HeLa ce qui créera une brèche de 100 nucléotides dans l'ADN après coupure par Cas9. Les cellules HeLa furent transfectées simultanément avec les deux ADN plasmidiques exprimant chacun un ARNg. Dans les cellules Cos7, un seul ARNg CGGGTGTTCACGGGACTCC fut utilisé pour cibler l'exon1 du gène *Itch* du singe. La sensibilité de chaque type cellulaire à l'antibiotique de sélection fut vérifiée à l'aide d'une courbe de destruction. 48h après la transfection, les cellules transfectées furent traitées à la puromycine pour une durée de 72h afin de sélectionner les cellules exprimant les ARNg. Les populations cellulaires montrant une diminution de l'expression de la protéine furent sujet à une dilution unicellulaire jusqu'à l'obtention d'une population homogène de cellules *ITCH*^{-/-}. Des amorces spécifiques (Tableau 4) entourant la séquence cible furent conçues pour amplifier l'ADN cellulaire. Le criblage par PCR à l'aide de la polymérase *Q5 High-Fidelity* fut possible dans les cellules HeLa à cause de la délétion d'ADN détectable sur gel d'agarose. La délétion fut ensuite confirmée par séquençage SANGER (génomique Québec) suivie par une confirmation de l'absence de la protéine par Western-Blot. Pour les cellules Cos7, seulement l'absence de la protéine fut confirmé par Western-Blot.

Tableau 4. Amorces utilisées pour le séquençage génomique de la lignée *ITCH*^{-/-}.

Amorces	Séquences des amorces	Tm
hltch-ex7 FWD	ACCCAGAGTGAGCACAAATGGA	57.9°C
hltch-ex7 REV	ACTGCCTCAGTAACGTCACCTT	57.7°C

3.2.2. Caractérisation des lignées knockout

Les cellules WT et ITCH^{-/-} furent lysées à l'aide du tampon A (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, inhibiteurs des protéases). Les lysats furent agités pour 20min en présence de TritonX-100 (1% concentration finale) puis centrifugés à 15000rpm à l'aide d'une microcentrifuge. Les concentrations protéiques des surnageants furent estimées par un test de Bradford. Les échantillons à une concentration finale de 100 µg furent additionnés de LSB (*loading SDS sample buffer* ; 3% SDS, 1% beta-mercaptoéthanol, 115mM sucrose, 65mM tris-HCL pH6.8 et 0.1% colorant bleu de bromophénol) et migrés sur gel SDS-PAGE pour Western-Blot.

3.2.3. Immunofluorescence de l'EGFR à la membrane

Les cellules sur lamelles furent fixées avec de la paraformaldéhyde 2% pour 20min (sans perméabilisation) et mises en contact avec un anticorps primaire anti-EGFR (Tableau 5) qui reconnaît le domaine extracellulaire du récepteur toute la nuit à 4°C suivi par l'anticorps secondaire correspondant pour 1h à température pièce.

3.2.4. Essai d'endocytose

Les cellules en culture sur lamelles furent incubées avec du milieu DMEM sans sérum à 37°C pour 2h. Les cellules furent ensuite incubées à froid pour 1h avec du DMEM sans sérum avec différentes concentrations d'EGF-Alexa Fluor 647.

Dans l'expérience d'endocytose de la transferrine, 100ng/ml de la transferrine fluorescente fut utilisée. Le milieu fut ensuite remplacé par du DMEM sans sérum à 37°C et les cellules incubées pour le temps indiqué pour permettre l'endocytose. Les cellules furent lavées à l'aide d'une solution acide (0.2M acetic acid/0.4M NaCl) pour éliminer le signal extracellulaire résiduel, fixées à l'aide de paraformaldéhyde 2% et les noyaux marqués à l'aide du DAPI (0.05 µg/ml). Les lamelles furent montées dans du milieu Dako (Agilent) pour la prise d'images.

Pour les expériences de sauvetage, les cellules cultivées sur lamelles furent transfectées avec la construction indiquée à l'aide du réactif jetPRIME® (Polyplus transfection). 24h après la

transfection, les cellules subissent le test d'endocytose décrit en utilisant 2ng/ml d'EGF-Alexa Fluor 647.

Pour l'expérience de mosaïque cellulaire, les cellules de la lignée WT et KO furent transfectées avec GFP et RFP, respectivement. 24h après la transfection, les cellules furent trypsinisées et mélangées dans un ratio 1 :1 avant de les laisser adhérer sur lamelles pendant 24h. Les cellules subissent ensuite le test d'endocytose décrit en utilisant 2ng/ml d'EGF.

3.2.5. Imagerie confocale et quantification

Un microscope confocal Leica SP8 fut utilisé pour capturer les images à l'aide de l'objectif 63x. Le logiciel correspondant LasX fut utilisé pour capturer les images. ImageJ (imagej.nih.gov) fut utilisé pour quantifier la fluorescence. Les analyses statistiques furent effectuées à l'aide du logiciel R (*R core team, 2016*) par le test *t* de *student* ou par ANOVA suivi du test *Bonferroni*.

3.2.6. Essai de dégradation de l'EGFR

Les cellules privées de sérum pour 2h furent ensuite stimulées avec 2ng/ml d'EGF recombinant pour 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240min en plus de cellules, non privées de sérum (ctrl) et privées de sérum mais non stimulées (0min). Les cellules furent traitées par 100 µg/ml de cycloheximide 1h avant et durant la stimulation pour arrêter toute nouvelle synthèse protéique. Les cellules furent lysées à l'aide du tampon A (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, inhibiteurs des protéases). Les lysats furent agités 20min en présence de TritonX-100 à une concentration finale de 1% puis centrifugés à 15000rpm. Les concentrations protéiques des surnageants furent estimées par un test de Bradford. 100 µg d'extraits protéiques totaux additionnés de LSB1x ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis révélés Western-Blot à l'aide des anticorps indiqués (Tableau 5).

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés.

Protéine	Numéro de Catalogue	Compagnie	Concentration utilisée
ITCH	611198	BD Biosciences	1:1000
Endophiline A2	H00006455-A02	Abnova	1:2000
c-CBL	27475	Cell Signaling	1:1000
β -Actin	MAB1501	Millipore	1:15000
GAPDH	TA802519	Origene	1:25000
EGFR total (D38B1)	4267	Cell Signaling	1:1000
EGFR extracellulaire	ab30	Abcam	1:500 (IF)
pY1068 EGFR	3777	Cell Signaling	1:1000
pY1148 EGFR	2237	Cell Signaling	1:1000
pERK1/2	9106	Cell Signaling	1:1000

3.3. Résultats

3.3.1. Validation des lignées ITCH knockout

Le knockout d'ITCH fut validé par l'amplification par PCR, séquençage d'ADN et Western-blot pour les cellules HeLa. La validation a été faite par Western-blot seulement pour les cellules Cos7. Dans les HeLa, deux ARNg ciblant deux séquences différentes furent utilisés pour guider l'endonucléase Cas9 (Figure 19C). Ces deux cibles sont assez espacées pour que la délétion créée soit mesurable sur un gel d'agarose. Deux amorces encadrant les deux sites cibles furent utilisées pour amplifier la séquence d'intérêt (Tableau 4). Dans la Figure 19A, le décalage de taille entre les ADN amplifiés à partir des cellules WT et knockout est détectable. Une bande visible à la taille 366pb (paires de bases) correspond à l'ADN WT et une autre à 267pb, correspondante à l'ADN tronqué suite à la coupure par Cas9. Une fois la population homogène de cellules ITCH^{-/-} obtenue, l'ADN de ces cellules fut séquençé pour observer la modification génétique qui a eu lieu (Figure 19C). En comparant notre résultat avec la séquence d'origine,

nous avons remarqué la perte d'une portion de l'ADN par rapport à la séquence d'ITCH disponible dans la base de données. Cette séquence éliminée des cellules ITCH^{-/-} est bien entre les deux sites cibles de coupure à exactement 3 nucléotides de la séquence PAM (*protospacer adjacent motif*) (Figure 19C). Le niveau d'expression de la protéine fut ensuite détecté par un Immunoblot à l'aide d'anti-ITCH. La Figure 19B montre la disparition de la bande correspondant à ITCH dans les deux lysats cellulaires ITCH^{-/-} HeLa et Cos7.

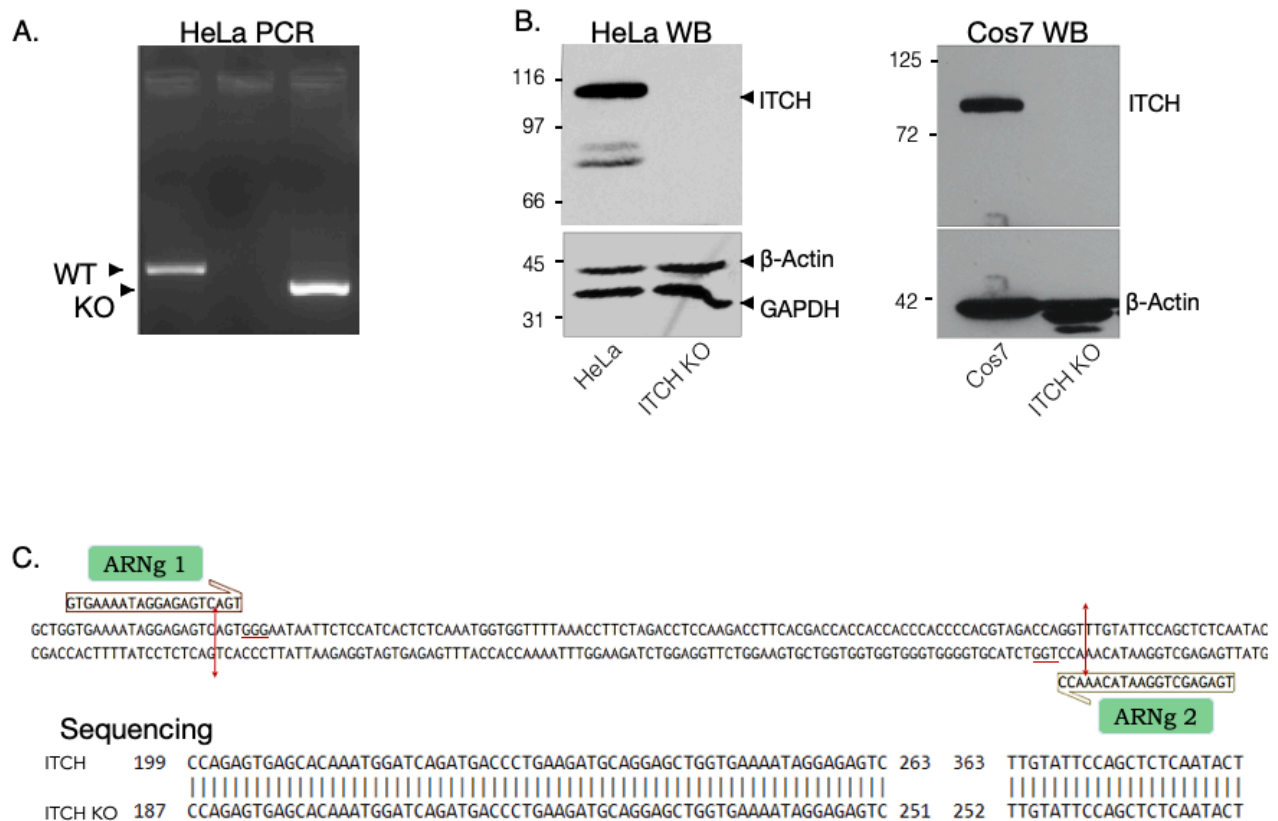


Figure 19. Production de la lignée ITCH^{-/-} par CRISPR/Cas9.

A) Gel d'agarose montrant le résultat d'amplification par PCR de l'ADN génomique extrait à partir des cellules HeLa et ITCH^{-/-}. La différence de 100 pb entre WT et ITCH^{-/-} est le résultat de deux coupures de l'ADN génomique WT ciblés par deux ARNg différents. Les séquences des ARNg sont montrées en C. B) Gel SDS-PAGE montrant la protéine ITCH et les contrôles d'équivalence des niveaux protéiques totaux, β -Actin et GAPDH. Les Immunoblots de gauche correspondent aux cellules HeLa et ceux de droite aux

Cos7. C) La partie du haut est une représentation de la séquence génomique de la région de l'exon7 du gène *ITCH* avec un marquage des séquences cibles des ARNg. La partie du bas est l'alignement de la séquence des cellules HeLa traitées avec CRISPR/Cas9 (*Query*) et de la séquence du gène *ITCH* (*subject*). L'alignement montre la perte des nucléotides 264-362 dans la lignée traitée (*ITCH*^{-/-}). Les sites de coupure correspondants sont marqués dans la partie du haut par les flèches rouges et les sites PAM sont soulignés en rouge. Une endonucléase Cas9 coupe l'ADN à 3-4 nucléotides d'une séquence PAM (NGG).

3.3.2. Niveaux endogènes d'EGFR et des substrats d'ITCH dans les cellules *ITCH*^{-/-}

Puisqu'en contexte de surexpression *ITCH* provoque la dégradation d'Endophiline et de c-CBL, les niveaux basaux de ces substrats furent examinés dans les lignées *ITCH*^{-/-} par Western-Blot en comparaison avec la lignée parentale. Les résultats ne montrent aucun changement visible des niveaux endogènes de ces protéines (Figure 20).

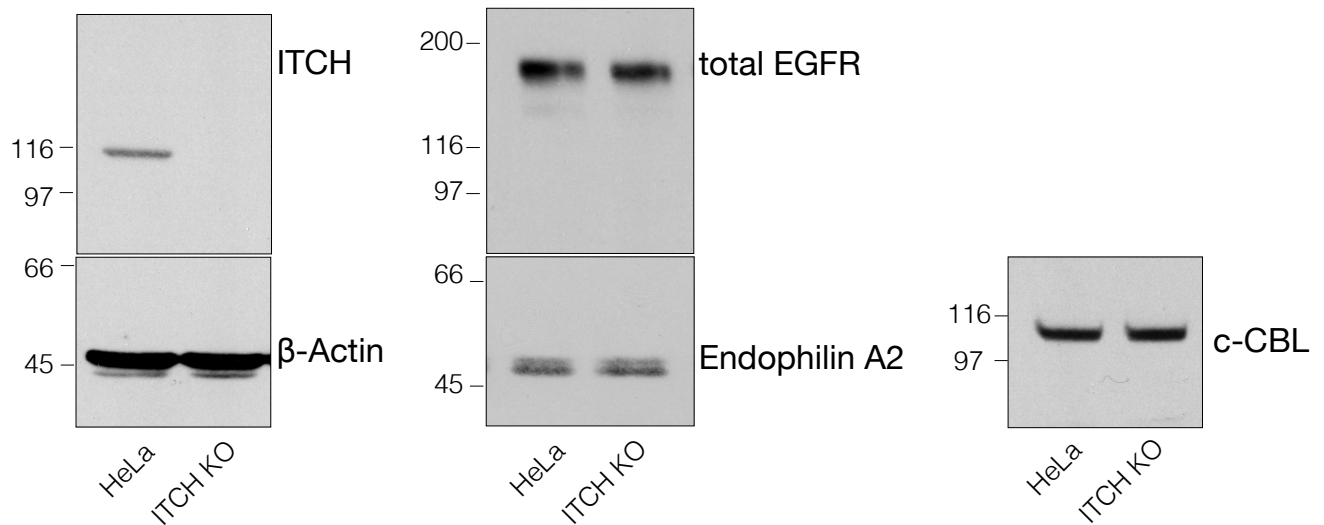


Figure 20. Les niveaux endogènes de l'EGFR et de quelques substrats d'ITCH.

Immunoblots pour les protéines indiquées à partir de lysats cellulaires totaux de la lignée HeLa parentale contre la lignée HeLa knockout pour *ITCH*. L'Immunoblot *ITCH* montre que la protéine n'est

plus exprimée par les cellules knockout. Les autres Immunoblots montrent des niveaux inchangés des protéines EGFR, Endophiline A2 et c-CBL.

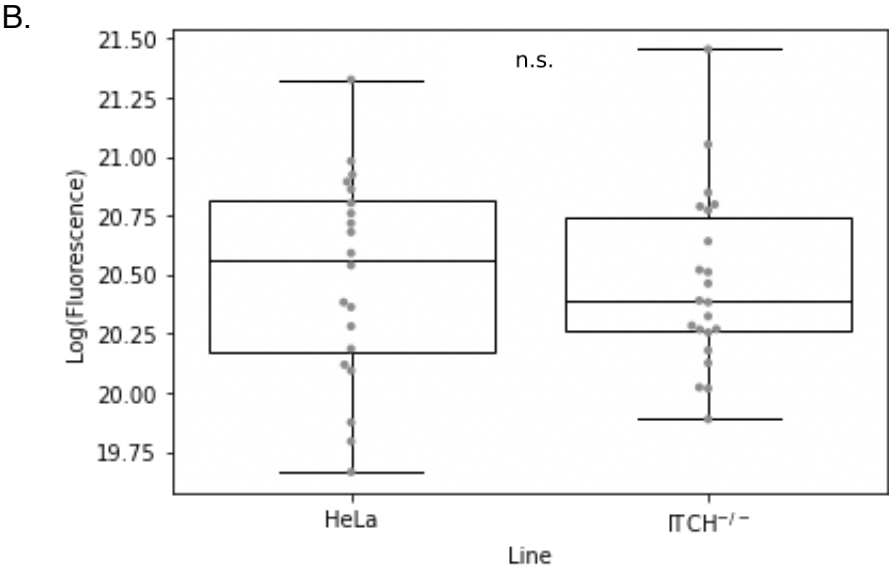
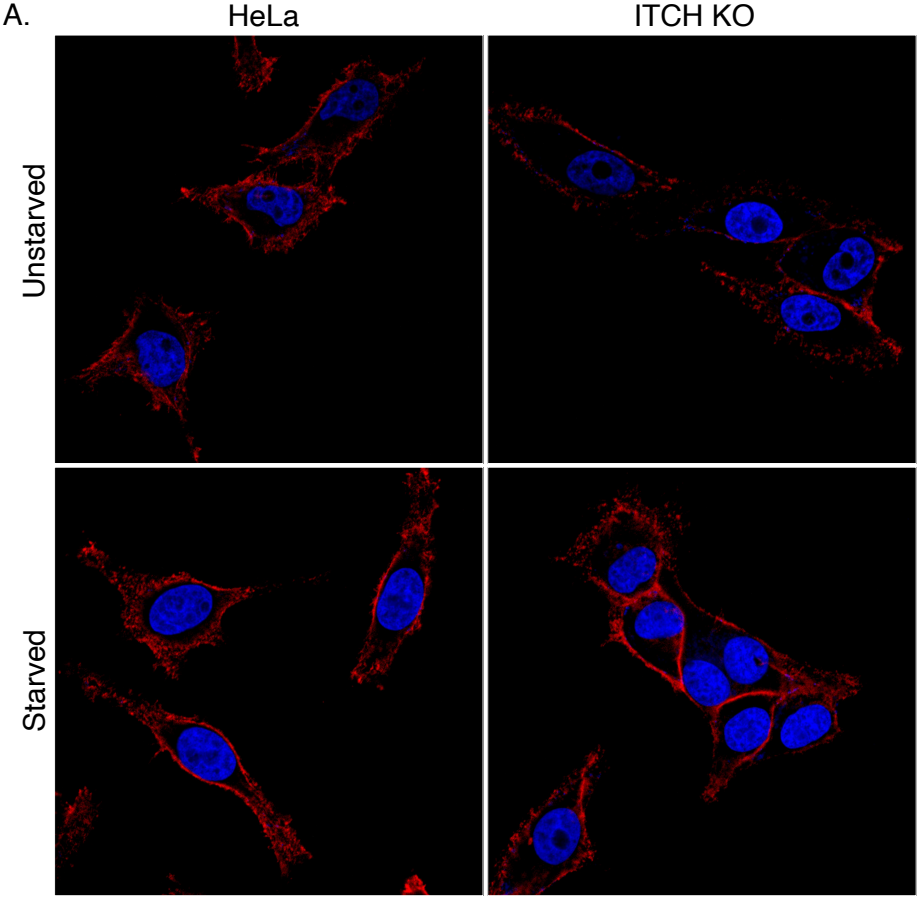


Figure 21. Immunofluorescence pour comparer le niveau de base de la protéine EGFR dans les lignées HeLa parentale et ITCH^{-/-}.

A) Immunofluorescence en utilisant un anticorps primaire contre le domaine extracellulaire de l'EGFR suivi par un anticorps secondaire conjugué au fluor568. Le signal rouge représente le niveau basal de l'EGFR extracellulaire dans les deux lignées cellulaires. Le signal bleu représente le marquage du noyau au DAPI. B) Quantification correspondante aux cellules non privées de sérum (*unstarved*). Le niveau EGFR extracellulaire ne change pas entre les deux lignées. Test t comparant la fluorescence moyenne des cellules marquées. n.s : non significatif. n=20.

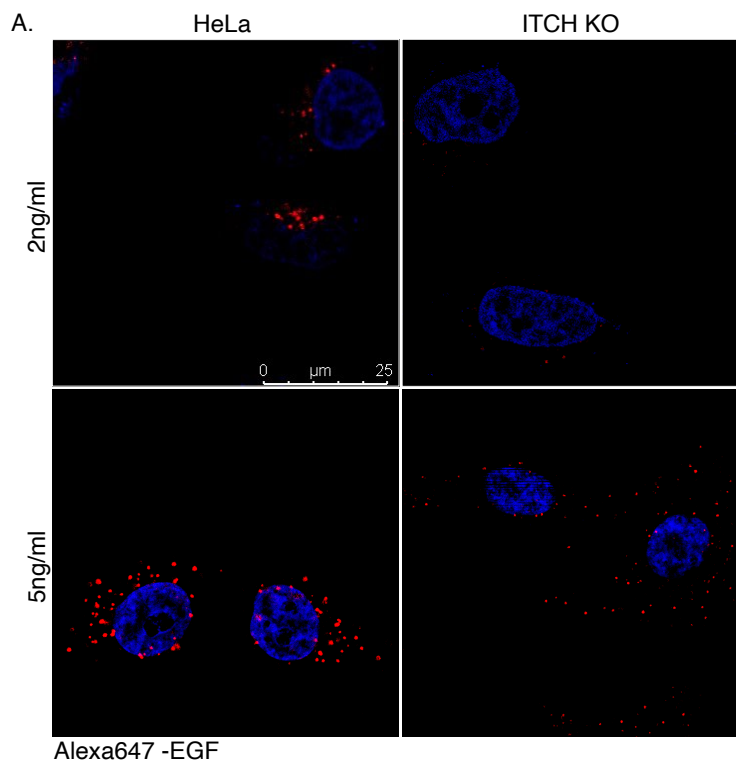
L'analyse par Western-blot montre que le niveau total d'EGFR ne change pas non plus dans les cellules ITCH^{-/-} (Figure 20). Afin de quantifier cette observation, et confirmer la présence du récepteur à la membrane plasmique, j'ai comparé la lignée ITCH^{-/-} et la lignée parentale par immunofluorescence (Figure 21). L'utilisation d'un anticorps qui reconnaît le domaine extracellulaire du récepteur nous permet d'observer que la quantité de récepteurs à l'EGF à la membrane ne change pas significativement entre les deux lignées, ni avant ni après privation du sérum. Dans la Figure 21, on peut aussi observer que la privation de sérum stimule le recrutement du récepteur à la surface membranaire de façon similaire dans les deux lignées. La privation du sérum est la première étape de l'essai d'endocytose. La fluorescence moyenne à la surface des deux groupes de cellules ne diffère pas significativement ($p=0.839$).

3.3.3. Internalisation de l'EGFR dans les lignées ITCH^{-/-}

Sorkin et al. ont démontré que l'internalisation d'EGFR induite par l'EGF via la voie dépendante de la Clathrine est saturée si trop de complexes récepteurs-EGF sont présents à la surface cellulaire. Ceci est généralement observé avec des concentrations d'EGF supérieures à 1 et 2 ng/ml lorsque l'EGF occupe plus de 10 000 à 15 000 récepteurs par cellule. Par conséquent, l'utilisation de faibles concentrations d'EGF est recommandée pour étudier l'endocytose dépendante de la Clathrine des mutants EGFR ou les effets des inhibiteurs et des modulateurs de ce processus (143).

Dans le but d'observer les conséquences de l'absence d'ITCH sur l'internalisation de l'EGFR, des essais d'endocytose furent effectués. Et puisque la concentration de l'EGF affecte la route par laquelle le complexe EGF-EGFR est internalisé, plusieurs concentrations d'EGF furent testées : 2, 5, 10 et 20 ng/ml. Vu que les cellules étaient lavées avec une solution acide avant la fixation des lamelles, seul le signal de l'EGF intracellulaire est observé dans les Figure 22 et Figure 23.

À des concentrations élevées (20, 10 et 5ng/ml), l'internalisation de l'EGF semble similaire entre les lignées parentales et les lignées ITCH^{-/-} (Figure 22 A-B et Figure 23A-B). Cependant, cette internalisation est visiblement moins abondante dans les lignées knockout à une concentration plus faible (2ng/ml) (Figure 22A et Figure 23A). Parmi les concentrations testées, la concentration 2ng/ml est celle qui montre la plus grande diminution du taux d'EGF internalisé où très peu de vésicules positives à l'EGF sont visibles chez les cellules knockout. Le test d'endocytose à 5ng/ml d'EGF révèle une certaine diminution du nombre de vésicules dans la lignée ITCH^{-/-}, mais la fluorescence totale n'est pas significativement différente des cellules WT (Figure 22C et Figure 23C). Ces observations indiquent que seule l'endocytose dépendante de la Clathrine est affectée par l'absence de la ligase ITCH dans ces cellules.



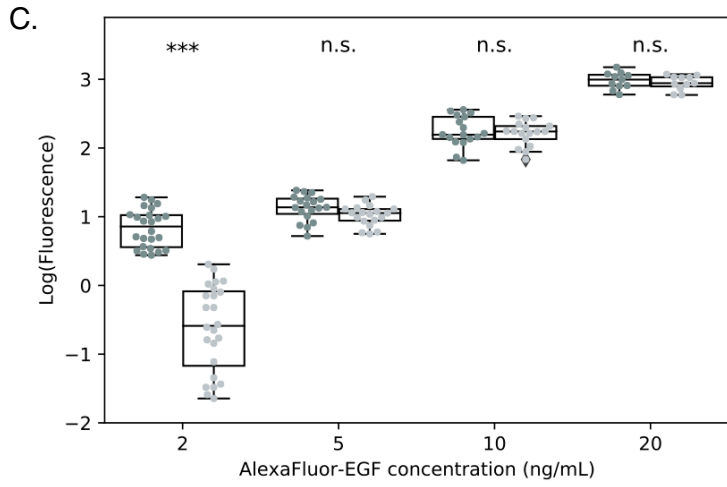
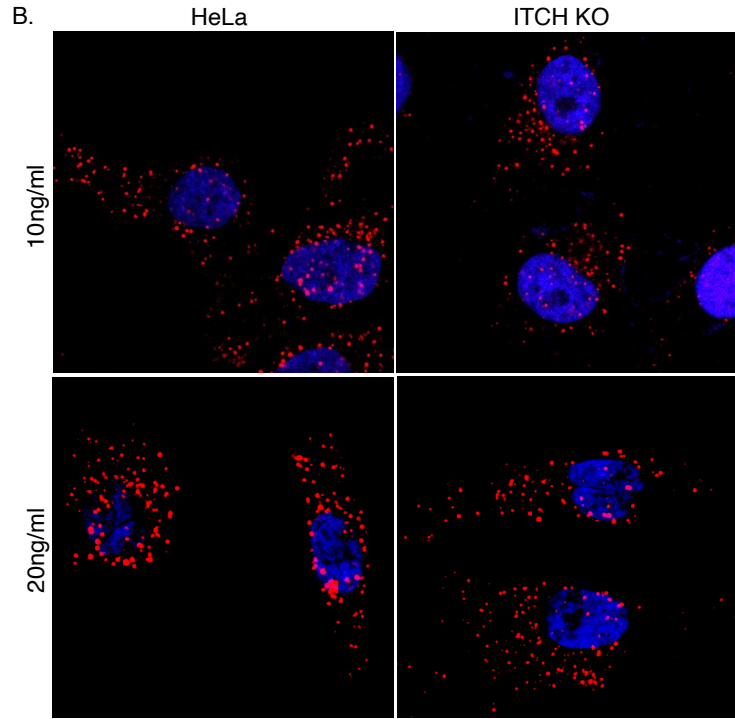
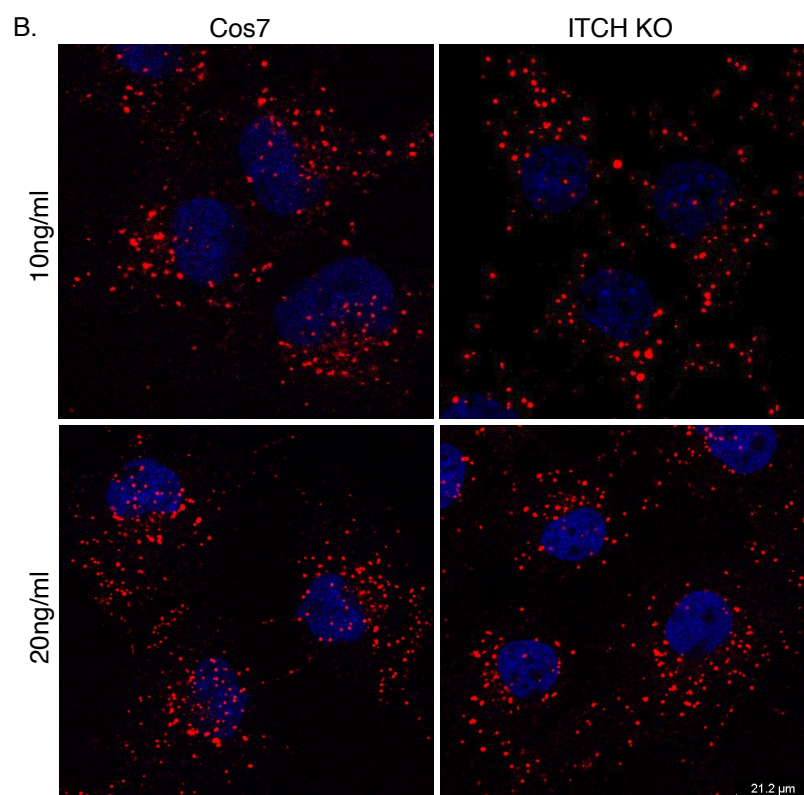
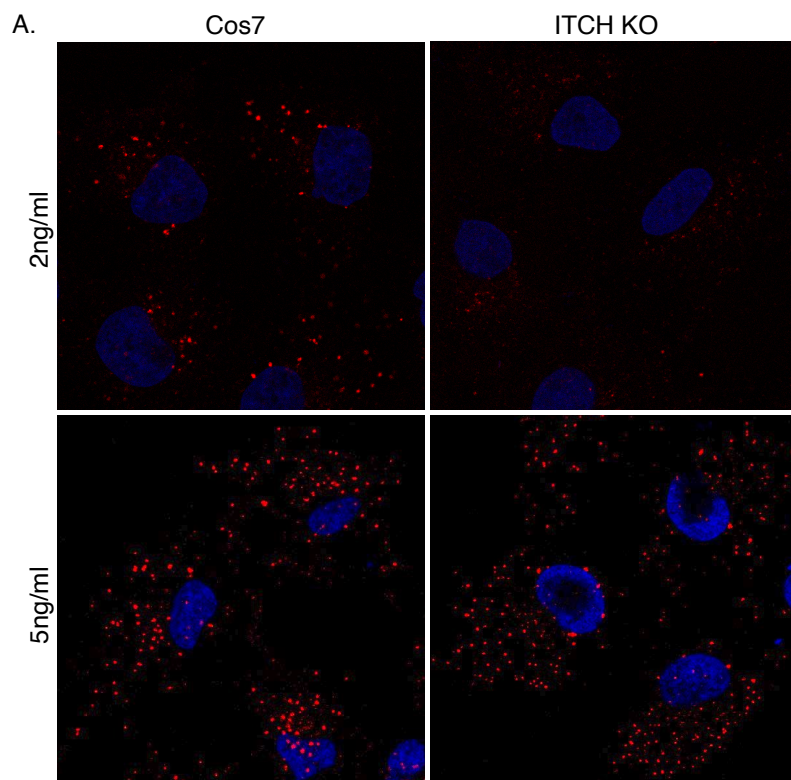


Figure 22. Essai d'endocytose de l'EGF à différentes concentrations dans les cellules HeLa.

A-B) Des cellules HeLa et ITCH^{-/-} après 20min d'internalisation de l'EGF conjuguée au AlexaFluor-647 aux concentrations indiquées. Le signal rouge représente l'EGF intracellulaire. Le signal bleu représente le marquage nucléaire au DAPI. C) Quantification. Test t comparant la fluorescence moyenne des cellules marquées. ***p<0.001, n.s : non significatif. n=50 cellules, représentatif de trois expériences.



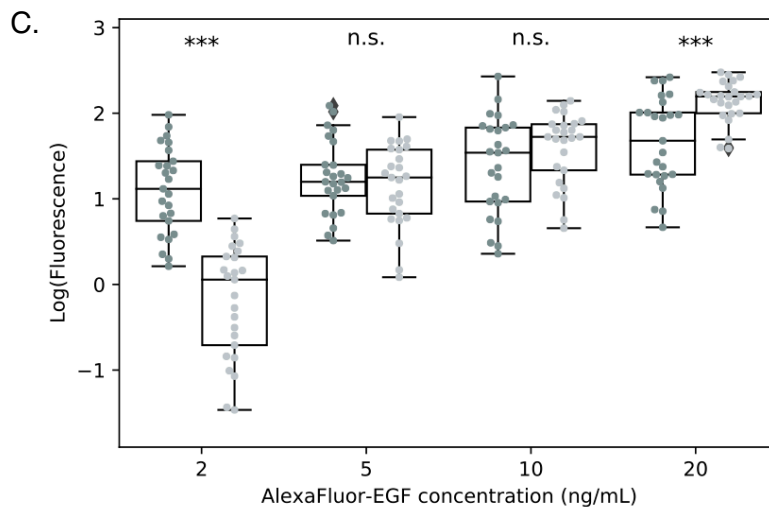


Figure 23. Essai d'endocytose de l'EGF à différentes concentrations dans les cellules Cos7.

A-B) Des cellules Cos7 et ITCH^{-/-} après 20min d'internalisation de l'EGF conjuguée au AlexaFluor-647 aux concentrations indiquées. Le signal rouge représente l'EGF intracellulaire. Le signal bleu représente le marquage nucléaire au DAPI. C) Quantification. Test t comparant la fluorescence moyenne des cellules marquées. ***p<0.001, n.s : non significatif. n=50 cellules, représentatif de trois expériences.

Afin de pouvoir comparer les cellules parentales et ITCH^{-/-} dans un même champ microscopique et éviter un possible biais de capture d'image, une expérience de « mosaïque cellulaire » fut réalisée. Pour cette expérience, les deux lignées WT et ITCH^{-/-} furent cultivées sur les mêmes lamelles après avoir été transfectées respectivement avec GFP et mCherry et avant de mener l'essai d'endocytose. Les cellules furent ensuite incubées avec 2ng/ml d'EGF fluorescent, puis fixées après 20min d'internalisation (Figure 24).

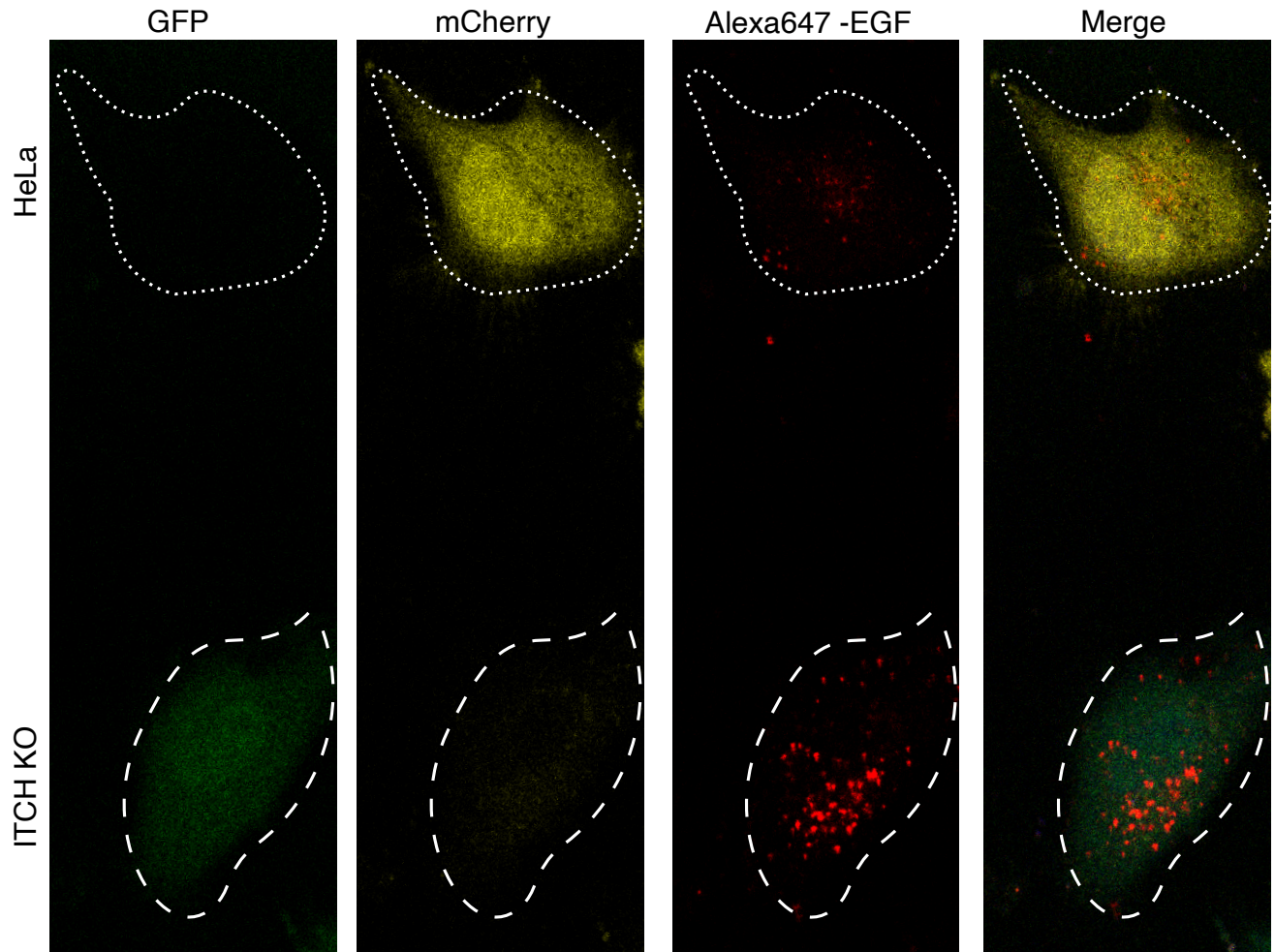


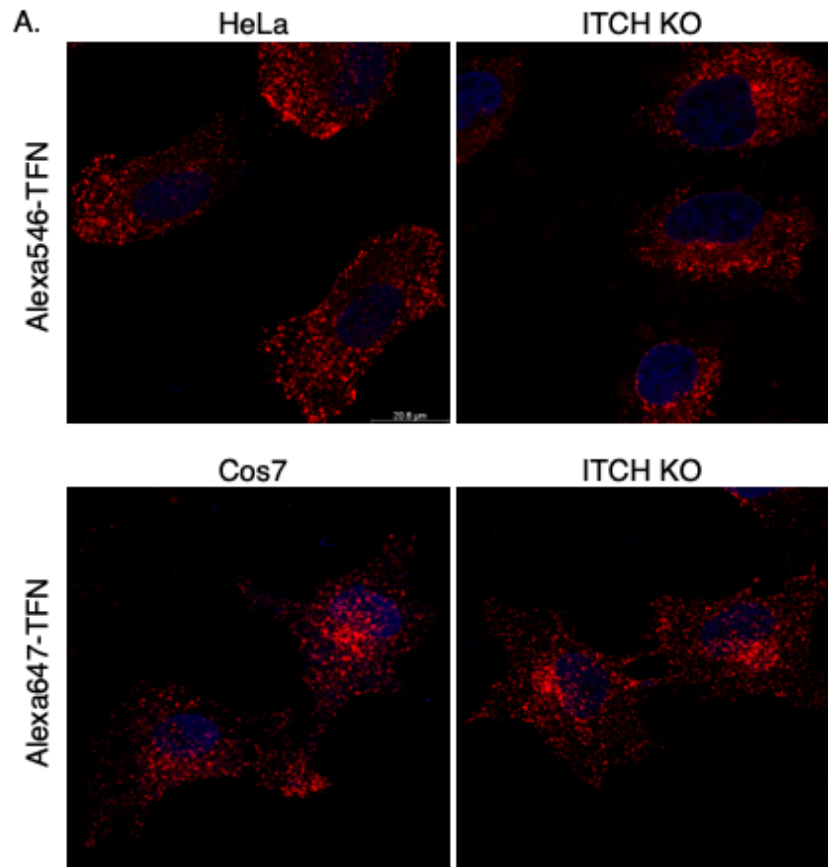
Figure 24. Essai d'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGF sur une mosaïque cellulaire entre les lignées parentale et $ITCH^{-/-}$.

La cellule HeLa surexprime GFP (en vert) et la cellule $ITCH^{-/-}$ surexprime mCherry (en jaune). Les deux cellules montrées ont été capturées dans un même champ microscopique après 20min d'endocytose d'AlexaFluor-647 EGF (en rouge). Les pointillés délimitent le pourtour des cellules HeLa (grands traits) ou $ITCH^{-/-}$ (petits traits).

3.3.4. L'effet de l'absence de la ligase ITCH sur l'endocytose de la transferrine

L'endocytose de la transferrine est un processus constitutif qui permet des cycles d'internalisation et de recyclage du récepteur à la transferrine indépendamment de son état de stimulation. Ceci permet donc de valider que la machinerie endocytique elle-même fonctionne

normalement. Pour les deux types cellulaires testés, la Figure 25 montre que la lignée ITCH^{-/-} internalise une quantité de transferrine similaire à la lignée WT. L'absence d'ITCH semble donc affecter la connexion de l'EGFR à la vésicule de Clathrine et pas nécessairement l'endocytose dépendante de la Clathrine en général.



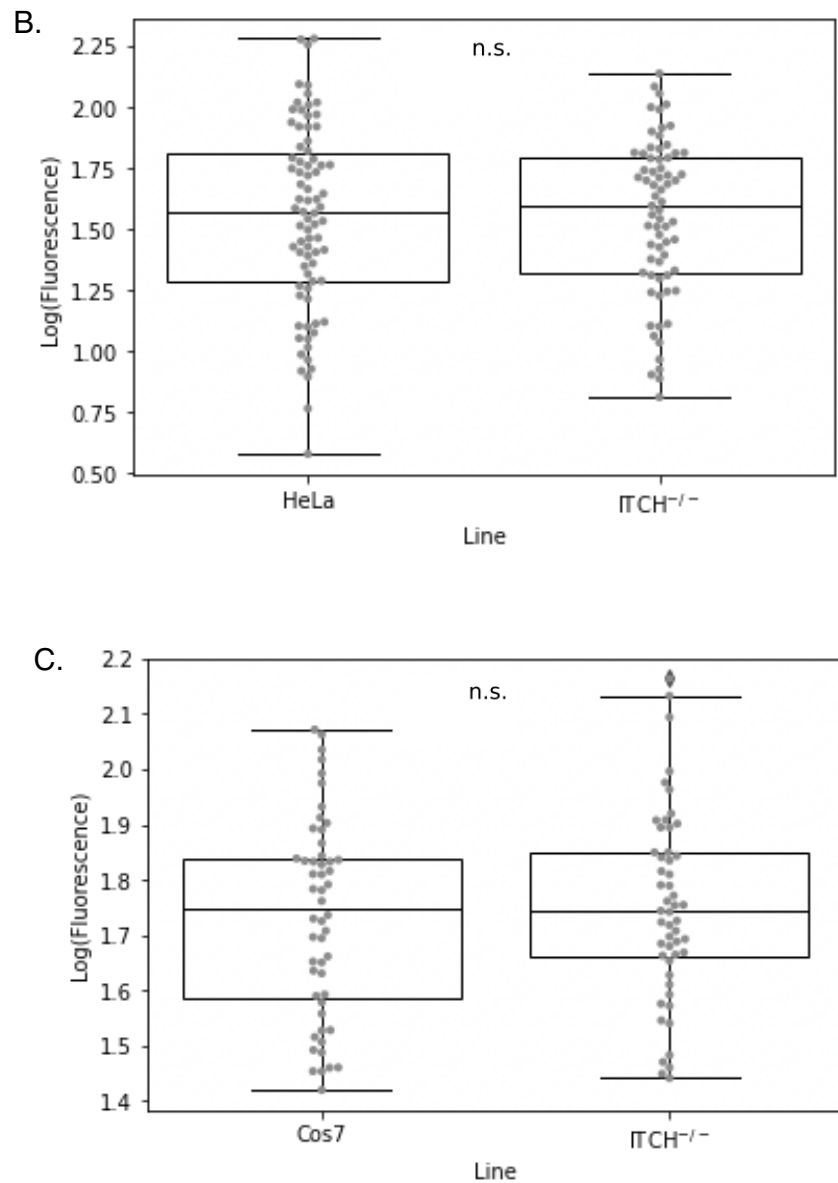


Figure 25. Essai d'endocytose de la transferrine.

A) Des cellules HeLa ou Cos7 parentales contre les cellules knockout en ITCH à 20min d'internalisation de la transferrine conjuguée au fluor546 ou 647, respectivement. Le signal rouge représente la transferrine intracellulaire. Le signal bleu représente le marquage nucléaire au DAPI. B) Quantification de la fluorescence moyenne dans les cellules HeLa WT et ITCH^{-/-}. $p=0.957$, n.s. : non significatif. $n=80$. C) Quantification de la fluorescence moyenne dans les cellules Cos7 WT et ITCH^{-/-}. $p=0.596$.

3.3.5. Les résultats de sauvetage à l'aide d'ITCH

Dans le but de comprendre le rôle qu'ITCH joue pour faciliter l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR les mutants ITCH non catalytique (ITCH CA) et triple arginine (ITCH R_{252,255,258}E) furent testés pour leur capacité à sauver le phénotype (Figure 26). Comme contrôles, les cellules parentales et knockout surexprimées avec GFP montrent une différence significative dans le niveau d'EGF à l'intérieur de la cellule comme dans la Figure 22. La surexpression de la forme sauvage d'ITCH dans les cellules ITCH^{-/-} permet la récupération d'une quantité d'EGF internalisé comparable aux cellules parentales. La Figure 26 nous montre aussi qu'à la suite d'une surexpression du mutant non catalytique dans la lignée knockout, le signal intracellulaire de l'EGF n'est pas significativement différent d'une cellule ITCH^{-/-}. Le mutant ITCH CA n'est donc pas capable de faciliter l'internalisation de l'EGFR. Ceci indique que l'activité catalytique d'ITCH en tant que ligase de l'ubiquitine est requise pour la réussite de l'internalisation de l'EGF dépendante de la Clathrine. De même, le mutant incapable de lier les protéines à domaines SH3 semble échouer à rétablir l'endocytose de l'EGFR à un taux normal. L'interaction d'ITCH avec les protéines à domaine SH3 ainsi que son activité catalytique semblent donc indispensables pour l'internalisation normale de l'EGFR à de faibles concentrations d'EGF.

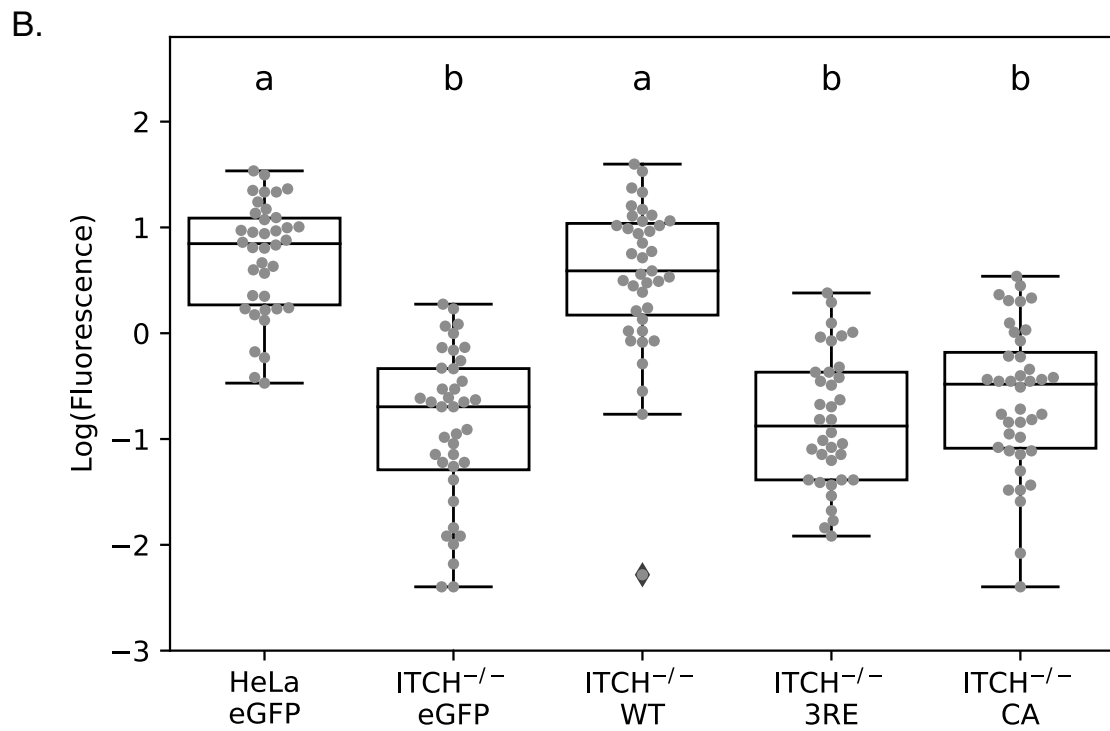
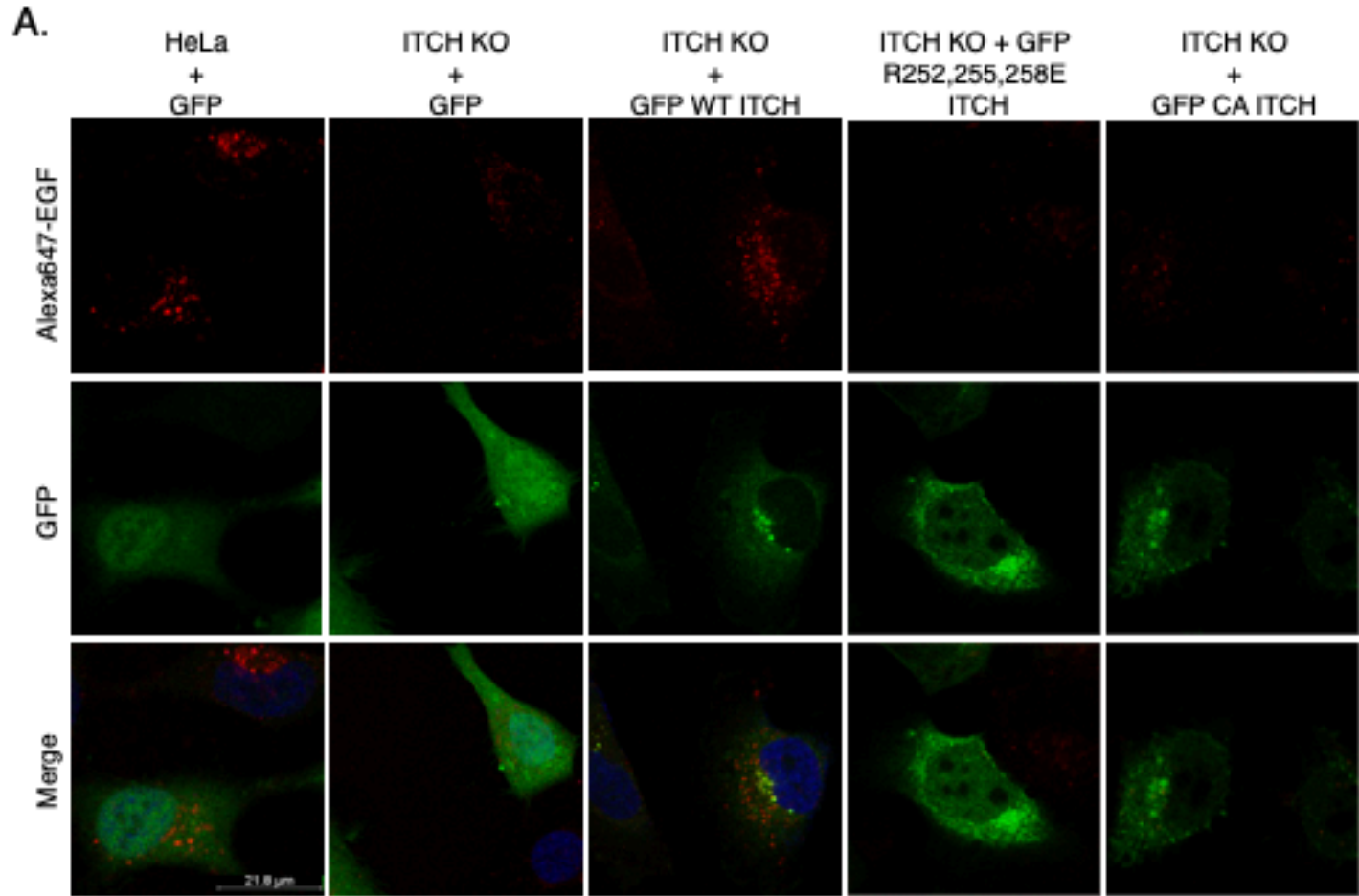


Figure 26. Sauvetage de l'internalisation de l'EGF à l'aide d'ITCH.

A) Les deux panneaux de gauche montrent des cellules HeLa parentales et ITCH^{-/-} surexprimant GFP comme contrôle. Le reste des panneaux montrent des cellules ITCH KO surexprimant les constructions ITCH indiquées. 24h post-transfection, toutes les cellules subissent un essai d'endocytose pour internaliser 2ng/ml d'EGF Alexa-Fluor647 pour 20min. B) Quantification. Les conditions marquées a et b représentent deux groupes de données significativement différentes l'une de l'autre, p<0.001 (tests ANOVA suivi d'une comparaison multiple Bonferroni). n=40 cellules par groupe, représentatif de trois expériences indépendantes.

3.3.6. Signalisation de l'EGFR

La liaison de son ligand induit la dimérisation et l'autophosphorylation des RTK. Les tyrosines phosphorylées permettent la liaison de protéines spécifiques, ce qui déclenche les voies de signalisation. J'ai donc voulu déterminer si le phénotype observé dans la lignée ITCH^{-/-} est accompagné de changements dans les voies de signalisation en aval du récepteur EGFR. Une stimulation à 2ng/ml d'EGF recombinant fut effectuée pour révéler ces effets par Western-Blot. La Figure 27A montre que le niveau total du récepteur est le même dans les deux lignées. Ce niveau diminue légèrement après 60min de stimulation et continue à diminuer jusqu'à la fin de l'expérience dans les deux lignées. Le niveau de phosphorylation des tyrosines 1068 et 1148 sont comparables entre les HeLa parentales et ITCH^{-/-} tout au long de la période étudiée. Elle atteint un niveau maximal à 10min, se maintient environ 30min, puis décroît à partir de 60min (Figure 27B). Cette diminution pourrait correspondre à la dégradation du récepteur, puisque le signal obtenu pour le récepteur total montre la même tendance. Pendant que ces signaux phospho-EGFR commencent à disparaître à 240min dans les HeLa, les cellules ITCH^{-/-} montrent toujours un niveau visible du récepteur activé. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la dégradation du récepteur est légèrement ralentie dans la lignée ITCH^{-/-} mais cette tendance n'est pas supportée statistiquement.

La phosphorylation de ERK est souvent révélée par Western-Blot comme indicateur de l'activation de la voie MAPK. La Figure 27B montre que l'activation de ERK est maintenue plus

longtemps dans les cellules ITCH^{-/-}. À 240min, les cellules parentales montrent une réduction visible du signal pERK1/2 mais les cellules ITCH^{-/-} maintiennent un taux de phosphorylation similaire à celui observé à 120min.

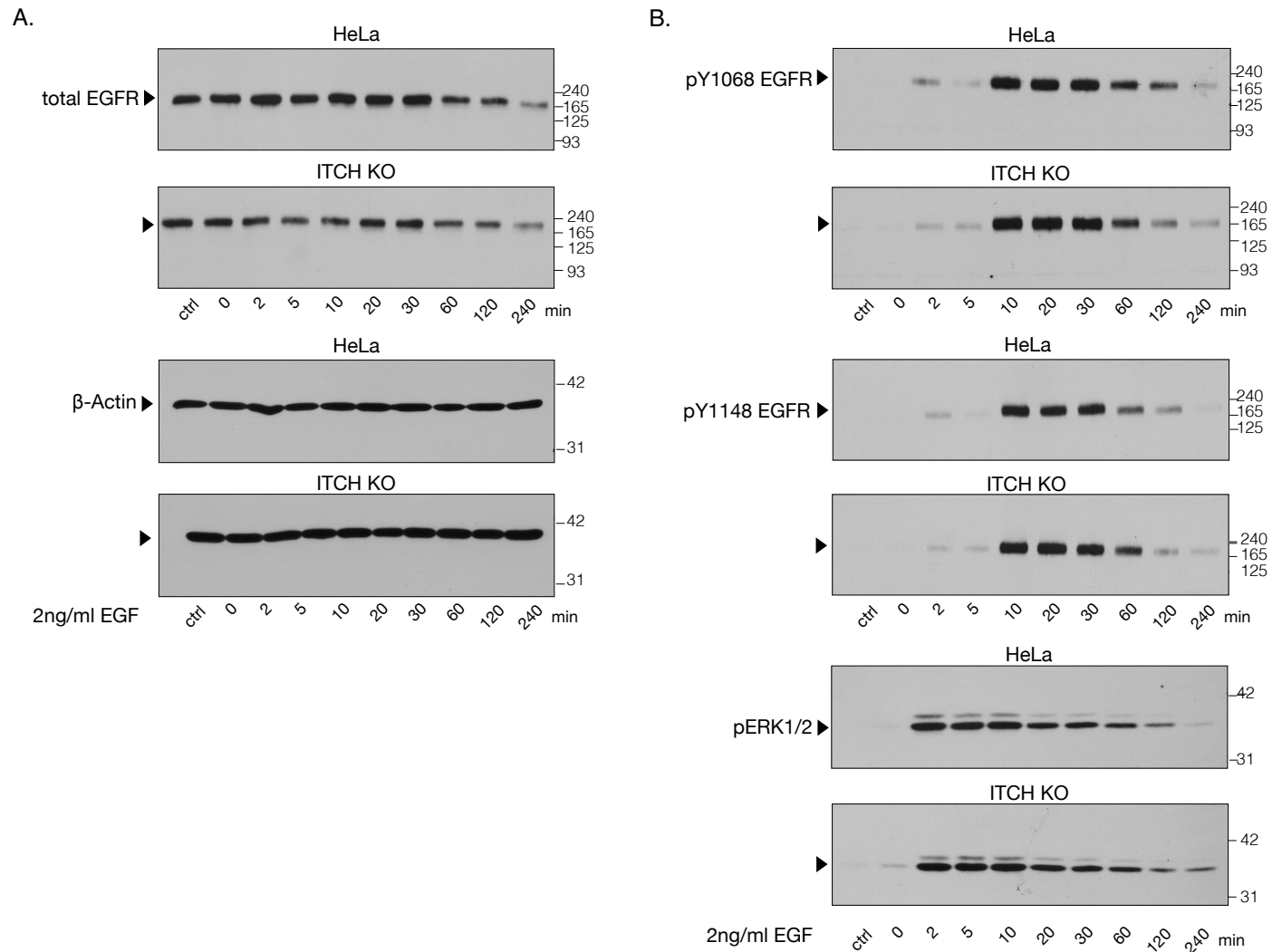


Figure 27. Les niveaux endogènes des protéines indicatrices de l'activation et la signalisation du récepteur à l'EGF.

Analyse par Western-Blot des protéines indiquées dans la lignée HeLa WT et ITCH^{-/-}. Les cellules furent traitées avec 2ng/ml d'EGF recombinant pour les durées marquées (0, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 240 min). L'expérience montrée est représentative de trois expériences indépendantes.

3.4. Discussion

L'endocytose de l'EGFR contrôle la prolifération et la survie cellulaire. Ce mécanisme est hautement régulé et un trafic intracellulaire dérégulé de la famille EGFR des RTK joue des rôles importants et bien reconnus dans l'oncogenèse (144). Dans ce chapitre, nous montrons que la ligase de l'ubiquitine ITCH joue un rôle important dans l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR.

L'absence de la protéine ITCH diminue drastiquement le taux d'internalisation d'EGFR par la voie endocytique dépendante de la Clathrine. L'absence d'ITCH ne semble pas affecter les voies indépendantes de la Clathrine comme le démontre l'internalisation presque comparable entre les lignées avec des stimulations à forte concentration d'EGF. Lors de la stimulation des récepteurs, les protéines adaptatrices Endophiline, Amphiphysine et Pacsin facilitent l'internalisation en recrutant plusieurs protéines effectrices de la formation et la dissociation de la vésicule de Clathrine à partir de la membrane plasmique. Une fois le récepteur phosphorylé, Endophiline est recrutée par CBL/CIN85 pour former un complexe qui sert de médiateur pour la dégradation du récepteur (7, 61). Tandis que la fonction de la ligase de l'ubiquitine CBL comme initiateur de la dégradation du récepteur activé a été démontrée, la raison pour laquelle CBL recrute Endophiline à ce site reste inconnue. De plus, la fonction de la ligase de l'ubiquitine ITCH dans ce complexe, une protéine capable de lier les trois membres CBL, CIN85 et Endophiline est également inconnue. Le substrat CBL est envoyé vers une dégradation protéasomale, suggérant qu'ITCH joue un rôle de régulateur négatif de la dégradation lysosomale de l'EGFR (5). CIN85 est connu pour jouer le rôle de protéine intermédiaire entre CBL et Endophiline puisque que ces deux protéines ne possèdent pas les motifs pour interagir directement. Toutefois, ITCH lie CBL directement en utilisant ses domaines WW, un type

d'interaction typique entre une ligase HECT et son substrat. Endophiline n'est donc probablement pas nécessaire comme protéine intermédiaire entre ITCH et CBL. ITCH est une ligase CWH qui utilise sa région riche en prolines pour lier son substrat Endophiline. Mon objectif était de comprendre la fonction qu'ITCH performe en recrutant Endophiline au complexe CBL/CIN85.

À ce jour, les chercheurs ont étudié l'effet de l'absence de la ligase CBL et de la protéine Endophiline sur le déroulement de l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'EGFR. Cependant, l'effet de l'absence de la ligase ITCH n'a pas été investigué. L'Endophiline a été démontrée comme une protéine indispensable pour l'étape de démantèlement de la Clathrine et son absence retarde le recyclage des vésicules pour de nouveaux cycles d'endocytose aux synapses (73). Dans les cellules de cancer du sein, le knockdown d'Endophiline A2 cause une internalisation défectueuse de l'EGFR (145). De même, la présence de la protéine CBL est essentielle pour l'internalisation dépendante de la Clathrine de l'EGFR, tel que démontré par la réduction du taux de son internalisation à la suite d'un knockdown de CBL dans les cellules PAE (*porcine aortic endothelial*) (131). Et l'ubiquitylation du récepteur par CBL a été démontrée comme un mécanisme essentiel par lequel l'EGFR est internalisé (132).

Dans cette étude, nous clarifions pour la première fois que la protéine ITCH joue un rôle direct dans l'internalisation de l'EGFR stimulé en comparant le taux d'EGF intracellulaire entre une lignée cellulaire WT et une autre qui n'exprime pas ITCH. Dans des conditions où la voie dépendante de la Clathrine seule est stimulée, l'essai d'endocytose révèle que les cellules ITCH^{-/-} n'internalisent pas une même quantité d'EGF fluorescent comme les cellules-parents. L'endocytose de la Transferrine, non affectée par le knockout d'ITCH, prend une route différente de celle de l'EGFR-EGF. Les deux types de cargos subissent une sorte de triage pré-endocytique qui permet de diriger les vésicules contenant chaque type de récepteur vers son destin (146). La comparaison de l'internalisation d'EGF avec celle de la Transferrine nous a permis de déduire que l'endocytose dépendante de la Clathrine d'un récepteur éventuellement internalisé sans stimulation, ne dépend pas de la ligase de l'ubiquitine ITCH.

Une mutation de la cystéine catalytique ou de la région riche en prolines d'ITCH ne permet pas de rétablir le phénotype observé lorsque la protéine ITCH WT est surexprimée. D'abord, ces résultats montrent que la disponibilité de la région riche en prolines de ITCH est nécessaire pour garantir la formation des complexes protéiques nécessaires pour l'acheminement de l'EGFR vers les endosomes. Les interactions SH3-PRR peuvent contrôler le trafic endocytaire et l'accélération de la dégradation du cargo comme dans le cas de l'interaction Rin1-STAM. Ce complexe fonctionne comme régulateur du trafic endocytaire de l'EGFR. La région riche en prolines du facteur d'échange pour la GTPase Rab5, Rin1 (*Ras interaction/interference 1*), lie le domaine SH3 de la protéine STAM (*signal transducing adaptor molecule*) et permet la régulation de sa fonction dans le tri du récepteur ubiquitylé dans les endosomes. Les deux protéines colocalisent avec l'EGFR stimulé au niveau des endosomes pour faciliter le ciblage du cargo vers les lysosomes pour dégradation. Une colocalisation similaire entre ITCH et Endophiline A1 a été observée après surexpression des deux protéines et stimulation des cellules à l'EGF (4). La protéine adaptatrice Intersectine 1 est aussi un substrat de la ligase ITCH, mais une surexpression d'ITCH WT ne cause pas la dégradation de l'isoforme Intersectine 1-s (139). Intersectine 1 est une autre protéine régulatrice de l'endocytose, l'ubiquitylation et la signalisation de l'EGFR. Son élimination de la cellule réduit l'internalisation de l'EGFR ainsi que la signalisation MAPK (147). Elle participe au processus de stimulation de l'ubiquitylation de l'EGFR en liant à la fois les régions riches en prolines de CBL et Sprouty 2, une protéine inhibitrice de CBL. Cette interaction perturbe ainsi l'interaction Sprouty2-CBL, entraînant une ubiquitylation accrue de l'EGFR (148).

Également, l'inhibition de l'activité ligase d'ITCH (ITCH non catalytique) peut conduire à l'échec de la modification des substrats d'ITCH à la membrane plasmique. Ce changement peut perturber les dynamiques moléculaires requises pour assurer un complexe d'internalisation complet prêt à enrober le récepteur au niveau de la surface membranaire. L'ubiquitylation de la protéine adaptatrice Eps15 par la ligase de l'ubiquitine Parkin donne un exemple sur la sensibilité de l'EGFR à la régulation des protéines endocytiques par les modifications post-traductionnelles. La modification d'Eps15 par l'ubiquitine interfère avec sa capacité à lier le

récepteur ubiquitylé ce qui retarde l'internalisation et la dégradation du récepteur menant à une signalisation prolongée de la voie PI3K–Akt (134).

Bien que les niveaux de base de l'EGFR total non stimulé et des substrats d'ITCH, CBL et Endophiline A2 ne changent pas dans la lignée ITCH^{-/-}, nos résultats montrent un ralentissement de la dégradation du récepteur activé (phospho-tyrosines 1068 et 1148 EGFR) accompagné d'une signalisation prolongée de la pERK. Ces défauts causés par une mauvaise localisation et une mauvaise régulation négative de l'EGFR sont souvent associés à une signalisation amplifiée, ce qui peut conduire au développement d'un cancer (144).

Le phénotype observé en absence de la protéine ITCH n'est probablement pas attribué uniquement à une altération possible de l'état d'ubiquitylation de CBL. Et cette ubiquitylation de CBL et du récepteur stimulé restent à interpréter dans la lignée ITCH^{-/-}. Mais ITCH semble agir aussi comme partenaire moléculaire des protéines à domaine SH3 jusqu'à preuve qu'elle utilise sa fonction comme ligase de l'ubiquitine pour modifier ces protéines. Ce rôle d'adaptateur moléculaire pourrait être particulier à un complexe spécifique à l'internalisation du récepteur à l'EGF et non un complexe utilisé dans l'internalisation par la voie dépendante de la Clathrine en général. Nous savons que les protéines CBL et Grb2 sont impliquées spécifiquement dans l'endocytose de l'EGFR (149, 150). Mais l'internalisation d'un autre récepteur stimulé doit être testée pour vérifier si l'implication d'ITCH dans l'endocytose de l'EGFR est spécifique à ce récepteur. L'ubiquitine ligase ITCH intervient dans l'ubiquitylation de CXCR4 au niveau de la membrane plasmique. CXCR4 est un GPCR qui a des fonctions critiques dans le développement du cœur, du cerveau et du système vasculaire et dans les mécanismes de réparation des tissus. Son activation stimule plusieurs cascades de signalisation de l'Akt et des kinases ERK1/2, assurant la survie et la migration des cellules. L'ubiquitylation et la dégradation de CXCR4 sont spécifiquement médiées par ITCH, et un knockdown de cette dernière cause une réduction de la dégradation et du niveau d'ubiquitylation du récepteur CXCR4. Plus spécifiquement, ITCH agit aussi pour réguler le tri de CXCR4 à la voie de dégradation. ITCH-CXCR4 ubiquitylé forment un complexe avec Hrs au niveau des endosomes, permettant l'acheminement du récepteur à la voie lysosomale (151). Un autre récepteur dont

l'ubiquitylation est médiée par ITCH est le récepteur Notch (26). Notch est un récepteur transmembranaire et un régulateur important des décisions sur l'induction du développement et la survie des cellules T. Les étapes initiales de l'endocytose de Notch ne dépendent pas de ITCH. Cependant, sa polyubiquitylation K29 par cette ubiquitine ligase est requise à une étape ultérieure du ciblage aux lysosomes même en absence d'un ligand (32).

En résumé, nous découvrons que l'endocytose médiée par la Clathrine de l'EGFR dépend de l'ubiquitine ligase ITCH. Nous déterminons également que ITCH ne fonctionne pas seulement comme une ubiquitine ligase mais aussi comme une protéine adaptatrice pour faciliter ce processus.

4. Analyse protéomique des lignées ITCH^{-/-}

4.1. L'étude des peptides et protéines par spectrométrie de masse

Dans le chapitre 3, nous avons déterminé un rôle direct de la ligase de l'ubiquitine ITCH dans l'internalisation dépendante de la Clathrine de l'EGFR. L'activité catalytique de ITCH et ses interactions avec les domaines SH3 étaient toutes deux essentielles à la fonction de ITCH dans ce processus. Pour approfondir ces résultats, nous avons examiné l'effet de l'abolition de la protéine ITCH sur les niveaux d'expression et d'ubiquitylation de l'ensemble des protéines de la lignée ITCH^{-/-}. En théorie, l'absence d'ITCH est susceptible d'altérer le niveau d'expression de ses protéines substrats destinées à la dégradation. Nous étions ainsi curieux de vérifier si les protéines qui lient ITCH dans le processus d'internalisation de l'EGFR sont altérées si la ligase responsable de leur dégradation ne s'exprime plus dans la cellule. D'autres protéines inconnues comme partenaires de ITCH pourraient également être identifiées, aidant ainsi à découvrir des nouvelles voies dans lesquelles ITCH pourrait être impliquée. Également, le niveau d'ubiquitylation des substrats d'ITCH pourrait être différent dans les lignées contrôles et ITCH^{-/-} sans nécessairement mener à la dégradation des protéines ubiquitylées. Nous avons ainsi comparé par spectrométrie de masse (*MS : mass spectrometry*) les lignées HeLa et ITCH^{-/-}, en enrichissant d'une part par pull-down les protéines interagissant avec ITCH, et d'autre part par immunoprécipitation les protéines ubiquitylées dans ces lignées.

La spectrométrie de masse mesure une propriété intrinsèque d'une molécule, sa masse, avec une sensibilité très élevée et elle est donc utilisée dans un large éventail d'applications. L'identification des composants des complexes protéiques par *MS* est devenue l'une des techniques les plus puissantes et régulièrement utilisées pour la détection des interactions protéiques. L'étude des interactions protéiques par *MS* donne un aperçu de la fonction des protéines, leurs partenaires moléculaires et les voies cellulaires dans lesquelles elles peuvent être impliquées. Parce que la *MS* mesure la masse moléculaire d'une protéine, c'est la méthode de choix pour la détection et l'identification de toute modification post-traductionnelle qui

altère la masse d'une protéine. Dans la plupart des études, les protéines obtenues de lysats totaux ou de fractions subcellulaires particulières (membranes, noyaux ou autres compartiments intracellulaires) ou dans des complexes précipités subissent une digestion à la trypsine sur gel suivie par l'analyse des séquences de peptides obtenues pour qu'elles soient identifiées (152).

L'isolement de protéines par pull-down ou immunoprécipitation suivie de la chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse (*LC-MS /MS : liquid chromatography–tandem mass spectrometry*) conduit à l'identification de protéines qui se lient directement ou indirectement. Un spectromètre de masse ionise les composants de l'échantillon, sépare les ions résultants selon leurs rapports masse/charge (m/z) et mesure l'intensité de chaque ion. D'un côté, *LC* est une technique qui sépare les composants d'un échantillon en fonction des différences dans leur affinité ou leur force de rétention pour la phase stationnaire (interaction relative avec des particules enrobées de produits chimiques) et la phase mobile (le solvant éluant à travers une colonne). Lorsqu'un échantillon est injecté, il est adsorbé sur la phase stationnaire et le solvant passe à travers la colonne pour séparer les composés un par un. De l'autre côté, *MS* ionise des atomes ou des molécules pour faciliter leur détection en fonction de leur masse moléculaire et charge. Un spectromètre de masse trace les intensités ioniques relatives contre les valeurs m/z , et une série de spectres de masse sont générés à chaque point dans le temps. Cette information indique le niveau de concentration des ions qui ont une masse donnée et est extrêmement précieuse pour l'identification unique des molécules, également connue sous le nom d'analyse qualitative. En couplant les techniques *LC* et *MS*, les spectres de masse obtenus à partir de ces mesures fournissent à la fois la masse moléculaire et les informations structurelles des composants élués. Par conséquent, *LC-MS/MS* combine l'excellente résolution de séparation de *LC* avec l'excellente capacité qualitative de *MS* (153, 154).

La dernière partie de cette étude consiste à déterminer les protéines dont la présence et/ou l'état d'ubiquitylation varient dans une lignée *ITCH^{-/-}* en comparaison avec une lignée *WT*. Afin d'atteindre cet objectif, une analyse par spectrométrie de masse fut utilisée pour comparer les

peptides obtenus selon deux méthodes distinctes. D'abord, les lysats des cellules HeLa WT et ITCH^{-/-} furent sujet à un essai de pull-down à l'aide des protéines de fusion ITCH-full. Cet essai nous a permis de récupérer et de comparer les protéines qui lient ITCH dans chaque type de lysat. Les substrats de ITCH dégradés suite à leur ubiquitylation par la ligase devraient être plus abondants dans les lysats ITCH^{-/-}. Dans une autre expérience, les protéines ubiquitylées présentes dans les extraits de ces cellules furent récupérés à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine. Nous supposons que les protéines substrats de ITCH seront plus abondantes dans la fraction immunoprécipitée par l'anticorps dirigé contre l'ubiquitine dans l'extrait WT.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Pull-down ITCH

Les cellules HeLa WT et ITCH^{-/-} furent lysées à l'aide du tampon A (20 mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, inhibiteurs des protéases). Les lysats furent agités pour 20min en présence de TritonX-100 (1% final) puis centrifugés à 238,700xg 15min à 4°C. Les surnageants furent incubés avec des billes Glutathione-Sepharose couplées à la GST seule (contrôle négatif) ou à la protéine de fusion GST-ITCH complète (20µg) toute la nuit à 4°C. Les billes furent ensuite lavées 3x avec 1ml du tampon A additionné de TritonX-100 à 1%, éluées dans du LSB (*loading SDS sample buffer* ; 3% SDS, 1% beta-mercaptoéthanol, 115mM sucrose, 65mM tris-HCL pH6.8 et 0.1% colorant bleu de bromophénol) pour 10min à 95°C et envoyés pour analyse par spectrométrie de masse (Proteomics RI-MUHC ; *The Research Institute of the McGill University Health Centre*).

4.2.2. Immunoprécipitation de l'ubiquitine

Les cellules HeLa WT et ITCH^{-/-} furent traitées avec l'inhibiteur du protéasome 26S, MG132 à 2.5 µM pour 14h et lysées de la même façon que précédemment. Les extraits protéiques furent incubés avec l'anticorps anti-ubiquitine (*Cell Signaling* ; catalogue #3936, 2µg utilisés par condition) et les billes protéine G-Sepharose toute la nuit à 4°C. Comme contrôle négatif, l'immunoglobuline IgG de souris couplé aux billes protéine G-Sepharose fut inclus pour détecter les liaisons non spécifiques. Les billes furent ensuite lavées 3x avec 1ml du tampon A

additionné de TritonX-100 à 1%, éluées dans du LSB pour 10min à 95°C et analysés par spectrométrie de masse.

4.2.3. Spectrométrie de masse LC-MS/MS

Les échantillons furent migrés sur des gels SDS-PAGE. Les bandes furent réduites avec du DTT, alkylées avec de l'acide iodoacétique et digérées avec de la trypsine. Les peptides extraits furent resolubilisés dans 0,1% d'acide formique aqueux et passés à travers des colonnes qui permettent de différencier les molécules selon leurs masses/charges (*MS*) et de les séparer physiquement (*LC*) (155). La cartographie des peptides et l'identification des protéines furent déterminées à la base d'une comparaison avec les séquences protéiques chez l'Homme et le logiciel Scaffold (Proteome Sciences : <http://www.proteomesoftware.com/products/scaffold/>) fut utilisé pour visualiser et appliquer les critères de sélection aux résultats.

4.3. Résultats

4.3.1. Les protéines interagissant avec la protéine ITCH détectées par spectrométrie de masse

Une spectrométrie de masse *LC-MS/MS* fut réalisée à partir des lysats des lignées HeLa WT et ITCH^{-/-} récupérés par la protéine GST-ITCH dans un essai de pull-down. Un gel représentatif des lysats totaux utilisés et des protéines précipitées à l'aide de la protéine de fusion GST-ITCH complète est montré dans la **Figure 28A**. Les protéines de l'analyse spectrométrique prises en considération sont filtrées selon les critères suivants : un minimum de deux peptides, un seuil protéique de 99% et un seuil peptidique de 95%. De plus, les protéines ayant deux peptides ou plus de différence entre ITCH^{-/-} et WT sont considérées à abondances différentes (Tableau 6). Au contraire, les protéines ayant un seul peptide de plus ou de moins en comparant les deux lignées sont considérées à la même abondance (**Tableau 7**).

Les résultats présentés dans tous les tableaux (Tableau 6 à **Tableau 9**) sont triés par ordre décroissant de leur présence peptidique dans l'échantillon. Dans chaque tableau, le nombre de peptides uniques, la valeur quantitative des spectres totaux normalisés et la probabilité de confiance en l'identité du peptide sont rapportés. Les protéines identifiées dans le pull-down

GST-ITCH sont dans deux tableaux différents. L'un contenant les résultats pour lesquels le nombre de peptides uniques est plus élevé dans la lignée ITCH^{-/-} (Tableau 6) et l'autre contenant les protéines présentes avec un même nombre de peptides dans les deux lignées (Tableau 7). Les protéines identifiées plus abondantes dans l'échantillon WT incluent différentes sous-unités de l'ARN polymérase II ainsi que différentes protéines de liaison à l'ARN, la déubiquitinase FAF-X (*Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*) ou USP9X (*Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked*), un régulateur clé de l'adhésion et de la migration IQGAP1 (*IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*), les protéines endocytiques SNX18 et SNX9 et une partie du complexe majeur d'histocompatibilité classe I (MHC ; *major histocompatibility complex*) (HLA ; *human leukocyte antigen class I histocompatibility antigen, A alpha chain*) (Tableau 6). Dans le Tableau 7, les protéines présentes avec le même nombre de peptides dans les deux échantillons incluent la protéine endocytiqye Endophiline A2, le régulateur d'ITCH NDFIP1, le substrat d'ITCH WBP2 (*WW Domain Binding Protein 2*), la ligase de l'ubiquitine WWP1 (NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase) et les sous-unités H et I de l'ARN polymérase II.

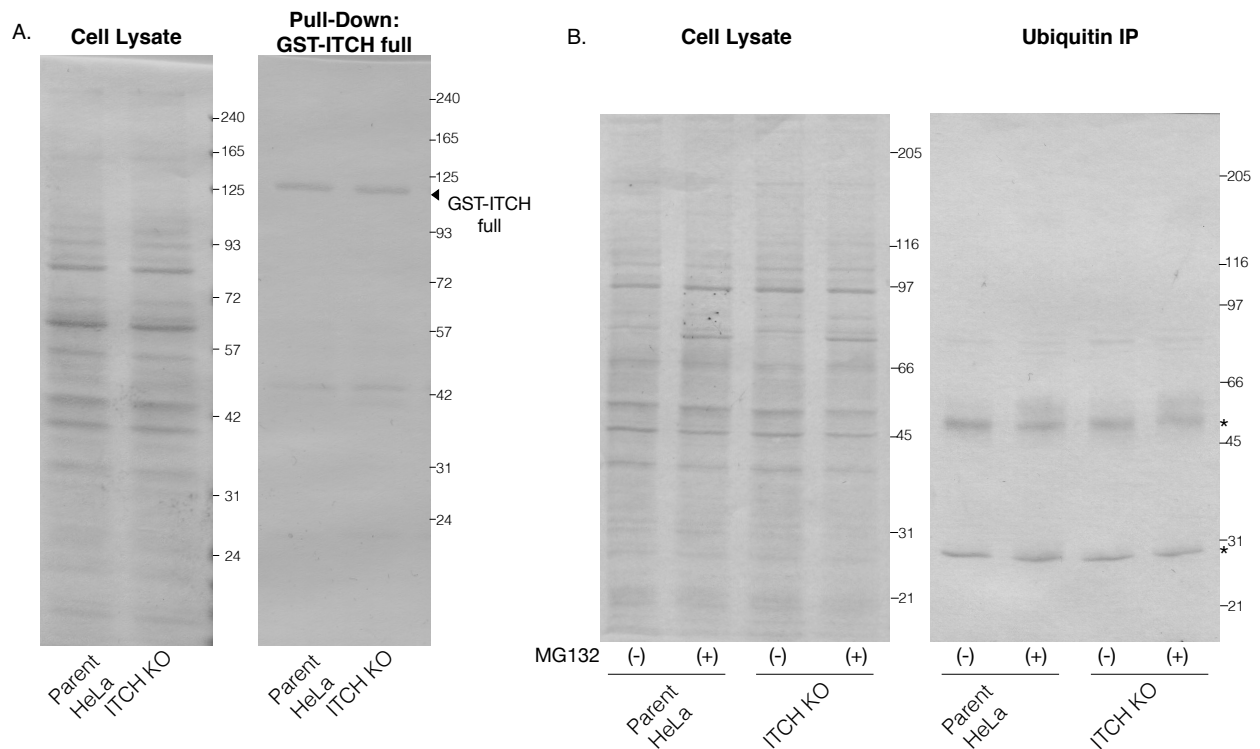


Figure 28. Ponceaux représentatifs du pull-down ITCH complète et de l'immunoprécipitation anti-ubiquitine à partir des cellules HeLa WT et ITCH^{-/-}.

A) Le panneau de gauche montre le marquage au ponceau des lysats des cellules HeLa WT et ITCH^{-/-}. Le panneau de droite montre le ponceau des éluats obtenus à partir d'une expérience de pull-down à l'aide de GST-ITCH complète. La protéine de fusion GST-ITCH complète est indiquée avec une flèche noire. B) Le panneau de gauche montre le ponceau des lysats totaux utilisés dans cette expérience à partir de cellules HeLa WT et ITCH^{-/-} traitées (+) ou non (-) avec de la MG132. Le panneau de droite montre un ponceau des protéines éluées à la suite d'une immunoprécipitation à l'anti-ubiquitine à partir ces lysats. Les bandes empilées sur chaque piste représentent toutes les protéines qui étaient liées à une ou plusieurs molécules d'ubiquitine lors de l'extraction protéique.

*Chaines lourdes et légères des IgG.

Tableau 6. Protéines interagissant avec la fusion GST-ITCH plus abondantes comparé à la lignée WT.

PROTEIN NAME	GENE	MOLECULAR WIEGHT	UNIQUE PEPTIDES COUNT		QUANTITATIVE VALUE (NORMALIZED TOTAL SPECTRA)		PROBABILITY	
			WT HeLa	ITCH-/-	WT HeLa	ITCH-/-	WT HeLa	ITCH-/-
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 *	RPB1	217 kDa	29	52 (+23)	45	67	100%	100%
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2 *	RPB2	134 kDa	21	34 (+13)	22	37	100%	100%
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	USP9X	292 kDa	21	29 (+8)	22	21	100%	100%
Ras GTPase-activating-like protein	IQGA1	189 kDa	4	16 (+12)	3	10	100%	100%
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 *	CPSF6	59 kDa	9	13 (+4)	17	22	100%	100%
Retrotransposon-derived protein PEG10 *	PEG10	80 kDa	7	13 (+6)	11	15	100%	100%
Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase *	RPAP2	70 kDa	6	13 (+7)	8	12	100%	100%
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 *	CPSF5	26 kDa	8	11 (+3)	16	19	100%	100%
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3 *	RPB3	31 kDa	4	11 (+7)	6	11	100%	100%
Myosin-9 *	MYH9	227 kDa	4	8 (+4)	3	4	100%	100%
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q *	HNRPQ	70 kDa	1	8 (+7)	1	6	100%	100%
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 *	ROA1	39 kDa	3	7 (+4)	3	5	100%	100%
Sorting nexin-18	SNX18	69 kDa	2	7 (+5)	2	6	100%	100%
DNA-directed RNA polymerase II subunit *	GRL1A	42 kDa	2	7 (+5)	2	5	100%	100%
Ataxin-10 *	ATX10	53 kDa	2	6 (+4)	2	6	100%	100%
40S ribosomal protein S2 *	RS2	31 kDa	0	6 (+6)	0	4	100%	100%
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 *	ROA2	37 kDa	2	5 (+3)	3	4	100%	100%
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit *	RPAB1	25 kDa	2	5 (+3)	3	4	100%	100%
Spartin	SPART	73 kDa	2	4 (+2)	3	3	100%	100%
HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	1A68	41 kDa	1	3 (+2)	2	2	98%	100%
4F2 cell-surface antigen heavy chain *	4F2	68 kDa	1	3 (+2)	2	2	100%	100%
Polypyrimidine tract-binding protein 1 *	PTBP1	57 kDa	1	3 (+2)	1	3	99%	100%
Sorting nexin-9	SNX9	67 kDa	1	3 (+2)	1	2	100%	100%
60S ribosomal protein L7a *	RL7A	30 kDa	1	3 (+2)	1	2	86%	100%
Galectin-3-binding protein *	LG3BP	65 kDa	0	3 (+3)	0	2	40%	100%
Angiotensin-like protein 1	AMOL1	107 kDa	0	2 (+2)	0	1	96%	100%
BAG family molecular chaperone regulator 2 *	BAG2	24 kDa	0	2 (+2)	0	1		100%

Les chiffres entre parenthèses représentent combien de peptides uniques les cellules ITCH^{-/-} contiennent de plus par rapport à HeLa WT.

*Protéines non rapportées comme substrats de ITCH.

Tableau 7. Protéines déterminées à abondance similaire dans la lignée HeLa WT et ITCH^{-/-} par spectrométrie de masse.

PROTEIN NAME	GENE	MOLECULAR WEIGHT	UNIQUE PEPTIDES COUNT		QUANTITATIVE VALUE (NORMALIZED TOTAL SPECTRA)		PROBABILITY	
			WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}
Endophilin-A2	SH3GL1	41 kDa	4	4	5	4	100%	100%
NEDD4 family-interacting protein 1	NFIP1	25 kDa	4	4	4	5	100%	100%
WW domain-binding protein 2	WBP2	28 kDa	4	3	7	5	100%	100%
NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase	WWP1	105 kDa	2	2	49	32	100%	100%
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit *	RPAB3	17 kDa	2	2	3	3	100%	100%
DNA-directed RNA polymerase II subunit *	RPB9	15 kDa	1	2	1	2	99%	100%
DnaJ homolog subfamily A member 1 *	DNJA1	45 kDa	1	2	1	1	100%	100%

*Protéines non rapportées comme substrats de ITCH.

4.3.2. Comparaison des protéines ubiquitylées entre les cellules HeLa parentales et les cellules ITCH^{-/-}.

Un gel représentatif des protéines immunoprécipitées à l'aide de l'anti-ubiquitine est montré dans la **Figure 28B**. Les protéines récupérées en complexe avec l'ubiquitine à partir des cellules HeLa WT et ITCH^{-/-} sont présentées dans deux tableaux, le premier listant les peptides-ubiquitine plus abondants dans l'échantillon WT (**Tableau 8**), le deuxième les protéines plus abondantes dans la lignée ITCH^{-/-} (**Tableau 9**).

Parmi les protéines du **Tableau 8** nous trouvons les trois composants du complexe ternaire UFD1 (*Ubiquitin Fusion Degradation 1*), TERA (*Transitional endoplasmic reticulum ATPase*) et NPLOC4 (*Nuclear protein localization protein 4 homolog*) associés à l'ERAD (*ER-associated degradation*). Ce complexe lie les protéines ubiquitylées et permet l'export des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, où elles seront dégradées dans le protéasome. Nous trouvons aussi la ligase de l'ubiquitine TRIM21, le composant principal des particules ribonucléoprotéiques (*Vaults*) impliquées dans le transport nucléaire-cytoplasmique MVP (*Major vault protein*), différentes ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes impliquées dans la maturation et la stabilisation de l'ARNm ainsi que la protéine de régulation du cytosquelette IQGAP1.

Les protéines plus abondantes dans la lignée ITCH^{-/-} sont affichées dans le **Tableau 9** où les protéines de liaison à l'actine Gelsoline et Fibronectine ainsi que le récepteur de la Transferrine sont également listées.

Tableau 8. Résultats de spectrométrie de masse montrant les protéines conjuguées à l'ubiquitine à nombre de peptides supérieur dans la lignée HeLa WT à la lignée ITCH^{-/-}.

PROTEIN NAME	GENE	MOLECULAR WIEGHT	UNIQUE PEPTIDES COUNT		QUANTITATIVE VALUE (NORMALIZED TOTAL SPECTRA)		PROBABILITY	
			WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}
Transitional endoplasmic reticulum ATPase *	TERA	89 kDa	37 (-11)	26	90	73	100%	100%
Splicing factor 3B subunit 1 *	SF3B1	146 kDa	15 (-12)	3	18	4	100%	100%
Major vault protein *	MVP	99 kDa	15 (-15)	0	17	0	100%	
Nuclear protein localization protein 4 homolog *	NPL4	68 kDa	11 (-7)	4	13	8	100%	100%
Sequestosome-1	SQSTM1	48 kDa	7 (-3)	4	17	5	100%	100%
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 *	ROA2	37 kDa	6 (-4)	2	10	5	100%	100%
RNA-binding protein 25 *	RBM25	100 kDa	6 (-4)	2	6	4	100%	100%
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 *	ROA1	39 kDa	5 (-3)	2	5	4	100%	100%
Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 *	UFD1	35 kDa	5 (-2)	3	10	6	100%	100%
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 *	RO52	54 kDa	5 (-2)	3	6	6	100%	100%
Splicing factor 3B subunit 3 *	SF3B3	136 kDa	5 (-4)	1	5	1	100%	100%
Heat shock 70 kDa protein 6 *	HSP76	71 kDa	5 (-5)	0	86	0	100%	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like *	HNRDL	46 kDa	4 (-3)	1	5	1	100%	94%
Ras GTPase-activating-like protein	IQGA1	189 kDa	3 (-2)	1	3	1	100%	100%
Multiple myeloma tumor-associated protein 2 *	MMTA2	29 kDa	3 (-3)	0	3	0	100%	
DnaJ homolog subfamily A member 1 *	DNJA1	45 kDa	2 (-2)	0	3	0	100%	

Tableau 9. Résultats de spectrométrie de masse montrant les protéines conjuguées à l'ubiquitine à nombre de peptides supérieur dans la lignée HeLa ITCH^{-/-} par rapport à la lignée WT.

PROTEIN NAME	GENE	MOLECULAR WIEGHT	UNIQUE PEPTIDES COUNT		QUANTITATIVE VALUE (NORMALIZED TOTAL SPECTRA)		PROBABILITY	
			WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}	WT HeLa	ITCH ^{-/-}
Gelsolin	GELS	86 kDa	9	11 (+2)	13	26	100%	100%
Transferrin receptor protein 1 *	TFR1	85 kDa	1	5 (+4)	1	6	100%	100%
Hemoglobin subunit alpha *	HBA	15 kDa	1	3 (+2)	3	8	100%	100%
Fibronectin *	FINC	263 kDa	0	2 (+2)	0	3	36%	100%

Les chiffres entre parenthèses représentent combien de peptides uniques les lysats ITCH^{-/-} contiennent de plus par rapport aux lysats HeLa WT.

*Protéines non rapportées comme substrats de ITCH.

Selon leurs fonctions, ces protéines peuvent être divisées en quatre catégories : 1) les sous-unités ribosomales, de l'ARN polymérase et les protéines de régulation de l'ARN, 2) les protéines impliquées dans le trafic et la signalisation cellulaires, 3) les protéines qui fonctionnent dans l'adhésion cellulaire et la cytokinèse et 4) les protéines du système d'ubiquitylation. Une représentation des résultats protéomiques selon les fonctions est montrée dans la Figure 29.

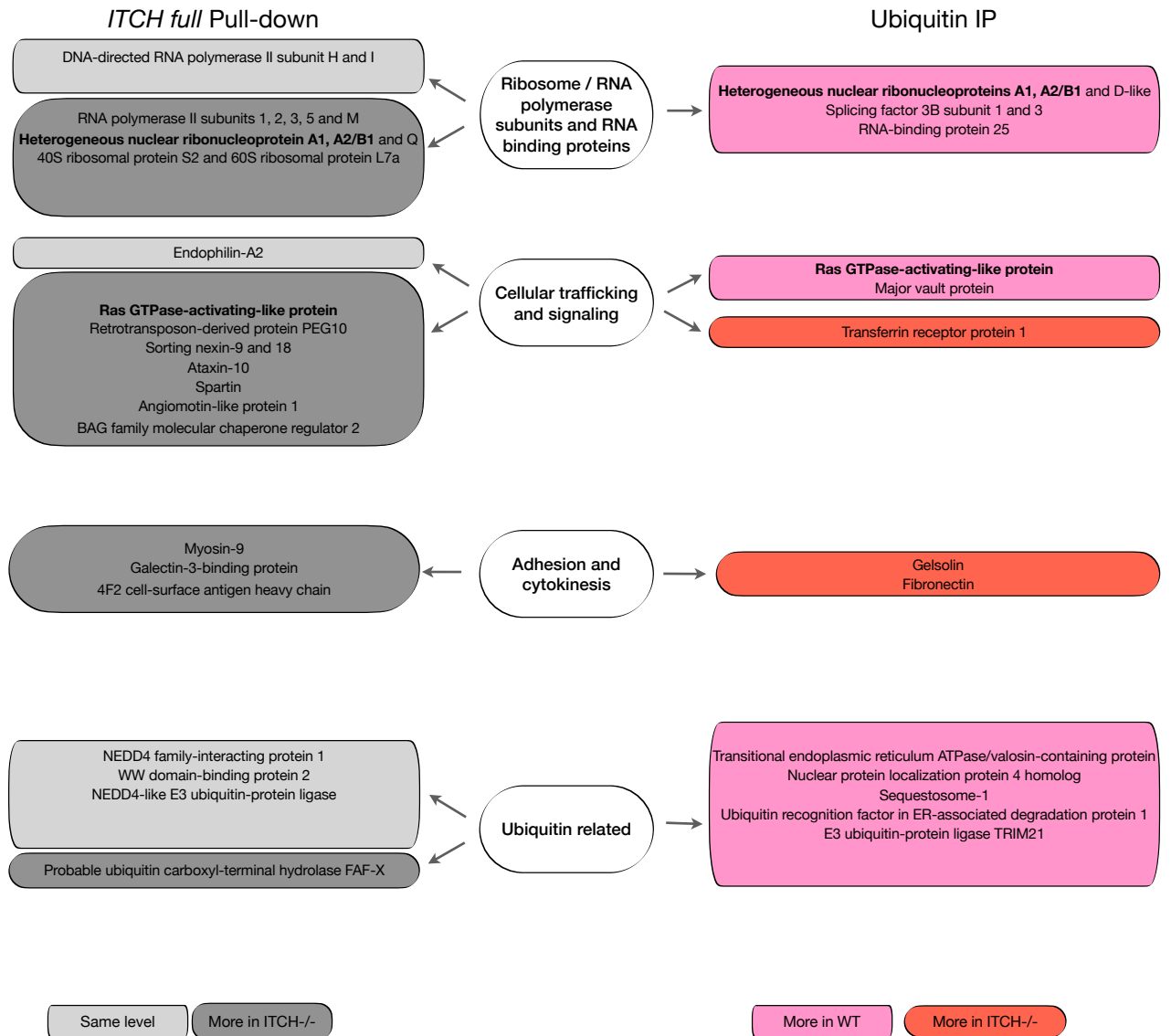


Figure 29. Représentation des différentes catégories de protéines identifiées par spectrométrie de masse selon la fonction et le nombre de peptides dans les cellules HeLa WT et ITCH^{-/-}.

4.4. Discussion

À la recherche de protéines qui interagissent avec la ligase de l'ubiquitine ITCH, potentiellement guidant vers la découverte de nouvelles fonctions qu'ITCH accomplit dans la cellule, une analyse par spectrométrie de masse *LC/MS* fut effectuée à partir de lysats totaux des cellules HeLa WT et ITCH^{-/-}. Des protéines impliquées dans différents processus cellulaires furent identifiées dans des échantillons élués à partir de billes liant la protéine ITCH complète, ces protéines interagissent ainsi directement ou indirectement avec la ligase. D'autres protéines furent aussi précipitées à l'aide de l'anticorps anti-ubiquitine, ces protéines sont ainsi mono ou polyubiquitylées de façon endogène dans les cellules. Une comparaison de leur présence entre les HeLa WT et ITCH^{-/-} nous a permis d'estimer si la ligase ITCH a une influence sur leur taux d'ubiquitylation.

4.4.1. Protéines liant la fusion GST-ITCH

Les protéines du trafic et de la signalisation cellulaires récupérées par ITCH à partir des cellules HeLa ITCH^{-/-} et WT

Commençons avec les protéines dont le nombre de peptides ne varie pas entre la lignée ITCH^{-/-} et contrôle. Endophiline A2 est parmi ces protéines, un résultat compatible avec le western-blot détectant son niveau endogène (Figure 20). De même, le régulateur de la ligase, NDFIP1 est présent à un niveau similaire dans les deux échantillons. ITCH est auto-inhibée par une interaction intramoléculaire entre son domaine HECT et les deux domaines WW ce qui empêche l'accès de l'ubiquitine à sa cystéine catalytique. Les NDFIP sont capables d'enlever cette auto-inhibition en liant les domaines WW, libérant ainsi le domaine HECT et permettant à ITCH de reprendre son activité catalytique (156). Un membre de la famille NEDD4, WWP1 est aussi visible dans cette catégorie. WBP2 est une protéine surexprimée dans des échantillons de cancer du sein et corrélée à une progression maligne et à une mauvaise survie des patientes. Elle est connue pour être un coactivateur de transcription liée au facteur de transcription de la voie Hippo, YAP, mais sa relation à la pathogenèse du cancer du sein est du fait qu'elle contribue aussi à la signalisation Wnt. La ligase ITCH cible WBP2 pour une dégradation

protéasomale dépendante de l'ubiquitine. Cette régulation négative de WBP2 par ITCH inhibe la transcription TCF (*T-cell factor*) / β -Caténine, la transformation *in vitro* et la tumorigenèse *in vivo*. L'interaction WBP2-ITCH peut être contrôlée par un traitement au WNT3A, le stimulateur de l'interaction de WBP2 avec la β -caténine (157), ce qui pourrait expliquer la présence de WBP2 au même niveau dans les deux lignées HeLa WT et ITCH^{-/-} non stimulées.

La protéine DNAJA1 (*DnaJ homologue subfamily A member 1*) existe aussi au même niveau dans les deux échantillons. Dans les cellules pancréatiques cancéreuses, DNAJA1 active probablement une protéine DnaK et forme un complexe qui supprime la voie JNK ainsi que l'hyperphosphorylation de c-Jun et l'effet anti-apoptotique trouvé dans une cellule cancéreuse (158). ITCH interagit avec JNK et c-Jun et une dégradation de c-Jun est contrôlée par la phosphorylation de la ligase ITCH par JNK (35). Si DNAJA1 existe en complexe avec ces protéines dans la cellule, ceci pourrait expliquer sa présence dans nos résultats.

Abordons maintenant les protéines déjà caractérisées comme partenaires ou substrats d'ITCH et qui se trouvent avec un nombre de peptides plus élevé dans les cellules ITCH^{-/-} par rapport aux cellules WT, comme IQGAP1. Elle se présente avec 12 peptides de plus dans les cellules déficientes en ITCH par rapport au contrôle. IQGAP1 est une protéine d'échafaudage exprimée de manière omniprésente. Elle se lie ou s'associe indirectement à plus de 90 protéines différentes, et aide à la médiation de la signalisation des récepteurs, la fonction GTPase, la dynamique de l'actine, la régulation neuronale et le trafic intracellulaire. IQGAP1 possède un domaine WW qui est nécessaire pour son interaction avec ERK1/2. L'interruption de l'interaction entre ERK1/2 et IQGAP1 en utilisant un peptide concurrent contenant le domaine WW est capable d'inhiber la tumorigenèse induite par RAS et RAF et dépendante de la signalisation ERK. IQGAP1 est phosphorylée sur ses tyrosines en réponse à la stimulation aux facteurs de croissance VEGF ou EGF (159). La relation d'IQGAP1 à la voie de signalisation ERK pourrait expliquer la présence de cette protéine dans le pull-down ITCH. Si ITCH utilise ses domaines WW pour empêcher l'interaction IQGAP1-ERK1/2, elle contrôlera la signalisation ERK. Dans un contexte différent d'une cellule HeLa WT, la ligase ITCH est connue pour lier la VP40 du virus Ebola, une particule qui lie IQGAP1. La présence d'IQGAP1 dans le processus de

bourgeoisement viral est importante pour le remodelage du cytosquelette de l'actine et ITCH est un régulateur de ce processus (160, 161).

PEG10 (*Paternally expressed gene 10*) accumulée dans la lignée ITCH^{-/-} (> 6 peptides) est un oncogène et sa dérégulation altère la prolifération cellulaire, l'apoptose et le développement des tumeurs malignes. TGF-β pourrait inhiber l'expression de PEG10 par la régulation négative de c-Myc en aval de la voie Smad (162). La ligase ITCH agit comme une ligase d'ubiquitine pour la polyubiquitylation et dégradation de Smad7 et c-Myc, une modification qui régule la signalisation TGF-β de façon positive (163). L'hyperactivité du facteur de transcription c-Myc en absence d'ITCH pourrait donc expliquer la surexpression de PEG10, une protéine qui n'a jamais été identifiée comme partenaire direct ou indirect de ITCH.

Les peptides correspondants aux protéines endocytiques SNX18 et 9 sont plus nombreux dans la lignée ITCH^{-/-}. Ceci est compatible avec la littérature où ces protéines ont été caractérisées comme substrats d'ITCH. Leurs domaines SH3 lient la PRR d'ITCH, menant à leur ubiquitylation et dégradation (137). De façon intéressante, la stimulation à l'EGF induit la phosphorylation de SNX9 par ACK2 (*Cdc42-associated kinase-2*) et favorise la dégradation de l'EGFR (138). SNX9 participe ainsi à la dégradation du récepteur stimulé et la ligase ITCH peut réguler ce processus en modulant le niveau de SNX9 dans les cellules. L'ubiquitine protéase FAM/USP9x est aussi un partenaire de ITCH trouvé à 8 peptides de plus dans les cellules ITCH^{-/-}. D'après les résultats publiés par notre laboratoire, les deux protéines interagissent et la surexpression de cette déubiquitinase renverse l'auto-ubiquitylation de ITCH et résulte en une augmentation de son niveau endogène dans la cellule (164). Ceci n'empêche pas la possibilité que cette relation soit réciproque et que l'augmentation du niveau de cette enzyme dans la lignée ITCH^{-/-} soit un résultat direct de l'absence de ITCH.

Angiomotine est une protéine associée à la membrane qui contrôle la formation des jonctions serrées, la polarité ainsi que la prolifération et migration des cellules (165). Trois membres de la famille NEDD4 sont capables d'ubiquityler l'isoforme p130 Angiomotine et de l'envoyer vers une dégradation protéasomale, Nedd4, Nedd4-2 et ITCH. Le knockdown concomitant de ces ligases cause une augmentation marquée du niveau d'Angiomotine dans les cellules HEK293T.

Cependant, le knockdown d'ITCH seul a entraîné une augmentation plus faible du niveau d'Angiotensine par rapport à NEDD4 ou NEDD4-1, qui ont montré chacune une augmentation significative du niveau de ce substrat (166). Dans nos résultats, 2 peptides correspondants à l'Angiotensine sont présents dans la lignée ITCH^{-/-} tandis qu'aucun peptide n'est détectable dans les HeLa WT, ce qui est congruent avec ce résultat.

De plus, ITCH signale la dégradation protéasomale de la kinase de la voie de suppression de tumeurs Hippo, LATS1, amplifiant ainsi la tumorigenèse. ITCH contracte aussi un autre événement associé à l'induction de l'apoptose par LATS1 qui phosphoryle et inactive le coactivateur de transcription, YAP (Yes-associated protein) (167). Similairement à LATS1, angiotensine promeut la phosphorylation de YAP et un knockdown d'Angiotensine cause une atténuation de la phosphorylation de YAP (168). Angiotensine est ainsi un substrat potentiel de la ligase de l'ubiquitine ITCH ou une protéine négativement régulée de façon indirecte par ITCH.

Spartine n'est pas ubiquitinée par ITCH mais agit plutôt comme une protéine activatrice de la ligase, elle augmente son activité enzymatique en la libérant de son état d'auto-inhibition. La Spartine est une protéine adaptatrice nécessaire pour la polyubiquitylation de l'Adipophiline sur les gouttelettes lipidiques. Elle recrute ITCH aux gouttelettes lipidiques, un mécanisme par lequel la Spartine peut réguler le renouvellement des gouttelettes lipidiques (169). Cependant, Spartine est impliquée aussi dans le trafic de l'EGFR et son knockdown perturbe les taux de dégradation et d'internalisation de l'EGFR. Elle est recrutée à la membrane plasmique à la suite d'une stimulation à l'EGF et elle est monoubiquitylée mais de façon indépendante de la présence du sérum dans les cellules (170).

L'engagement du récepteur des cellules T (TCR : *T cell receptor*) avec son peptide / MHC ou HLA chez l'homme déclenche une cascade de signalisation qui se traduit par une activation des cellules T. ITCH régule l'anergie des cellules T en modulant PLC- γ 1 et PKC- θ , deux molécules clés de signalisation induite par la Ca²⁺/Calcineurine. Après leur ubiquitylation par ITCH, PLC- γ 1 et PKC- θ suivent un tri endosomal vers les lysosomes pour subir une dégradation. Des niveaux réduits de PLC- γ 1 et PKC- θ raccourcissent la durée de vie de la synapse immunologique (une structure qui se forme à l'interface entre une cellule T et une cellule présentatrice de l'antigène

APC), ce qui entraîne l'incapacité à maintenir un contact APC (*antigen-presenting cells*) stable, empêchant ainsi la réponse des cellules T et favorisant leur tolérance après l'engagement du TCR (171). La lignée HeLa exprime la protéine de présentation de l'antigène HLA (172) mais ne représente pas un modèle de cellule immunologique.

Dans nos résultats, plusieurs protéines qui ne sont pas connues pour lier ITCH de façon directe ou indirecte apparaissent. Ataxin10, une protéine plus abondante dans la lignée ITCH^{-/-} (> 4 peptides), est parmi ces protéines. Peu de choses sont connus sur la fonction de cette protéine mais elle est essentielle au développement normal, car le knockout de cette protéine chez la souris cause une létalité embryonnaire. Elle est phosphorylée par la kinase Plk1 (*polo-like kinase 1*) et polyubiquitylée par une ligase inconnue (173).

La famille BAG (*BAG family molecular chaperone regulator, BCL2-associated athanogene 2*) a initialement été identifiée comme un groupe de protéines interagissant avec Bcl-2 et qui empêchent la mort cellulaire. Elles utilisent leur domaine BAG pour interagir directement avec le domaine ATPase des chaperons moléculaires Hsp70/Hsc70. D'une part, l'interaction de Hsp70/Hsc70 avec BAG2 module son activité chaperonne. D'autre part, le complexe BAG2/Hsp70 est impliqué dans le système de dégradation ubiquitine-protéasome en inhibant la ligase CHIP associée à Hsp70 (174).

Les protéines de l'ARN polymérase II et les protéines ribonucléiques récupérées par ITCH à partir des cellules HeLa ITCH^{-/-} et WT

Dans le pull-down ITCH, les protéines qui varient du plus grand nombre de peptides entre WT et ITCH^{-/-} sont les sous-unités de l'ARN polymérase II, RPB1 et RPB2 (*DNA-directed RNA polymerase II subunit*). D'après la littérature, un arrêt de la transcription à cause de lésions de l'ADN déclenche le recrutement de Nedd4 et l'ubiquitylation de RNAPII (*RNA polymerase II*) par cette ligase, conduisant à sa dégradation par le protéasome. L'ubiquitylation de l'ARN polymérase II induite par les UV est significativement réduite par un knockdown NEDD4, mais non par le knockdown des autres membres de la famille NEDD4 (comprenant ITCH) (175). De plus, en réponse à des ruptures d'ADN double brin, WWP2 cible la sous-unité RPB1 pour

l'ubiquitylation liée à K48, entraînant ainsi l'expulsion dépendante du protéasome de RNAPII (176). Dans nos données, ces sous-unités de l'ARN polymérase n'apparaissent pas parmi les protéines ubiquitylées mais parmi les protéines qui lient ITCH de façon directe.

Les hnRNP (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) sont une grande famille de protéines qui peuvent naviguer entre le noyau et le cytoplasme pour effectuer une variété de fonctions liées au métabolisme des acides nucléiques, y compris des fonctions nucléaires (transcription, épissage, coiffage 5' et polyadénylation) et cytoplasmiques (transport, stabilité, traduction et dégradation de l'ARNm). Les hnRNP Q et A1 semblent accumuler dans la lignée ITCH^{-/-}. Une telle accumulation est observée dans les corps des inclusions pathologiques FTLD (*Frontotemporal lobar degeneration*) (177).

4.4.2. Les protéines immunoprécipitées par l'anti-ubiquitine

Les protéines plus présentes dans les lysats HeLa

La surreprésentation des protéines ubiquitylées dans les cellules HeLa par rapport à la lignée ITCH^{-/-} pourrait indiquer que celles-ci sont normalement ubiquitylées par ITCH. La protéine MVP paraît parmi les protéines les plus précipitées (15 peptides) par l'anti-ubiquitine à partir des cellules HeLa WT, alors qu'aucun peptide de cette protéine n'a été détecté à partir des cellules ITCH^{-/-}. Il s'agit d'une protéine hautement conservée avec l'évolution. Elle est le composant principal de complexes ribonucléoprotéiques cytoplasmiques omniprésents appelés *Vaults*. Outre la résistance à la chimiothérapie, les *Vaults* sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus cellulaires, notamment les mécanismes de transport, la transmission de signaux et la réponse immunitaire (178). MVP fonctionne comme une protéine d'échafaudage pour SHP-2 (*Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase*) et ERK et la régulation de la phosphorylation de MVP par SHP-2 peut jouer un rôle important dans la signalisation de la survie cellulaire (179). De plus, les *Vaults* ont un potentiel de promotion des tumeurs en stabilisant les voies de migration et de survie médiées par EGFR / PI3K dans le glioblastome humain (180).

La sclérose latérale amyotrophique (*ALS; Amyotrophic lateral sclerosis*) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des motoneurones supérieurs et inférieurs entraînant une faiblesse musculaire progressive et finalement la mort due à une insuffisance respiratoire. Afin de découvrir de nouvelles causes génétiques d'ALS, un groupe de recherche a effectué une analyse comparative de l'interactome de différentes protéines impliquées dans l'ALS à l'état sauvage comparé à dans leurs versions mutantes causant la maladie. Plusieurs protéines plus représentées dans l'échantillon WT par rapport aux cellules *ITCH^{-/-}* dans la fraction ubiquitylée ont été caractérisées comme partenaires de liaison de ces protéines associées à l'ALS. *OPTN (optineurin)*, une protéine pour laquelle des mutations dominantes et récessives causent l'ALS, est un inhibiteur de la voie NF- κ B, un récepteur de l'autophagie et un régulateur du transport vésiculaire associé à l'appareil de Golgi. Les différents membres du complexe UFD1, Nploc4 et VCP (valosin-containing protein) étaient présentes dans l'interactome *OPTN* ainsi que dans la fraction immunoprécipitée par l'ubiquitine.

D'autres protéines qui interagissent directement avec *OPTN* sont *BAG2* et *FAF2 (FAS-associated factor 2)*. *BAG2* se retrouvait également de façon plus abondante dans la fraction purifiée par la fusion GST-*ITCH* à partir des extraits *ITCH^{-/-}*, renforçant le concept qu'il s'agit d'un véritable substrat de *ITCH*.

Les ubiquilines forment un lien fonctionnel entre la machinerie d'ubiquitylation et le protéasome, et ubiquiline2 (*UBQLN2*) est associée à l'ALS. De nombreuses sous-unités du protéasome ont été trouvées dans l'interactome *UBQLN2*, ainsi que le complexe UFD1L, *SQSTM1* (sequestosome-1) et deux ligases d'ubiquitine, *TRIM32* et *ITCH*, toutes des protéines plus présentes dans les HeLa WT que dans *ITCH^{-/-}*. Il est intéressant de noter qu'Ataxin10, une protéine récupérée dans notre pull-down *ITCH*, et la protéine associée à la maladie neurodégénérative *SCA10 (spinocerebellar ataxia 10)* a été identifiée en tant que protéine interagissant avec *UBQLN2* (181).

De nombreuses maladies neurodégénératives se caractérisent par la formation d'agrégats de protéines mal repliés qui provoquent une toxicité cellulaire (181). ERAD est un système d'élimination des protéines mal repliées ou non assemblées du réticulum endoplasmique. Les

cibles sont sélectionnées par un système de contrôle de qualité et sont finalement détruites par le système cytoplasmique ubiquitine-protéasome (UPS : *ubiquitin-proteasome system*). Les protéines qui lient plus l'ubiquitine dans les cellules exprimant ITCH : SQSTM1, UFD1L, Nploc4, VCP et TRIM21 agissent toutes pour faciliter l'élimination des protéines mal repliées par ERAD (182, 183). VCP par exemple, interagit avec les protéines ubiquitylées et fonctionne dans différentes voies de contrôle de la qualité des protéines, y compris ERAD (184). Les protéines hnRNPA2B1, hnRNPA1 et hnRNPQ sont aussi dans la liste des protéines liant l'ubiquitine et liées aux maladies neurodégénératives (185).

En résumé, les protéines Ataxin10, BAG2, hnRNPA2B1 et hnRNPA1 augmentent et les protéines liant l'ubiquitine hnRNPA2B1 et hnRNPA1 se réduisent en absence d'ITCH. Toutes étant liées à des éléments génétiques causant des maladies neurodégénératives, le changement de profil d'ubiquitylation de ces protéines de façon dépendante d'ITCH pointe vers un rôle clé que cette ligase peut jouer dans la voie ERAD et dans certaines maladies neurodégénératives.

Les protéines plus présentes dans les lysats ITCH^{-/-}

Quelques protéines étaient plus représentées dans la fraction ubiquitylée obtenue à partir des lysats ITCH^{-/-}. Pour cette catégorie, il est plus difficile d'établir un lien direct avec l'activité ligase de ITCH. Toutefois, il est probable que ces protéines soient ubiquitylées par une ou plusieurs des ligases elles-mêmes régulées par ITCH et qui seraient donc plus actives dans la lignée ITCH^{-/-}. Le récepteur de la Transferrine 1 liant l'ubiquitine se trouve à un niveau élevé dans la fraction ubiquitylée de la lignée knockout ITCH par rapport aux cellules WT. Ce récepteur est internalisé de façon constitutive et circule entre la membrane plasmique et les endosomes précoces et de recyclage. Le contexte cellulaire dans lequel ce récepteur serait dégradé est moins connu. On sait seulement que la ligase de l'ubiquitine MARCH8 est responsable de l'ubiquitylation dépendante du fer de ce récepteur, ce qui aboutit à sa dégradation lysosomale (186). La ligase ITCH pourrait donc être un régulateur secondaire de ce processus. Toutefois, l'internalisation de la Transferrine dans la lignée ITCH^{-/-} est normale (section 3.3.4.).

Les intégrines sont une superfamille de récepteurs d'adhésion cellulaire qui forment des hétérodimères $\alpha\beta$ et se lient aux ligands de la matrice extracellulaire, de la surface cellulaire et à des ligands solubles (187). La Thrombospondine-1 fait partie de la famille des Thrombospondines, des protéines de la matrice cellulaire synthétisées en réponse à la stimulation par les facteurs de croissance. Elle joue un rôle important dans la régulation de la croissance, de la motilité, de la survie et de l'adhésion des cellules. Elle reconnaît spécifiquement l'intégrine $\alpha3\beta1$ pour induire l'adhésion cellulaire (188). Les Intégrines $\alpha3$ et $\beta1$ et leur ligand Thrombospondine-1 sont présentes presque aux mêmes niveaux dans les fractions ubiquitylées des cellules HeLa et lignée ITCH^{-/-}. Toutefois, un autre ligand de l'Intégrine $\alpha3\beta1$, la Fibronectine, se retrouve à deux peptides uniquement dans la lignée ITCH^{-/-}. L'ubiquitylation est impliquée dans la régulation de plusieurs protéines nécessaires à l'adhésion et à la migration des cellules. Par exemple, l'ubiquitylation et la dégradation de l'Intégrine $\alpha5$ par c-CBL réduit l'adhérence des ostéoblastes à la Fibronectine (189). ITCH pourrait donc être impliqué dans l'adhésion cellulaire à travers ces intégrines.

Plusieurs des protéines identifiées ici comme substrats potentiels de ITCH lient aussi des ligases similaires à ITCH comme WWP2. Ces protéines communes sont les sous-unités ribosomales, les hnRNP, la déubiquitinase USP9X, l'Angiomotine, WBP2 et DNAJA1 (190). Les membres de la sous-famille CWH peuvent avoir des substrats et des partenaires moléculaires communs. Toutefois, ITCH est la seule ligase de ce groupe qui a l'option de lier des substrats via les domaines WW ou la PRR. Nous suggérons alors que ITCH pourrait accomplir une fonction précise dans le contrôle de l'endocytose de l'EGFR à l'aide de cette propriété.

D'après ces analyses, nous confirmons la ligase ITCH comme un partenaire moléculaire des protéines endocytiques Endophiline A2 et SNX9 et 18. Nous découvrons aussi les protéines connectées à l'EGFR et sa signalisation, IQGAP1 et Spartine comme protéines dont le profil peptidique change avec l'absence d'ITCH dans la cellule. Ceci suggère que de nouveaux éléments peuvent relier la ligase ITCH au phénomène de régulation de l'EGFR. Nos résultats pointent aussi vers un rôle pour ITCH dans le contrôle de l'adhésion cellulaire et de la qualité du système d'élimination des agrégats mal repliés.

5. Conclusions

L'ubiquitylation contrôle diverses fonctions cellulaires, y compris l'endocytose des récepteurs et le tri endosomal. L'endocytose de l'EGFR est contrôlé par la ligase de l'ubiquitine CBL, une protéine qui recrute la molécule adaptatrice CIN85. CIN85 est associée à Endophiline, qui peut induire une courbure négative de la membrane plasmique. CBL initie également l'élimination des EGFR activés de la surface membranaire et les cible pour la dégradation lysosomale en fonctionnant comme une ligase E3. La modification de l'EGFR par CBL est régulée par une autre activité d'ubiquitylation, celle réalisée par la ligase de l'ubiquitine ITCH. ITCH est une ligase de la famille NEDD4 capable de lier CBL à travers son domaine WW et Endophiline à travers sa région PRR. L'interaction ITCH-Endophiline est unique de deux façons. Premièrement, ITCH est la seule de sa famille qui contient des motifs riches en prolines utilisables pour une liaison SH3, et Endophiline est parmi les protéines qui lient cette PRR. Deuxièmement, en comparaison avec d'autres protéines à SH3, le SH3 d'Endophiline lie ITCH avec une affinité élevée.

Mon objectif était d'abord d'étudier la nature moléculaire de la liaison entre ITCH et Endophiline et d'identifier quels résidus de ITCH sont utilisés pour lier Endophiline. En utilisant cette information, j'ai pu sélectionner un mutant ITCH incapable de lier l'Endophiline et les autres protéines à domaine SH3 testées. CBL et Endophiline, deux protéines cruciales pour la réussite de l'internalisation de l'EGFR, sont des substrats d'ITCH. Le but principal dans ce projet de recherche était de définir le rôle de la ligase ITCH dans le processus d'internalisation de l'EGFR stimulé. La perturbation des interactions avec ces deux substrats par un knockout du gène *ITCH* nous a permis de découvrir l'importance de la présence d'ITCH pour le processus. L'élimination d'ITCH avait un impact négatif sur l'acheminement du récepteur stimulé par la voie d'endocytose dépendante de la Clathrine. À l'aide des expériences de sauvetage du phénotype, nous avons déterminé qu'ITCH accomplit deux fonctions lors de l'endocytose de l'EGFR, une fonction d'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et une fonction d'adaptateur. Nous avons aussi découvert que ces deux fonctions effectuées ensemble par ITCH sont essentielles pour une endocytose normale du récepteur à l'EGF. Je récapitule dans cette partie l'ensemble des résultats qui ont abouti à ces conclusions.

5.1. L'interaction ITCH-SH3 dépend des arginines fondamentales 252, 255 et 258 de la PRR

Les protéines impliquées dans l'endocytose Endophiline A1, A2, Amphiphysine II, Pacsin I et β -Pix ont été identifiées comme partenaires de la ligase ITCH par des tests de liaison avec la région riche en prolines (1). Dans ce projet, nous avons voulu effectuer des tests de liaison des domaines SH3 de ces protéines à la protéine ITCH complète. Ces tests nous ont permis de caractériser les trois résidus arginines 252, 255 et 258 comme requis pour la liaison ITCH-SH3 de toutes les protéines testées. Ayant empêché toute liaison efficace entre ITCH et ces protéines, ce mutant était notre protéine de choix pour représenter ITCH active mais défectueuse en sa capacité à former les complexes endocytiques médiée par les liaisons PRR-SH3.

5.2. Le knockout du gène *ITCH* n'affecte pas les niveaux endogènes d'EGFR, CBL et Endophiline

Afin de spécifier l'impact que l'absence de la protéine ITCH peut avoir sur le déroulement de l'endocytose de l'EGFR, nous avons aboli son expression en modifiant le génome des cellules HeLa et Cos7 par CRISPR/Cas9. Dans la lignée cellulaire qui n'exprime pas ITCH, le niveau basal du récepteur à l'EGF ne change pas au repos par rapport à une lignée WT. De même, les substrats d'ITCH CBL et Endophiline restent aux mêmes niveaux. Ces résultats nous permettent de conclure que la nature d'interaction entre ITCH et ces substrats n'affecte pas leur stabilité, du moins au niveau basal. Le rôle de ITCH n'est donc pas en lien avec la régulation du niveau de c-CBL et Endophiline disponible, mais potentiellement dans l'établissement d'interactions spécifiques dans un contexte cellulaire précis, comme lors de la stimulation de l'EGFR.

5.3. Le knockout du gène *ITCH* perturbe l'endocytose dépendante de la clathrine de l'EGFR

Nous avons donc effectué deux tests d'endocytose de l'EGF dans les lignées *ITCH*^{-/-} en comparaison avec les cellules parentales. Les résultats nous ont montré que seule l'internalisation de l'EGFR médiée par la clathrine est diminuée de façon significative. Ceci indique que la ligase ITCH contribue aux étapes précoces de l'endocytose où elle fait partie du

complexe lié à la clathrine qui permet le raccordement du récepteur stimulé à la membrane plasmique invaginée.

5.4. L'endocytose dépendante de la clathrine du récepteur à la Transferrine ne dépend pas de la ligase de l'ubiquitine ITCH

En comparaison avec l'EGF, la Transferrine prend la route médiée par la clathrine mais ne demande ni un ligand ni le complexe CBL-CIN85/Endophiline pour internaliser le récepteur avec succès. D'après nos résultats, nous pouvons déduire que le récepteur à la Transferrine ne nécessite pas la présence de la ligase de l'ubiquitine ITCH.

5.5. La fonction catalytique d'ITCH et sa région riche en prolines sont collectivement requises pour sa fonction dans l'internalisation de l'EGFR

Les expériences de sauvegarde du phénotype ont démontré que la surexpression de GFP-ITCH dans les lignées ITCH^{-/-} rétablit complètement l'internalisation du récepteur de l'EGF. Toutefois, la forme incapable de conjuguer l'ubiquitine à un substrat n'était pas suffisante pour sauver le phénotype. De plus, la forme incapable de lier les protéines à domaine SH3 était aussi incapable de rétablir le taux d'internalisation de l'EGF. Nous pouvons ainsi conclure qu'ITCH accomplit au moins deux fonctions dans le processus d'internalisation de l'EGFR. Elle doit ubiquityler minimalement un substrat, qui demeure à identifier, et participer au recrutement de protéines à domaine SH3, probablement Endophiline, mais également d'autres protéines similaires.

5.6. L'EGFR activé est plus stable en absence de la ligase de l'ubiquitine ITCH

Finalement, et dans le but d'évaluer la dégradation du récepteur stimulé dans les cellules ITCH^{-/-}, nous avons révélé par western blot que le taux du récepteur total ne change pas significativement au cours du temps lors d'une stimulation à une basse concentration d'EGF. Ceci était visible chez les cellules WT et knockout, indiquant que la quantité totale d'EGFR ne subit pas de réduction importante lorsque la voie de clathrine seule est activée. D'un autre côté, l'EGFR activé reste plus longtemps dans les cellules ITCH^{-/-}. Les phospho-EGFR sont détectables dans ces cellules à un temps avancé de la stimulation mais elles disparaissent dans

les cellules WT. Cette dégradation retardée des récepteurs phosphorylés est accompagnée d'une signalisation pERK1/2 prolongée dans les cellules qui n'expriment pas ITCH. Nous suggérons qu'un délai d'internalisation permet au récepteur phosphorylé de rester plus longtemps à la surface membranaire, déclenchant ainsi une signalisation prolongée. Les différences restent minimales et sont difficiles à apprécier par western blot. L'impact de cette signalisation prolongée potentielle reste à explorer plus en détail avec une approche plus quantitative.

5.7. Les rôles multiples de la ligase de l'ubiquitine ITCH

À l'aide d'une comparaison protéomique de l'ensemble des protéines existant dans les cellules HeLa sauvages et ITCH^{-/-}, nous avons détecté celles dont le nombre de peptides reste le même ou varie entre les deux échantillons. Pour garantir que les protéines comparées font partie de l'interactome d'ITCH, les complexes protéiques liant ITCH furent isolés dans une expérience de pull-down à l'aide de la ligase elle-même. De même, dans une expérience d'immunoprécipitation à l'aide de l'anti-ubiquitine, nous avons cherché les protéines dont le nombre de peptides liés à l'ubiquitine changent en absence d'ITCH dans la cellule. Le groupement de ces protéines selon leurs fonctions cellulaires nous a permis de confirmer l'implication de la ligase ITCH dans certains processus cellulaires et ouvert la possibilité de sa participation dans de nouvelles fonctions cellulaires. De nouvelles protéines impliquées dans la régulation de l'EGFR ont été trouvées, renforçant ainsi l'idée de l'implication d'ITCH à plusieurs niveaux pour contrôler le destin du récepteur. De plus, l'accumulation ou la réduction des niveaux d'une multitude de composants du système ERAD dans les cellules ITCH^{-/-} indique une contribution profonde de cette ligase aux événements de dégradation des protéines mal repliées, une fonction qui n'était pas attribuée à ITCH dans le passé. Finalement, nos résultats révèlent un nouveau rôle de la ligase ITCH dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines.

Les travaux effectués dans ce projet de recherche ont permis de définir la ligase de l'ubiquitine ITCH comme une protéine essentielle pour l'endocytose dépendante de la clathrine de l'EGFR. ITCH est requise pour lier l'ubiquitine à différents éléments de la machinerie endocytique. Elle est aussi une protéine adaptatrice qui complète les connexions protéiques créées par l'activation

du récepteur. L'ubiquitylation régule un grand nombre de processus cellulaires et puisque ITCH semble reconnaître de nombreux substrats, elle participe au contrôle de plusieurs processus comme la prolifération cellulaire, l'endocytose des récepteurs, l'expression de surface des canaux ioniques et transporteurs membranaires, la réponse inflammatoire, le cancer et l'apoptose. L'identité d'interaction entre ITCH et ses substrats dans la machinerie endocytique est maintenant bien définie. Cependant, la définition des fonctions protéine-protéine de ce réseau d'interactions reste à compléter. Les éléments causatifs ou accompagnants la réduction de l'internalisation de l'EGF, comme l'ubiquitylation du récepteur et de son régulateur CBL restent aussi à étudier. Pour répondre à la question de spécificité de l'implication d'ITCH dans le contrôle d'EGFR, l'impact de l'absence d'ITCH sur l'endocytose d'autres récepteurs, pour lesquels l'internalisation est dépendante d'un ligand, doit être examiné.

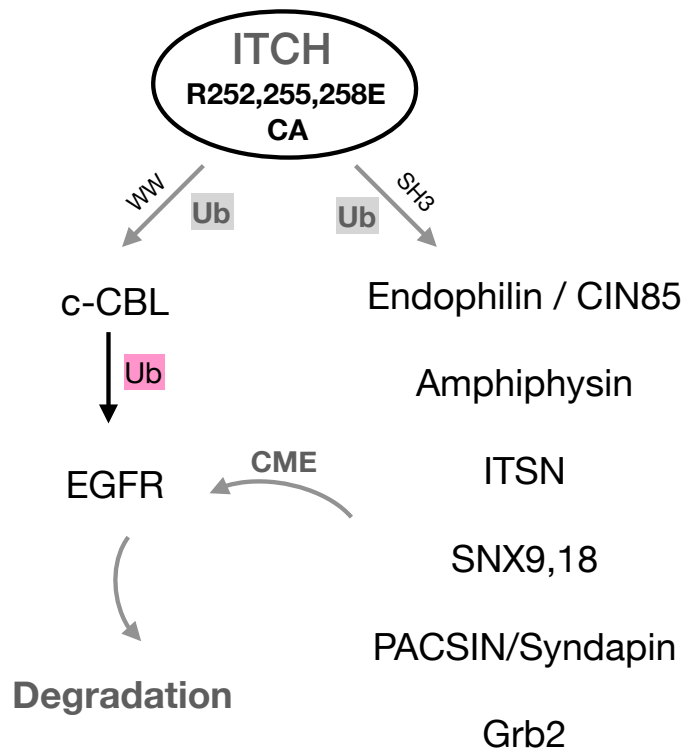


Figure 30. Modèle de régulation de l'endocytose dépendante de la clathrine de l'EGFR par la ligase ITCH.

Deux fonctions permettent à ITCH de réguler l'endocytose dépendante de la clathrine de l'EGFR. ITCH WT agit comme ligase de l'ubiquitine pour réduire le niveau de son substrat c-CBL et réguler la dégradation de l'EGFR stimulé. Un mutant non catalytique de ITCH (CA) est incapable d'ubiquityler ses substrats, par exemple c-CBL et Endophiline. ITCH agit aussi comme protéine adaptatrice et participe aux étapes précoces de l'endocytose en s'associant aux protéines liées à la vésicule de clathrine, Endophiline, Amphiphysine, Intersectine, SNX9 et 18, Pacsin et Grb2. Un mutant CA ou incapable de lier les domaines SH3 de ces protéines (R_{252,255,258}E) est incapable de rétablir une réduction du taux d'internalisation de l'EGFR qui survient en absence de ITCH. La couleur grise indique une déficience en absence de ITCH et en présence de l'un des deux mutants. La flèche noire indique une interaction efficace.

Références bibliographiques

1. Desrochers G, Cappadocia L, Lussier-Price M, Ton AT, Ayoubi R, Serohijos A, et al. Molecular basis of interactions between SH3 domain-containing proteins and the proline-rich region of the ubiquitin ligase Itch. *J Biol Chem*. 2017;292(15):6325-38.
2. Mim C, Cui H, Gawronski-Salerno JA, Frost A, Lyman E, Voth GA, et al. Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilin. *Cell*. 2012;149(1):137-45.
3. Ringstad N, Nemoto Y, De Camilli P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(16):8569-74.
4. Angers A, Ramjaun AR, McPherson PS. The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(12):11471-9.
5. Magnifico A, Ettenberg S, Yang C, Mariano J, Tiwari S, Fang S, et al. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43169-77.
6. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*. 1998;12(23):3663-74.
7. Soubeyran P, Kowantetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 2002;416(6877):183-7.
8. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
9. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(3):565-70.
10. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1980;255(16):7529-32.
11. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(1):11-5.
12. Perrett CA, Lin DY, Zhou D. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Front Microbiol*. 2011;2:143.
13. Jadhav T, Wooten MW. Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. *J Proteomics Bioinform*. 2009;2:316.

14. Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysosome conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(5):2400-8.
15. Ganoth D, Leshinsky E, Eytan E, Hershko A. A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(25):12412-9.
16. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:503-33.
17. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):169-78.
18. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*. 2005;24(19):3353-9.
19. Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10. *Mol Cell*. 2007;27(6):1014-23.
20. Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(8):508-23.
21. Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:291-322.
22. Buetow L, Huang DT. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(10):626-42.
23. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(13):8206-14.
24. Wenzel DM, Stoll KE, Klevit RE. E2s: structurally economical and functionally replete. *Biochem J*. 2011;433(1):31-42.
25. Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell*. 2004;116(2):181-90.
26. Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, et al. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2000;275(46):35734-7.
27. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(6):398-409.
28. Sluimer J, Distel B. Regulating the human HECT E3 ligases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(17):3121-41.
29. Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, et al. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell death and differentiation*. 2008;15(7):1103-12.
30. Venuprasad K, Zeng M, Baughan SL, Massoumi R. Multifaceted role of the ubiquitin ligase Itch in immune regulation. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(5):452-60.

31. Bhandari D, Robia SL, Marchese A. The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1324-39.
32. Chastagner P, Israel A, Brou C. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One*. 2008;3(7):e2735.
33. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10).
34. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
35. Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, et al. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*. 2004;306(5694):271-5.
36. Azakir BA, Angers A. Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cell Signal*. 2009;21(8):1326-36.
37. De Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J. c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 11):2167-78.
38. Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, Gaudio E, Melino G, Croce CM, et al. Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(11):4162-7.
39. Wegierski T, Hill K, Schaefer M, Walz G. The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J*. 2006;25(24):5659-69.
40. Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, et al. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol*. 2002;3(3):281-7.
41. Parravicini V, Field AC, Tomlinson PD, Basson MA, Zamoyska R. Itch^{-/-} alphabeta and gammadelta T cells independently contribute to autoimmunity in Itchy mice. *Blood*. 2008;111(8):4273-7282.
42. Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, et al. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell*. 2006;21(1):135-41.
43. Venuprasad K, Elly C, Gao M, Salek-Ardakani S, Harada Y, Luo JL, et al. Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1117-26.
44. Venuprasad K, Huang H, Harada Y, Elly C, Subramaniam M, Spelsberg T, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol*. 2008;9(3):245-53.

45. Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, et al. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1415-23.
46. Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, et al. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *The EMBO journal.* 2005;24(4):836-48.
47. Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(34):12753-8.
48. Azakir BA, Desrochers G, Angers A. The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *Febs j.* 2010;277(5):1319-30.
49. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(9):597-608.
50. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(5):313-26.
51. Aki D, Zhang W, Liu YC. The E3 ligase Itch in immune regulation and beyond. *Immunol Rev.* 2015;266(1):6-26.
52. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(8):517-33.
53. Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 2011;9(3):e1000604.
54. Yarden Y, Tarcic G, SpringerLink (Service en ligne). *Vesicle Trafficking in Cancer.* New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer; 2013. 1 ressource en ligne. p.
55. Gallop JL, Jao CC, Kent HM, Butler PJ, Evans PR, Langen R, et al. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *The EMBO journal.* 2006;25(12):2898-910.
56. Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, Hon WC, Mittal R, McMahon HT. Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(9):6651-61.
57. Boucrot E, Pick A, Camdere G, Liska N, Evergren E, McMahon HT, et al. Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell.* 2012;149(1):124-36.
58. Kjaerulff O, Brodin L, Jung A. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem Biophys.* 2011;60(3):137-54.
59. Chen H, Antonarakis SE. The SH3D1A gene maps to human chromosome 21q22.1-->q22.2. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;78(3-4):213-5.

60. Giachino C, Lantelme E, Lanzetti L, Saccone S, Bella Valle G, Migone N. A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics*. 1997;41(3):427-34.
61. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 2002;416(6877):187-90.
62. Pierrat B, Simonen M, Cueto M, Mestan J, Ferrigno P, Heim J. SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain. *Genomics*. 2001;71(2):222-34.
63. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9(10):1142-51.
64. Takahashi Y, Young MM, Serfass JM, Hori T, Wang HG. Sh3glb1/Bif-1 and mitophagy: acquisition of apoptosis resistance during Myc-driven lymphomagenesis. *Autophagy*. 2013;9(7):1107-9.
65. Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*. 2001;155(2):193-200.
66. Ferguson SM, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, et al. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*. 2009;17(6):811-22.
67. Saheki Y, De Camilli P. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a005645.
68. De Heuvel E, Bell AW, Ramjaun AR, Wong K, Sossin WS, McPherson PS. Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8710-6.
69. Mettlen M, Pucadyil T, Ramachandran R, Schmid SL. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 5):1022-6.
70. Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, et al. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*. 1999;24(1):143-54.
71. Guichet A, Wucherpfennig T, Dudu V, Etter S, Wilsch-Brauniger M, Hellwig A, et al. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J*. 2002;21(7):1661-72.
72. Verstreken P, Kjaerulff O, Lloyd TE, Atkinson R, Zhou Y, Meinertzhagen IA, et al. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*. 2002;109(1):101-12.
73. Milosevic I, Giovedi S, Lou X, Raimondi A, Collesi C, Shen H, et al. Recruitment of endophilin to clathrin coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*. 2011;72(4):587-601.

74. Renard HF, Simunovic M, Lemiere J, Boucrot E, Garcia-Castillo MD, Arumugam S, et al. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*. 2015;517(7535):493-6.
75. Watanabe S, Mamer LE, Raychaudhuri S, Luvsanjav D, Eisen J, Trimbuch T, et al. Synaptojanin and Endophilin Mediate Neck Formation during Ultrafast Endocytosis. *Neuron*. 2018;98(6):1184-97 e6.
76. Takahashi Y, Meyerkord CL, Wang HG. Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):947-55.
77. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2014;25(3):282-303.
78. Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr Rev*. 1990;11(3):418-42.
79. Chia CM, Winston RM, Handyside AH. EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development*. 1995;121(2):299-307.
80. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5).
81. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995;376(6538):337-41.
82. Sibilina M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*. 1995;269(5221):234-8.
83. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*. 1995;269(5221):230-4.
84. Sibilina M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J*. 1998;17(3):719-31.
85. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006;366(1):2-16.
86. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):21-6.
87. Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, Xiao G, et al. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell*. 2013;154(6):1269-84.
88. Tan X, Lambert PF, Rappaport AC, Anderson RA. Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. *Trends Cell Biol*. 2016;26(5):352-66.

89. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(1):3-20.
90. Tan X, Sun Y, Thapa N, Liao Y, Hedman AC, Anderson RA. LPTM4B is a PtdIns(4,5)P2 effector that regulates EGFR signaling, lysosomal sorting, and degradation. *EMBO J*. 2015;34(4):475-90.
91. Tan X, Thapa N, Sun Y, Anderson RA. A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation. *Cell*. 2015;160(1-2):145-60.
92. Conte A, Sigismund S. Chapter Six - The Ubiquitin Network in the Control of EGFR Endocytosis and Signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;141:225-76.
93. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;12(3):541-52.
94. Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*. 2009;315(4):638-48.
95. Huang Y, Bharill S, Karandur D, Peterson SM, Marita M, Shi X, et al. Molecular basis for multimerization in the activation of the epidermal growth factor receptor. *Elife*. 2016;5.
96. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992;70(3):431-42.
97. Batzer AG, Rotin D, Urena JM, Skolnik EY, Schlessinger J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14(8):5192-201.
98. Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem*. 1994;269(6):3913-6.
99. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*. 2001;13(11):777-85.
100. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995;80(2):199-211.
101. Mattoon DR, Lamothe B, Lax I, Schlessinger J. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol*. 2004;2:24.
102. Yu J, Wjasow C, Backer JM. Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem*. 1998;273(46):30199-203.
103. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 1997;277(5325):567-70.
104. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.

105. Rotin D, Honegger AM, Margolis BL, Ullrich A, Schlessinger J. Presence of SH2 domains of phospholipase C gamma 1 enhances substrate phosphorylation by increasing the affinity toward the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1992;267(14):9678-83.
106. Dowling CM, Kiely PA. Targeting Protein Kinase C Downstream of Growth Factor and Adhesion Signalling. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1271-91.
107. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 1994;264(5155):95-8.
108. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science.* 1997;277(5332):1630-5.
109. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):876-85.
110. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19(21):2474-88.
111. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature.* 2004;428(6980):332-7.
112. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(12):988-1004.
113. Nishinaka T, Yabe-Nishimura C. EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(2):205-16.
114. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):937-47.
115. Oliva JL, Griner EM, Kazanietz MG. PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors.* 2005;23(4):245-52.
116. Fernandez-Ballester G, Blanes-Mira C, Serrano L. The tryptophan switch: changing ligand-binding specificity from type I to type II in SH3 domains. *J Mol Biol.* 2004;335(2):619-29.
117. Saksela K. HIV-1 Nef and host cell protein kinases. *Front Biosci.* 1997;2:d606-18.
118. Anggono V, Robinson PJ. Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurochem.* 2007;102(3):931-43.
119. Solomaha E, Szeto FL, Yousef MA, Palfrey HC. Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23147-56.
120. Desrochers G, Lussier-Price M, Omichinski JG, Angers A. Multiple Src Homology 3 Binding to the Ubiquitin Ligase Itch Conserved Proline-Rich Region. *Biochemistry.* 2015;54(50):7345-54.

121. Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):75-88.
122. Scaife RM, Margolis RL. The role of the PH domain and SH3 binding domains in dynamin function. *Cell Signal.* 1997;9(6):395-401.
123. Singh M, Jadhav HR, Bhatt T. Dynamin Functions and Ligands: Classical Mechanisms Behind. *Mol Pharmacol.* 2017;91(2):123-34.
124. Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J.* 2005;390(Pt 3):641-53.
125. Rosendale M, Van TNN, Grillo-Bosch D, Sposini S, Claverie L, Gauthereau I, et al. Functional recruitment of dynamin requires multimeric interactions for efficient endocytosis. *Nat Commun.* 2019;10(1):4462.
126. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
127. Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22151-4.
128. Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell.* 2003;14(3):858-70.
129. Peschard P, Park M. Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell.* 2003;3(6):519-23.
130. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):394-8.
131. Huang F, Goh LK, Sorkin A. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):16904-9.
132. Goh LK, Huang F, Kim W, Gygi S, Sorkin A. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 2010;189(5):871-83.
133. Cao M, Milosevic I, Giovedi S, De Camilli P. Upregulation of Parkin in endophilin mutant mice. *J Neurosci.* 2014;34(49):16544-9.
134. Fallon L, Belanger CM, Corera AT, Kontogiannina M, Regan-Klapisz E, Moreau F, et al. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol.* 2006;8(8):834-42.
135. Savio MG, Wollscheid N, Cavallaro E, Algisi V, Di Fiore PP, Sigismund S, et al. USP9X Controls EGFR Fate by Deubiquitinating the Endocytic Adaptor Eps15. *Curr Biol.* 2016;26(2):173-83.
136. Woelk T, Oldrini B, Maspero E, Confalonieri S, Cavallaro E, Di Fiore PP, et al. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1246-54.

137. Baumann C, Lindholm CK, Rimoldi D, Levy F. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *FEBS J.* 2010;277(13):2803-14.
138. Lin Q, Lo CG, Cerione RA, Yang W. The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10134-8.
139. Dergai O, Dergai M, Rynditch A. Ubiquitin-ligase AIP4 controls differential ubiquitination and stability of isoforms of the scaffold protein ITSN1. *FEBS Lett.* 2018;592(13):2259-67.
140. Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, et al. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature.* 2002;416(6879):451-5.
141. Oldham CE, Mohny RP, Miller SL, Hanes RN, O'Bryan JP. The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol.* 2002;12(13):1112-6.
142. Soss SE, Rose KL, Hill S, Jouan S, Chazin WJ. Biochemical and Proteomic Analysis of Ubiquitination of Hsc70 and Hsp70 by the E3 Ligase CHIP. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128240.
143. Sorkin A, Duex JE. Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010;Chapter 15:Unit 15 4.
144. Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* 2014;24(1):26-34.
145. Baldassarre T, Watt K, Truesdell P, Meens J, Schneider MM, Sengupta SK, et al. Endophilin A2 Promotes TNBC Cell Invasion and Tumor Metastasis. *Mol Cancer Res.* 2015;13(6):1044-55.
146. Leonard D, Hayakawa A, Lawe D, Lambright D, Bellve KD, Standley C, et al. Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 20):3445-58.
147. Martin NP, Mohny RP, Dunn S, Das M, Scappini E, O'Bryan JP. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1643-53.
148. Okur MN, Ooi J, Fong CW, Martinez N, Garcia-Dominguez C, Rojas JM, et al. Intersectin 1 enhances Cbl ubiquitylation of epidermal growth factor receptor through regulation of Sprouty2-Cbl interaction. *Mol Cell Biol.* 2012;32(4):817-25.
149. Jiang X, Sorkin A. Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation. *Traffic.* 2003;4(8):529-43.
150. Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16657-61.
151. Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell.* 2003;5(5):709-22.

152. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:437-73.
153. Gross JH, SpringerLink (Service en ligne). *Mass spectrometry : a textbook [texte]*. Berlin ; London: Springer,; 2011. Available from: Dernière édition : <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>.
154. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006;312(5771):212-7.
155. Laflamme C, McKeever PM, Kumar R, Schwartz J, Kolahdouzan M, Chen CX, et al. Implementation of an antibody characterization procedure and application to the major ALS/FTD disease gene C9ORF72. *Elife.* 2019;8.
156. Riling C, Kamadurai H, Kumar S, O'Leary CE, Wu KP, Manion EE, et al. Itch WW Domains Inhibit Its E3 Ubiquitin Ligase Activity by Blocking E2-E3 Ligase Trans-thiolation. *J Biol Chem.* 2015;290(39):23875-87.
157. Lim SK, Lu SY, Kang SA, Tan HJ, Li Z, Adrian Wee ZN, et al. Wnt Signaling Promotes Breast Cancer by Blocking ITCH-Mediated Degradation of YAP/TAZ Transcriptional Coactivator WBP2. *Cancer Res.* 2016;76(21):6278-89.
158. Stark JL, Mehla K, Chaika N, Acton TB, Xiao R, Singh PK, et al. Structure and function of human DnaJ homologue subfamily a member 1 (DNAJA1) and its relationship to pancreatic cancer. *Biochemistry.* 2014;53(8):1360-72.
159. Reuven N, Shanzer M, Shaul Y. Tyrosine phosphorylation of WW proteins. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(3):375-82.
160. Lu J, Qu Y, Liu Y, Jambusaria R, Han Z, Ruthel G, et al. Host IQGAP1 and Ebola virus VP40 interactions facilitate virus-like particle egress. *J Virol.* 2013;87(13):7777-80.
161. Han Z, Sagum CA, Bedford MT, Sidhu SS, Sudol M, Harty RN. ITCH E3 Ubiquitin Ligase Interacts with Ebola Virus VP40 To Regulate Budding. *J Virol.* 2016;90(20):9163-71.
162. Xie T, Pan S, Zheng H, Luo Z, Tembo KM, Jamal M, et al. PEG10 as an oncogene: expression regulatory mechanisms and role in tumor progression. *Cancer Cell Int.* 2018;18:112.
163. Park SH, Jung EH, Kim GY, Kim BC, Lim JH, Woo CH. Itch E3 ubiquitin ligase positively regulates TGF-beta signaling to EMT via Smad7 ubiquitination. *Mol Cells.* 2015;38(1):20-5.
164. Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A. 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.* 2006;281(50):38738-47.
165. Lv M, Shen Y, Yang J, Li S, Wang B, Chen Z, et al. Angiomotin Family Members: Oncogenes or Tumor Suppressors? *Int J Biol Sci.* 2017;13(6):772-81.
166. Wang C, An J, Zhang P, Xu C, Gao K, Wu D, et al. The Nedd4-like ubiquitin E3 ligases target angiomotin/p130 to ubiquitin-dependent degradation. *Biochem J.* 2012;444(2):279-89.

167. Salah Z, Melino G, Aqeilan RI. Negative regulation of the Hippo pathway by E3 ubiquitin ligase ITCH is sufficient to promote tumorigenicity. *Cancer Res.* 2011;71(5):2010-20.
168. Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu CY, Lei Q, et al. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 2011;25(1):51-63.
169. Hooper C, Puttamadappa SS, Loring Z, Shekhtman A, Bakowska JC. Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets. *BMC Biol.* 2010;8:72.
170. Bakowska JC, Jupille H, Fatheddin P, Puertollano R, Blackstone C. Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Mol Biol Cell.* 2007;18(5):1683-92.
171. Venuprasad K. Cbl-b and itch: key regulators of peripheral T-cell tolerance. *Cancer Res.* 2010;70(8):3009-12.
172. Johnson DR. Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. *J Immunol.* 2003;170(4):1894-902.
173. Li J, Wang J, Hou W, Jing Z, Tian C, Han Y, et al. Phosphorylation of Ataxin-10 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *Cell Cycle.* 2011;10(17):2946-58.
174. Qin L, Guo J, Zheng Q, Zhang H. BAG2 structure, function and involvement in disease. *Cell Mol Biol Lett.* 2016;21:18.
175. Anindya R, Aygun O, Svejstrup JQ. Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell.* 2007;28(3):386-97.
176. Caron P, Pankotai T, Wiegant WW, Tollenaere MAX, Furst A, Bonhomme C, et al. WWP2 ubiquitylates RNA polymerase II for DNA-PK-dependent transcription arrest and repair at DNA breaks. *Genes Dev.* 2019;33(11-12):684-704.
177. Gittings LM, Foti SC, Benson BC, Gami-Patel P, Isaacs AM, Lashley T. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins R and Q accumulate in pathological inclusions in FTLD-FUS. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):18.
178. Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(1):43-61.
179. Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29374-85.
180. Lotsch D, Steiner E, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Hlavaty J, et al. Major vault protein supports glioblastoma survival and migration by upregulating the EGFR/PI3K signalling axis. *Oncotarget.* 2013;4(11):1904-18.

181. Blokhuis AM, Koppers M, Groen EJM, van den Heuvel DMA, Dini Modigliani S, Anink JJ, et al. Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways. *Acta Neuropathol.* 2016;132(2):175-96.
182. Wolf DH, Stolz A. The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(1):117-24.
183. McEwan WA, Falcon B, Vaysburd M, Clift D, Oblak AL, Ghetti B, et al. Cytosolic Fc receptor TRIM21 inhibits seeded tau aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(3):574-9.
184. Shahheydari H, Ragagnin A, Walker AK, Toth RP, Vidal M, Jagaraj CJ, et al. Protein Quality Control and the Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia Continuum. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:119.
185. Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature.* 2013;495(7442):467-73.
186. Fujita H, Iwabu Y, Tokunaga K, Tanaka Y. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 13):2798-809.
187. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8(5):215.
188. Guo N, Templeton NS, Al-Barazi H, Cashel JA, Sipes JM, Krutzsch HC, et al. Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60(2):457-66.
189. Huang C. Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr.* 2010;4(1):10-8.
190. Chaudhary N, Maddika S. WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and DeltaNp73 levels. *Mol Cell Biol.* 2014;34(19):3754-64.



Molecular basis of interactions between SH3 domain-containing proteins and the proline-rich region of the ubiquitin ligase Itch

Received for publication, August 25, 2016, and in revised form, February 7, 2017. Published, JBC Papers in Press, February 24, 2017, DOI 10.1074/jbc.M116.754440

Guillaume Desrochers^{†1}, Laurent Cappadocia[§], Mathieu Lussier-Price[§], Anh-Tien Ton[§], Riham Ayoubi[†], Adrian Serohijos[§], James G. Omichinski[§], and Annie Angers^{†2}

From the Departments of [†]Biological Sciences and [§]Biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Edited by Thomas Söllner

The ligase Itch plays major roles in signaling pathways by inducing ubiquitylation-dependent degradation of several substrates. Substrate recognition and binding are critical for the regulation of this reaction. Like closely related ligases, Itch can interact with proteins containing a PPXY motif via its WW domains. In addition to these WW domains, Itch possesses a proline-rich region (PRR) that has been shown to interact with several Src homology 3 (SH3) domain-containing proteins. We have previously established that despite the apparent surface uniformity and conserved fold of SH3 domains, they display different binding mechanisms and affinities for their interaction with the PRR of Itch. Here, we attempt to determine the molecular bases underlying the wide range of binding properties of the Itch PRR. Using pull-down assays combined with mass spectrometry analysis, we show that the Itch PRR preferentially forms complexes with endophilins, amphiphysins, and pacsins but can also target a variety of other SH3 domain-containing proteins. In addition, we map the binding sites of these proteins using a combination of PRR sub-sequences and mutants. We find that different SH3 domains target distinct proline-rich sequences overlapping significantly. We also structurally analyze these protein complexes using crystallography and molecular modeling. These structures depict the position of Itch PRR engaged in a 1:2 protein complex with β -PIX and a 1:1 complex with the other SH3 domain-containing proteins. Taken together, these results reveal the binding preferences of the Itch PRR toward its most common SH3 domain-containing partners and demonstrate that the PRR region is sufficient for binding.

The C2-WW-HECT (CWH)³ family ubiquitin ligases are involved in major signaling pathways that regulate cell growth

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Grant 288238 (to A. A.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The atomic coordinates and structure factors (code 5SXP) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

¹ Supported in part by a scholarship for doctoral studies granted by the Fonds de Recherche Nature et Technologies (FQRNT).

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Tel.: 514-343-7012; Fax: 514-343-2293; E-mail: annie.angers@umontreal.ca.

³ The abbreviations used are: CWH, C2-WW-HECT; IRTKS, insulin receptor tyrosine kinase substrate; ITC, isothermal titration calorimetry; PRR, pro-

line-rich region; SH3, Src homology 3; RMSD, root mean square deviation; MD, molecular dynamics; TEV, tobacco etch virus; PDB, Protein Data Bank and proliferation (1). Nedd4 and Itch are well-known members of the family that regulate T-cell activation and effector differentiation (2). To ubiquitylate their substrates, CWH ligases must first establish a direct contact with them. This is done via the interaction of their WW domains with short PPXY motifs present in the substrate (3, 4). Unlike other members of the CWH family, Itch possesses a conserved proline-rich region (PRR) in a non-conserved linker region located between the N-terminal C2 domain and the WW domains common to the other ligases of the family. This PRR is composed of 20 amino acids and is essential for Itch interaction with SH3 domain-containing proteins (5, 6).

SH3 domains are well-characterized protein-interaction modules composed of roughly 60 amino acids with a conserved fold that are often found in proteins involved in signaling, endocytosis, and trafficking. The Itch PRR is targeted by several of these SH3 domain-containing proteins, and this typically induces ubiquitylation of these binding partners by Itch (5, 7–10). A notable exception to this rule is β -PIX, which was not readily ubiquitylated by Itch (8).

Despite the functional characterization of interactions involving the Itch PRR and several SH3 domain-containing proteins, very little is known about the selectivity and strength of these interactions. The conserved fold of SH3 domains generally exposes key aromatic residues and a proline on the surface, which form hydrophobic pockets required for interactions with the core PXXP sequence (Fig. 1). An additional specificity pocket, defined by negatively charged residues in the RT loop of the SH3 domain, completes the binding motif by forming interactions with a positively charged residue outside the proline core. The relative position of this positively charged residue defines the orientation of the typical class I (+XXPPX) and class II (PXXPX+) ligands. Itch PRR consists of a compact succession of three class II binding motifs and one class I binding motif that are partially overlapping (8). Isothermal titration calorimetry (ITC) studies showed that the Itch PRR forms classical complexes with a 1:1 protein ratio with several SH3 domain-containing proteins. In the same set of experiments, it was shown that the Itch PRR can also interact simultaneously with two SH3 domains either from two different molecules in the

line-rich region; SH3, Src homology 3; RMSD, root mean square deviation; MD, molecular dynamics; TEV, tobacco etch virus; PDB, Protein Data Bank.

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

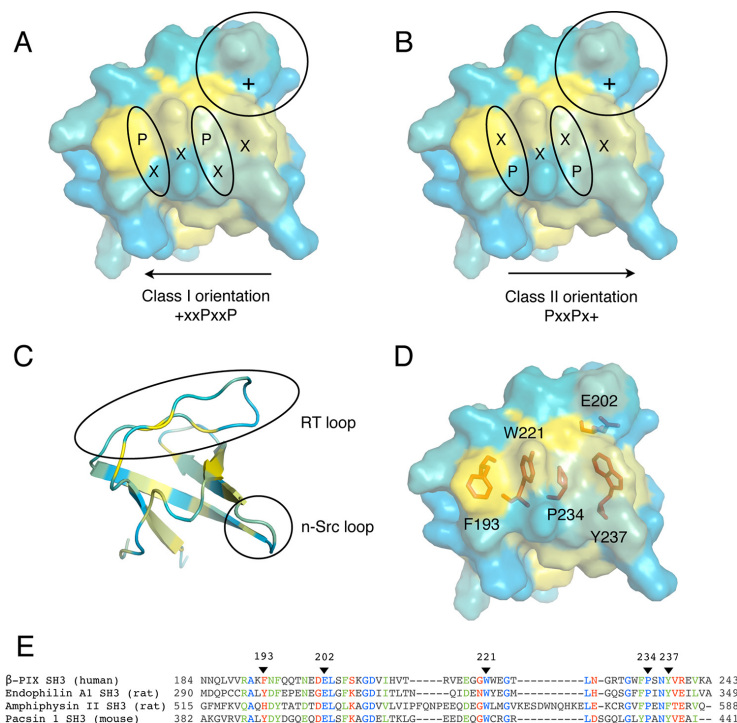


Figure 1. Representation of a typical SH3 domain interacting with canonical class I and II peptides. A–D, the SH3 domain of β-PIX (SH3^β of the present study) is represented in the same orientation and colored according to a hydrophobicity scale (yellow for hydrophobic). The surface representation reveals the position of the specificity pocket (circle) and hydrophobic pockets (oval shape) accommodating the proline residues of a peptide binding either in a class I (A) or class II orientation (B). C, the SH3^β domain of β-PIX is shown in a schematic representation to indicate the position of the n-Src and RT loops. D, the SH3^β domain of β-PIX is represented as in A with key residues at the binding interface represented as red sticks. E, alignment of a subset of SH3 domains known to interact with the PRR of Itch performed with T-Coffee (8, 45). Residues are numbered according to the full-length human protein sequences. Fully conserved residues, residues with strongly similar properties, and residues with weakly similar properties are colored blue, green, and red, respectively. Arrowheads indicate the position of the residues represented as sticks in D.

case of β-PIX (8) or from a single protein in the case of Grb2.⁴ Thus, the PRR of Itch is employing at least two different mechanisms of binding with distinct stoichiometries to recognize SH3 domains. Although the overall structure and amino acid composition of SH3 domains are highly conserved, subtle variations can lead to drastic changes in their binding properties (11). Previous studies have also demonstrated that the affinity of the Itch PRR toward SH3 domains varies greatly and that it has a clear preference for endophilin. Interestingly, the dissociation constant reported for the endophilin-Itch complex places it among the strongest SH3-PRR affinities reported to date. However, the specific residues and the molecular basis of Itch PRR targeting these different SH3 domains remain to be elucidated. Here, we map the binding sites on the SH3 domain-containing proteins most frequently found in complex with the Itch PRR and find that they recognize distinct yet overlapping sites within the Itch PRR. We also solve the structure of the simultaneous interaction between Itch PRR and two β-PIX

⁴ G. Desrochers, M. Lussier-Price, J. G. Omichinski, and A. Angers, unpublished observations.

SH3s. This structure was then used as a template for the molecular modeling of SH3-binding interfaces between Itch PRR and other SH3 domain-containing proteins. Together, these results reveal the binding preferences of the Itch PRR toward several of its SH3 domain-containing partners.

Results

SH3 domain-containing proteins binding to Itch PRR

The Itch PRR contains a variety of potential binding sites for SH3 domains, and it has been shown to interact with several different proteins (7–10). To further evaluate the capacity of the Itch PRR to interact with SH3 domain-containing proteins, we performed a pull-down assay with GST-fused PRR peptides on rat brain extracts and analyzed the bound proteins using mass spectrometry. All of the SH3 domain-containing proteins that bound to the Itch PRR are compiled in Table 1. Most of the previously known binding partners of the Itch PRR were identified, except for β-PIX, CIN85, and STAM-1 (9, 10). In addition, several peptide fragments from spectrin α, endophilin A1–3, pacsin 1, and amphiphysin I/II were found in the bound fraction. In agreement with its high affinity for the Itch PRR, a

Table 1
SH3 domain-containing proteins interacting with Itch PRR identified by mass spectrometry

Identity	Ensembl	Total spectra	Unique peptide	%/‰ ^a	Mass
GST-Itch PRR (residues 249–269), upper gel^b					kDa
Endophilin A1	ENSP00000369981	560	46	64/100	39.9
Spectrin α	ENSP00000361824	46	36	18/22	284.9
Endophilin A2	ENSP00000269886	45	13	36/51	41.5
Endophilin A3	ENSP00000391372	18	6	10/14	39.3
Amphiphysin II	ENSP00000365281	7	5	19/26	47.5
Pacsin 1	ENSP00000244458	2	2	5.9/8	50.9
Endophilin B2	ENSP00000361645	1	1	3.0/5	43.9
SNX18	ENSP00000317332	1	1	1.8/3	68.9
v-Src	ENSP00000362680	1	1	1.3/2	59.8
GST-Itch PRR (residues 249–269), lower gel^b					
Endophilin A1	ENSP00000369981	138	18	45/72	39.9
Endophilin A2	ENSP00000269886	18	5	20/28	41.5
Grb2	ENSP00000376347	12	5	29/32	25.2
GST-Itch PRR (residues 224–276), upper gel^b					
Endophilin A1	ENSP00000369981	348	33	60/96	39.9
Endophilin A2	ENSP00000269886	44	17	36/52	41.5
Spectrin α	ENSP00000361824	41	34	19/24	284.9
Amphiphysin I	ENSP00000317441	18	11	22/39	71.9
Endophilin A3	ENSP00000391372	17	9	24/33	39.3
Pacsin 1	ENSP00000244458	6	6	19/26	50.9
Cortactin	ENSP00000317189	5	3	9.4/17	57.4
v-Src	ENSP00000362680	3	2	5.4/8	59.8
LASP1	ENSP00000325240	3	2	11/15	29.7
DBNL	ENSP00000411701	2	2	10/16	48.2
Pacsin 2	ENSP00000263246	2	2	5.1/9	55.7
SNX18	ENSP00000317332	2	1	1.4/2	68.9
CD2AP	ENSP00000352264	1	1	3.1/4	71.4
SNX9	ENSP00000376024	1	1	2.2/4	66.5
STAC	ENSP00000273183	1	1	4.0/5	44.5

^a The amino acid coverage of the protein in this assignment/the coverage corrected for peptide sequences that are unlikely to be observed using normal proteomics methods.^b Data were analyzed with the human genome using the Global Proteome Machine Organization (28).

vast majority of spectra identified by MS/MS were matched to endophilin A1. Most of the other proteins detected by mass spectrometry were only represented by a limited number of peptide fragments. Nevertheless, among these proteins, we find several previously reported binding partners for Itch PRR as well as newly identified binding proteins including spectrin α , Src, cortactin, LASP1, DBNL, CD2AP, and STAC. Interestingly, all of these potential new partners of Itch are linked to the organization of the cytoskeleton, pointing to a possible new and unexplored role for Itch.

Molecular dissection of Itch PRR-mediated interactions

To determine the critical motifs within the Itch PRR required for the binding to the different SH3 domain-containing proteins, we constructed a series of overlapping peptides covering the Itch PRR in fusion with GST (Fig. 2A). These fusion proteins were used in pulldown assays with rat brain extracts (Fig. 2B, top) or with extracts from transfected HEK-293T cells (Fig. 2B, bottom) to determine the interaction with endophilin, pacsin, amphiphysin, and β -PIX. In these experiments, the anti-endophilin immunoblots revealed that this protein interacts with the first half of the Itch PRR, which contains two overlapping class II SH3-binding sites (peptide 249–259). endophilin was found to bind peptides minimally containing a RPPRPSR motif (residues 252–258). Removing the first residues of this class II motif (peptide 255–264) greatly impaired binding to endophilin. Interestingly, the class I and the most C-terminal class II motifs alone (peptide

257–266) did not bind to endophilin. In these experiments, the antibody used to detect endophilin recognizes endophilin A1, A2, and A3. Endophilin A1 and A3 have the same molecular mass (40 kDa) and cannot be distinguished. Because endophilin A1 is much more abundant, it is probably responsible for most of the signal observed on the blots. Only endophilin A2 is expressed in HEK-293T cells, and its higher molecular mass (45 kDa) also enables its detection in rat brain extracts. Both endophilin A1 and A2 have the same binding preferences toward GST-Itch PRR constructs.

Using a similar pulldown assay, we next evaluated amphiphysin binding to the Itch PRR. The anti-amphiphysin antibody used in these assays recognized both amphiphysin I and II and revealed that amphiphysin II was pulled down more efficiently than amphiphysin I relative to their respective expression levels in rat brain tissues. Despite this difference, both isoforms showed similar binding preferences. Like endophilin, the amphiphysins bind exclusively to sequences encompassing the first half of the Itch PRR containing the two overlapping class II motifs (peptide 249–259). In contrast to endophilin, amphiphysin binding does not tolerate any truncation of these class II motifs because binding was completely lost when peptides were truncated at both the N and C terminus (peptides 255–264) (Fig. 2B). Thus, both motifs were required for the interaction with amphiphysin, whereas a single intact class II motif could partially pull down endophilin.

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

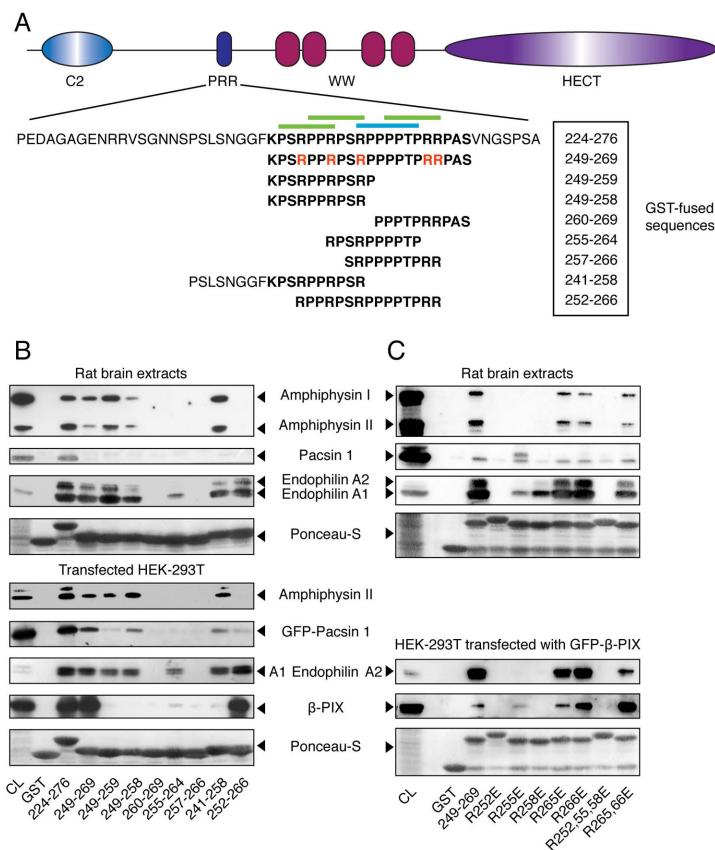


Figure 2. Binding preferences of the SH3 domains of amphiphysin, pacsin, endophilin, and β -PIX toward the PRR of Itch. *A*, schematic representation of the Itch protein highlighting the sequence of the full-length PRR (**boldface type**) as well as the specific sub-sequences used in these studies. Arginine residues mutated to glutamic acid in the context of the 249–269 peptide are indicated in *red*. Canonical class I and II binding sites are indicated by *blue* and *green* overbars, respectively. *B*, rat brain extracts were incubated with the indicated GST-PRR fusions bound to GSH resin. Immunoblots of bound proteins eluted from the resin were performed with anti-amphiphysin, anti-pan-endophilin, and anti-pacsin 1 antibodies to show their content, and 5% of the cell lysates served as a control (CL) (*top panels*). Extracts from HEK-293T cells transfected with the indicated constructs were incubated with the same GST fusions bound to GSH resin. The immunoblots of bound proteins eluted from the resin were performed with anti-amphiphysin, anti-GFP (GFP-pacsin 1 and GFP-endophilin A1), or anti-FLAG (FLAG- β -PIX). Immunoblots were performed on 5% of cell lysates (CL) to determine protein overexpression levels (*bottom panels*). *C*, rat brain extracts were incubated with the indicated GST-PRR mutant bound to GSH resin. The immunoblots of the bound proteins eluted from the resin were performed as in *B* to determine endogenous protein expression in 10% of cell lysates (CL) and their recovery in the pull-down assay (*top panels*). Extracts from HEK-293T cells overexpressing GFP- β -PIX were incubated with the GST-PRR mutants bound to GSH resin. The immunoblots of bound proteins eluted from the resin were performed with anti-pan-endophilin or anti-GFP to measure the quantities of endogenous endophilin and transfected GFP- β -PIX recovered from the same cell lysate (*bottom panels*).

The determination of the pacsin-binding site on the Itch PRR was more difficult to define due to its lower recovery in the pull-down assay (Fig. 2*B*). When overexpressed in HEK-293T cells, pacsin binding was readily detected, and it displays a binding pattern very similar to endophilin and amphiphysin, because the three proteins bind to constructs containing the first two class II motifs (peptide 249–259) of the Itch PRR (Fig. 2*B*). Like amphiphysin, pacsin binding was disrupted by truncation of either of the two class II motifs, but it still bound to a peptide containing the second class II motif, indicating that this motif contributes more to the interaction.

In contrast, the binding site for β -PIX is more extended than the other proteins tested, because none of the shorter Itch PRR constructs bind efficiently to β -PIX. The immunoblot performed with resin incubated with overexpressed β -PIX indicates that the only significant recovery occurred with the peptide 252–266, suggesting that this SH3 domain recognizes the class I motif and possibly part of the class II motifs flanking it in the Itch PRR (Fig. 2*B*). This result is consistent with previous experiments and demonstrates that the β -PIX interaction with Itch involves a different binding mode (9).

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

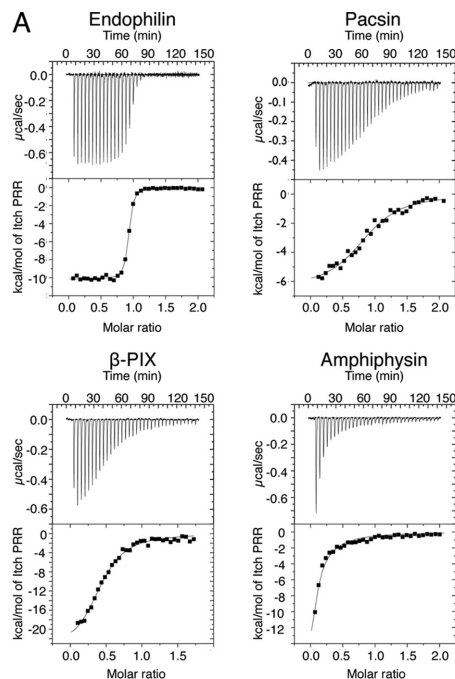
To further evaluate the binding preferences of the SH3 domain-containing proteins, we mutated several arginine residues to glutamic acid in the GST-FLAG-fused PRR of Itch (peptide 249–269) and performed pulldown studies with rat brain extracts (Fig. 2C). In agreement with results obtained with the PRR sub-sequences, the mutation analysis indicates that the first three arginine residues contained in the two overlapping class II motifs of the PRR play a key role in the binding to the four SH3 domains tested here. Interestingly, there were differences in the contribution of each of the first three arginines to the binding of the different SH3s. Whereas the R252E mutant abolishes the interaction with all of the SH3 domains tested under our experimental conditions, the R255E mutant retains partial binding toward endophilin A1 and β -PIX and appears to bind pacsin almost as efficiently as the WT sequence. In contrast, Arg-255 was required for the interaction of the Itch PRR with the SH3 domains of amphiphysin and endophilin A2. In turn, the R258E mutation only partially impairs binding of endophilin A1 but completely abolishes the interaction with endophilin A2, pacsin, β -PIX, and amphiphysin I and II. The R265E or R266E mutants, located exclusively within the last class II SH3-binding site, had no significant impact on its interaction with the SH3 domain-containing proteins. However, the combined R265E/R266E mutation slightly impairs binding to endophilin A1 and A2. Taken together, these results indicate that despite the fact that the preferred binding sites of these SH3 domain-containing proteins are overlapping, they target distinct residues within the PRR of Itch.

Residues located outside the proline-rich core do not contribute to the binding of SH3 domain-containing proteins

The pulldown experiments shown in Fig. 2B indicate that the SH3 domain of pacsin does not fully recognize the 249–269 peptide, suggesting that residues flanking the PRR contribute to the binding of some SH3 domains to Itch. We have previously reported that pacsin binding to the Itch PRR displayed a binding affinity comparable with that of β -PIX but much lower than that of endophilin. To determine whether residues outside the PRR contributed to the binding, we repeated the ITC experiments with the shorter sequence (peptide 249–269) and compared the binding affinity with that of a longer sequence (peptide 224–276) used previously (8). Thermograms for binding to the SH3 domain of endophilin, pacsin, β -PIX, and amphiphysin (Fig. 3A) indicate similar binding affinities for the 249–269 peptide and the longer 224–276 peptide (Fig. 3B). The binding region for the SH3 domains thus lies entirely within the core PRR sequence for endophilin, pacsin, and β -PIX. As reported previously, it was not possible to fit a saturation curve on thermograms obtained with amphiphysin, although significant heat dispersion was observed.

Crystal structure of the complex formed between β -PIX and Itch PRR reveals a super-SH3

We have shown that different SH3 domain-containing proteins target overlapping sequences within the Itch PRR. To further understand the difference in target recognition at the molecular level, we attempted to crystallize complexes formed by the Itch PRR (peptide 249–269) and the SH3 domains of endophilin, amphiphysin, pacsin, or β -PIX, but we only suc-



B

	Peptide 249-269		Peptide 224-276 Desrochers et al, 2015	
	K_D	$N^{(a)}$	K_D	$N^{(a)}$
Endophilin	33.16 ± 1.86 nM	0.96 ± 0.07	45.74 ± 2.66 nM	0.95 ± 0.02
Pacsin	3.80 ± 0.74 μ M	0.98 ± 0.11	4.33 ± 0.13 μ M	0.96 ± 0.01
β -PIX	1.59 ± 0.39 μ M	0.43 ± 0.03	1.44 ± 0.04 μ M	0.49 ± 0.02
Amphiphysin	NQ	NQ	NQ	NQ

^(a) Stoichiometry
NQ: Not quantifiable

Figure 3. Representative ITC thermograms obtained by the successive addition of Itch PRR to a subset of SH3 domains. A, representative results obtained by ITC for the binding of the 249–269 peptide to the SH3 domain of endophilin, pacsin, β -PIX, and amphiphysin. B, the calculated dissociation constant (K_D) and stoichiometries (N) are compiled with results obtained previously using a longer 224–276 peptide (8).

ceeded in obtaining crystals of the Itch PRR and β -PIX SH3 complex. These crystals belong to the P1 space group, diffract to 1.65 Å resolution (Table 2), and contain four copies of the β -PIX SH3 domain and two copies of the Itch PRR in their unit cell (Fig. 4A). The proteins arrange to form two “super-SH3” domains, which are atypical SH3-PRR associations in which a single PRR simultaneously engages two SH3 domains (12). Each

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

Table 2
Crystallographic data collection and refinement statistics
Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

Data collection	
Beamline	X25, NSLS
Wavelength (Å)	1.1
Space group	P1
Unit-cell parameters	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	28.85, 43.45, 61.48,
α , β , γ (degrees)	90.37, 101.01, 105.25
Resolution (Å)	30.12–1.55 (1.605–1.55)
No. of unique reflections	32,525 (4639)
Multiplicity	1.8 (1.8)
Completeness (%)	95.7 (93.2)
R_{merge}	0.021 (0.069)
$I/\sigma(I)$	18.2 (6.9)
Refinement statistics	
Resolution (Å)	50–1.65 (1.71–1.65)
Reflections (total/test) ^a	32,519/1390
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	13.89/16.13 (14.15/18.16)
No. of atoms (excluding hydrogens)	
Protein	2321
Water	383
<i>B</i> factors	
Protein	19.10
Water	17.94
RMSDs	
Bond lengths (Å)	0.004
Bond angles (degrees)	0.71
Ramachandran ^b	
Favored (%)	98.9
Allowed (%)	1.1
Outliers (%)	0
Clashscore	2.20

^a Reflections with $F_0 > 0$.

^b MolProbity analysis.

of these super-SH3 complexes thus contains two molecules of β -PIX (hereafter referred to as SH3' and SH3''; Figs. 4–10) and one Itch PRR. The two super-SH3 domains are very similar to each other, as evidenced by an RMSD of 0.7 Å for 138 matched C α , and are related to each other by a 2-fold screw axis non-crystallographic symmetry (Fig. 4B). Within each super-SH3, the PRR peptide is sandwiched between two β -PIX SH3 domains that are related to each other by 2-fold non-crystallographic symmetry. This super-SH3 arrangement is closely related to the one observed for cortactin in complex with an AMAP1 peptide (13) that also exhibits a 2-fold non-crystallographic symmetry between the cortactin SH3 domains (Fig. 5). The super-SH3 arrangement of β -PIX is stabilized by hydrophobic contacts and a rich network of water-mediated bonds contributed by the RT loops of the symmetry-related SH3 domains (Fig. 6, A and B). This water network is stabilized at one end by Arg-258 from the Itch PRR, which also interacts with SH3'' Glu-202 and SH3' Tyr-237 (Figs. 6 (C and D) and 7).

The Itch PRR interacts as an atypical class II ligand with SH3' by burying 374–384 Å² of accessible surface area, whereas it interacts as a class I ligand with SH3'' by burying 615–654 Å² of accessible surface area. This particular arrangement is enabled by a pseudo-palindrome in the recognition sequence: ²⁵⁸RPPP*PTPR²⁶⁵, where the asterisk denotes the center of the palindrome that coincides with the 2-fold symmetry center of the two SH3 domains. The conformation of the two Itch PRR and SH3'' complexes present in the unit cell is very similar to a previously reported 1:1 complex (9) with RMSDs of 0.4 and 0.7 Å for 66 matched C α . As observed previously, the face of SH3' containing the key aromatic/hydrophobic residues binds the RXXPPX sequence from residue 258 to 264, and an additional face of the SH3'' extends the binding interface to accommodate

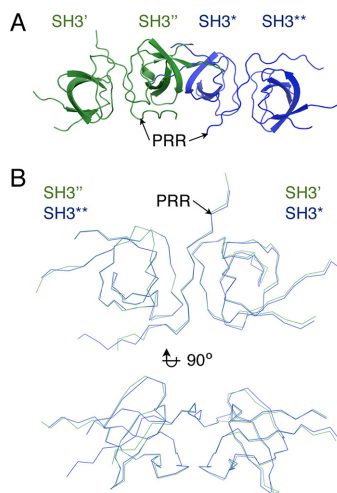


Figure 4. Representation and comparison of the two β -PIX-Itch PRR super-SH3 complexes found in the crystal lattice (PDB code 55XP). A, schematic representation of the two super-SH3 domains in the crystal lattice. B, superposition of the two β -PIX-Itch PRR complexes (ribbon).

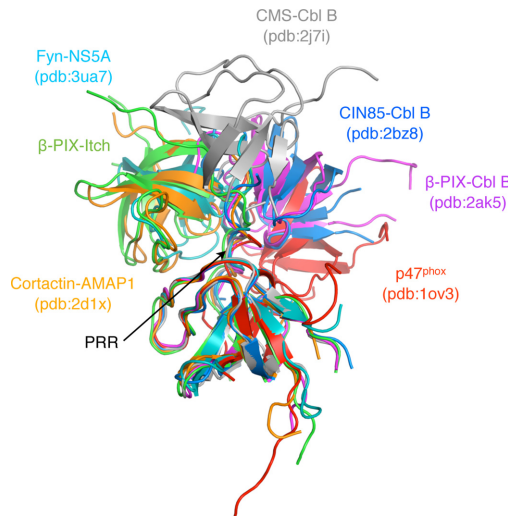


Figure 5. Comparison of the β -PIX-Itch PRR super-SH3 complex with other known complexes. Various SH3 structures were aligned to the β -PIX SH3' domain to reveal the position of the second SH3 domain according to other known complexes. The structural alignment and schematic representation were done using PyMOL (Schrödinger) (12, 13, 21, 22, 46).

the 252–257 sequence N-terminal to the class I ligand (9). Strikingly, despite also having reported a 1:2 Itch PRR/ β -PIX stoichiometry *in vitro*, the structure presented by Janz *et al.* (9) does not adopt a super-SH3 arrangement, and it notably lacks the interaction between PRR and SH3'. In the structure presented here, the face of SH3' containing the key aromatic/hydrophobic

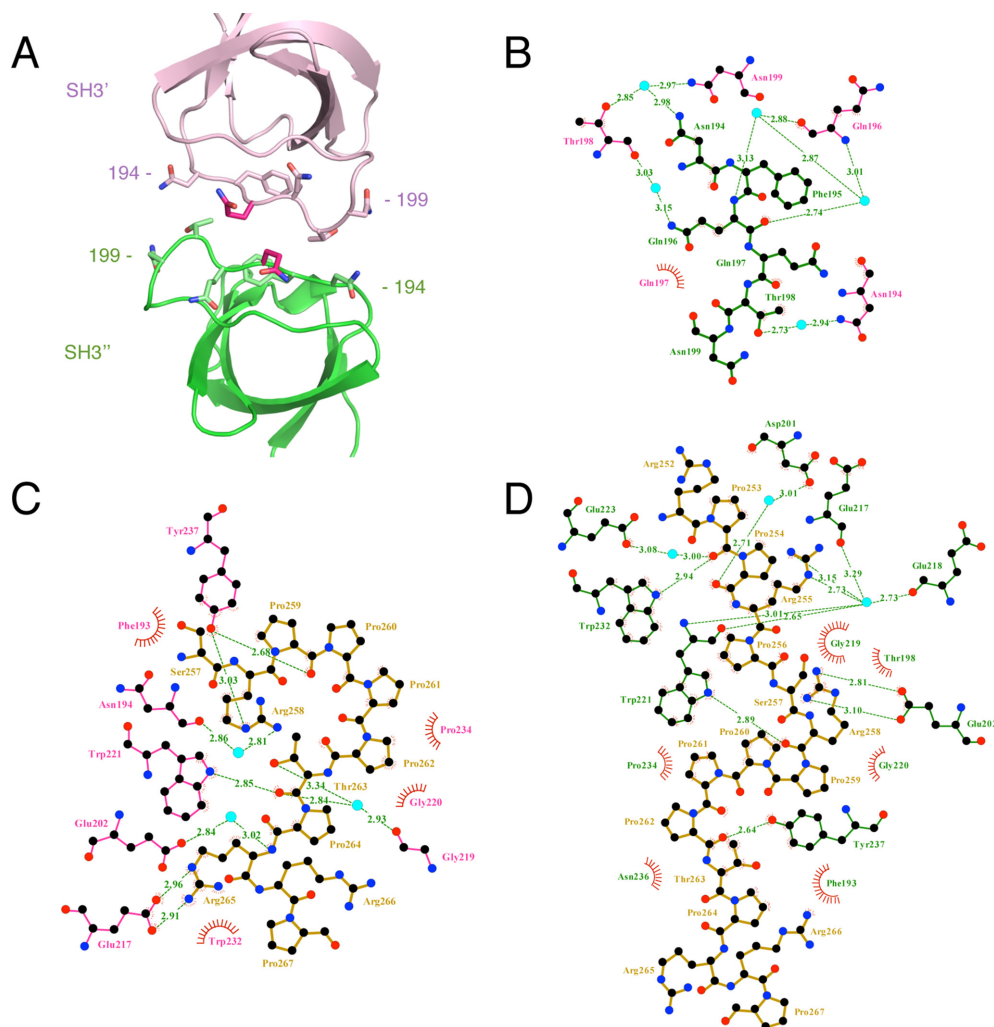


Figure 6. LigPlot+ representation of the SH3-SH3 domain contacts and PRR-SH3 interactions within the super-SH3 complex β -PIX-Itch PRR (PDB code 5SXP). A, schematic representation of the β -PIX SH3 domains facing each other as in the super-SH3 structure with residues 194–199 of the SH3' represented as purple sticks and their corresponding SH3'' residues in green. B, LigPlot+ analysis of the SH3'-SH3'' interactions (35, 36). Hydrophobic contacts are represented by red half-circles. Cyan spheres represent water molecules establishing a water-mediated bond between both SH3 domains. Hydrogen bonds and their length are displayed in green. Residues of the SH3' and SH3'' domains are labeled in pink and green, respectively. Interactions between the Itch PRR (dark yellow) and β -PIX SH3' (C) or SH3'' (D) were generated by Ligplot+ as in B.

residues binds a PXXPPXR sequence (residues 259–265). The prolines of this motif are exposed and oriented as a class II ligand. However, Arg-265 is positioned one amino acid farther than the canonical motif and interacts with a residue of the n-Src loop (Glu-217) instead of a classical interaction established with the RT loop (Figs. 6 (C and D) and 7). In contrast to what is observed with the SH3'' domain, the second face of the SH3' is not involved in the binding of Itch PRR. The absence of an extended binding interface in the case of SH3' is the main

reason for the difference in buried accessible area between the SH3' and SH3'' domains upon binding to the Itch PRR. Taken together, these results suggest that a pseudo-palindromic sequence in Itch PRR allows for the recognition of two β -PIX molecules in a symmetric super-SH3 configuration.

Modeling of Itch PRR interaction with SH3 domains

Because we were unable to grow crystals with the other SH3 domains, we used the structure of the β -PIX complex to model

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

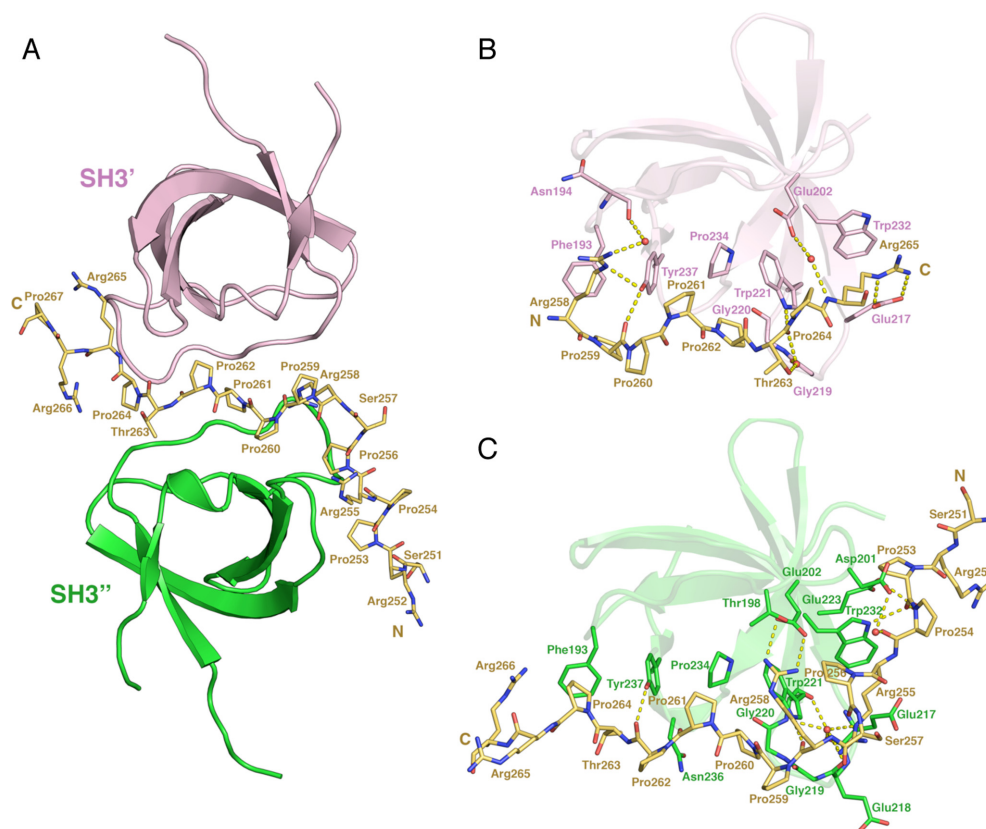


Figure 7. Crystal structure of the super-SH3 interaction between the PRR of Itch and two β -PIX SH3 domains (PDB code 5SXP). A, schematic representation of the β -PIX SH3 domains. SH3' and SH3'' correspond to chain D and B, respectively, present in the crystal structure. The PRR-containing peptide is represented as yellow sticks. B and C, detailed view of each SH3 domain interacting with the Itch PRR. SH3 residues contributing to the binding or Itch PRR were identified with LigPlot+ and are represented as sticks (35, 36). Water molecules contributing to the binding of the Itch PRR to the SH3 domains of β -PIX are represented as red spheres, and hydrogen bonds are shown as a dashed yellow line.

their binding to the Itch PRR. For those modeling studies, we used the FlexPepDock protocol implemented with Rosetta (14, 15). The models obtained depict a potential structure for the Itch PRR in complex with each of these SH3 domains according to the binding preferences determined in the pulldown experiments (Fig. 8). The SH3 domain of endophilin would interact with the prolines 253 and 256, whereas pacsin and amphiphysin would target prolines 250 and 253. These complexes all require the participation of the first three arginines of the Itch PRR contacting the main interface of the SH3 domain. According to these models and the pulldown assays, the SH3 domain of endophilin was the only one that targets the first canonical class II binding site, whereas pacsin and amphiphysin bind to the second site (Fig. 8). Depending on its position and orientation, the PRR of Itch can thus accommodate SH3 domains in a variety of conformations, where it forms similar yet distinct molecular complexes.

The three complexes modeled from the Itch PRR in complex with β -PIX-SH3' were each submitted to 25-ns produc-

tion runs. All three systems stabilized after 5 ns (Fig. 9A). The complex with endophilin reached a higher RMSD of 4.03 Å, amphiphysin reached an RMSD of 2.08 Å, and pacsin reached a lower RMSD of 1.49 Å. The high RMSD observed in the endophilin complex can be explained by the fluctuations of the Itch peptide bound to the protein during the simulations (Fig. 9C) and movements in the C terminus end of the protein (Figs. 9B and 10A), which is displaced compared with its initial coordinates. The lowest RMSD complex, pacsin, has a relatively close alignment with its pre-MD structure (Fig. 10B). Frames from each production run were clustered with the GROMOS method. The centroid of the most populated cluster was used as the representative structure. Total energy analysis of the three complexes shows high energetic stability throughout the duration of the simulations, each of the run reaching an energetic plateau and maintaining it. The stability observed in both the RMSD cal-

Downloaded from <http://www.jbc.org/> by guest on July 19, 2020

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

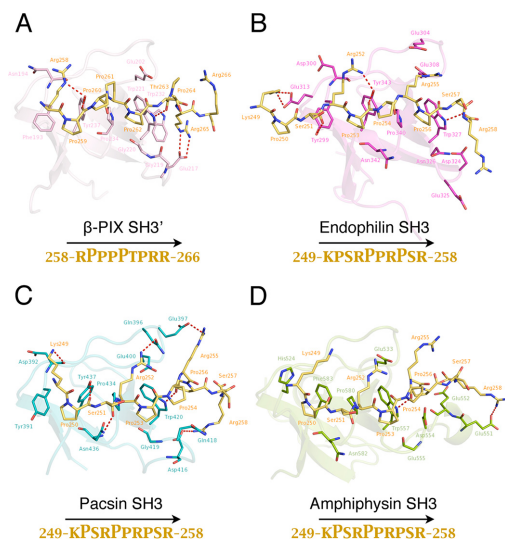


Figure 8. Modeling of the interactions of Itch PRR with different SH3 domains. The FlexPepDock protocol was performed using the structure of the β -PIX SH3' in complex with Itch PRR (PDB code 5SXP) (A) (14, 15). In this complex, the prolines are oriented as a class II ligand and were used as a template to align the various binding sequences determined in our pull-down assays. The binding interface between Itch PRR and these SH3 domains was modeled as detailed under "Experimental procedures." The complex formed between Itch PRR and β -PIX SH3' (A) is shown here as a comparison with the models obtained (B–D). The sequence KPSRPPRPSR (peptide 249–258) of the ubiquitin ligase Itch (green sticks, darker arginines) interacts with the SH3 domains of endophilin (B), pacsin (C), and amphiphysin (D). The structures depict a schematic representation of the SH3 domains, with residues establishing either hydrophobic contacts or hydrogen bonds (dashed red line) displayed as sticks. Yellow sticks represent the Itch PRR. The interacting residues were defined using LigPlot+ (35, 36). The peptide orientation as well as prolines forming the core PXXP motifs are identified below the model.

culations and the total energy analysis reveal that the three complexes formed by Itch PRR and its respective protein model are stable.

Discussion

Proline-rich regions often consist of a succession of potential SH3-binding sites within a sequence that can cover >100 amino acids. These highly flexible binding modules enable the interaction with multiple SH3 domain-containing proteins, which are often found in large protein complexes established during endocytosis and cell signaling. The endocytic proteins dynamin and synaptojanin are classic examples of proteins that contain a complex PRR. Mapping their SH3-binding sequences revealed that some binding partners interact with overlapping motifs, whereas others were found to bind distinct sites separated by several residues. The ubiquitin ligase Itch shares some of the SH3-binding partners identified for dynamin and synaptojanin, including endophilin, pacsin, amphiphysin, and Grb2 (16–19), but it forms an interaction using a single compact PRR that contains three overlapping class II motifs and one class I motif. A similar PRR organization can be found in the srGAP3 protein, which contains a short peptide encoding an overlap-

ping class I and II motif, and a single PXXP motif within the peptide was found to be sufficient for its interaction with several SH3 domain-containing proteins (20). Interestingly, the key binding partners of srGAP3 identified by mass spectrometry were the same as those found here for the Itch PRR, although their PRRs differ considerably in terms of potential binding sites. ITC analysis further revealed that these common binding partners display weaker affinities toward srGAP3 than for the Itch PRR (8, 20). In addition to residues forming the canonical SH3-binding sites, adjacent amino acids are important for additional interactions with the surface of these SH3 domains and thereby confer binding specificity among PRRs and their ability to form high-affinity complexes.

We have mapped the sequence preferences of several binding partners of Itch by pulldown using PRR peptides in combination with mutational analysis. The results demonstrate that these SH3 domain-containing partners bind to distinct yet overlapping sequences within the PRR of Itch. This is consistent with previous results demonstrating that endophilin and β -PIX compete for the binding of the Itch PRR. Interestingly, β -PIX requires a more extended sequence compared with other binding partners. In conjunction with the 1:2 stoichiometry of this complex, this could reflect the need of docking two SH3 domains to the PRR to allow for the formation of a super-SH3 structure.

The structure of the super-SH3 complex formed by the simultaneous binding of two molecules of the SH3 domain of β -PIX to the PRR of Itch reveals interactions with a core symmetrical RPXPPXPR motif (residues 258–265). Residues preceding or following this motif also stabilized the complex by forming contacts with an additional face of these SH3 domains. CIN85 and β -PIX have also been previously shown to form a 2:1 protein complex with a similar pseudo-symmetrical proline-arginine motif within the PRR of Cbl (21, 22). These proteins and others shared a common binding mechanism, which involves a central positively charged residue simultaneously contacting both SH3 domains (21, 22).

This positively charged residue contacting both SH3 domains is absent from the complex between the Itch PRR and β -PIX. The molecular determinants that drive the formation of super-SH3 complexes remain poorly understood, but it appears that the exact sequence of the PRR contributes to these unusual stoichiometries as well as specific residues from the SH3 domains. It has been postulated that a GWW motif within the n-Src loop of the SH3 domain was crucial to form the binding interface for super-SH3 complexes. This motif is found in β -PIX and other SH3 domain-containing proteins that form super-SH3 complexes. However, this motif does not always form SH3-SH3 interactions (12, 13, 21, 22). β -PIX was also found to interact at a 2:1 stoichiometry with the PRR of Cbl and Itch, but it forms a 1:1 complex with the PRR of PAK (8, 9, 21, 23). Thus, it is clear that super-SH3 interactions are complex and rely on a combination of specific residues from both the SH3 domain and the PRR.

The crystal structure presented here depicts contacts between the two SH3 domains that occur exclusively between the RT loops (Fig. 6, A and B). This conformation is similar to what was observed in the AMAP1-cortactin structure (Fig. 5). In both complexes, there is a similar SH3 dimer interface formed by a key glutamine residue (Gln-196 of β -PIX and Gln-

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

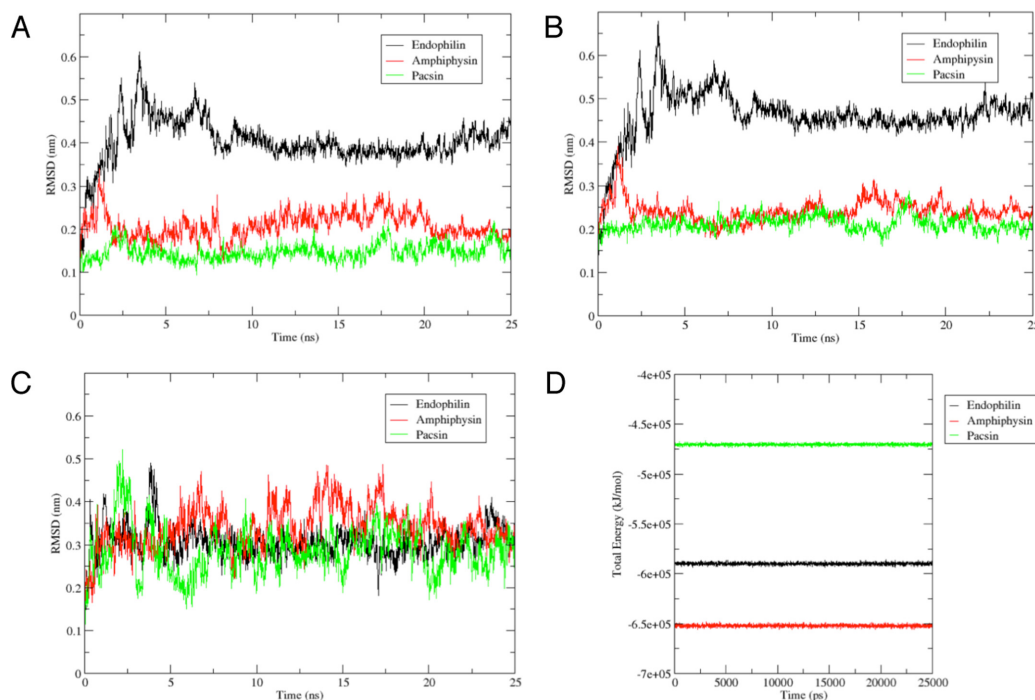


Figure 9. A–C, RMSDs as a function of simulation time for the three complexes (A), the three SH3 domains (B), and the three PRRs (C). The duration of each production run was 25 ns. The backbone of the complex was selected for both least squares fit and the group for RMSD calculations. RMSD shown is relative to the initial complex present in the equilibrated and minimized system. Represented in *black*, *green*, and *red* are the RMSD calculations for the PRR-endophilin complex, PRR-pascin complex, and PRR-amphiphysin complex, respectively. D, total energy of the three complexes during the duration of the MD runs. The duration of each production run was 25 ns. Represented in *black*, *green*, and *red* are the total energy calculations for the PRR-endophilin complex, PRR-pascin complex, and PRR-amphiphysin complex, respectively.

504 of cortactin SH3) (Fig. 6, A and B). In addition to cortactin, DBNL also has a glutamine at the same position in its RT loop and was found to interact with Itch in our mass spectrometry analysis (Table 1). CIN85 is another known binding partner for the Itch PRR that contains this glutamine residue (9). Although the stoichiometry for these specific complexes remains to be determined, we can speculate that these proteins could form similar super-SH3 complexes with the PRR of Itch. However, there is diversity within super-SH3 structures, and we cannot exclude a possible dimer formation involving the participation of novel SH3 residues or resembling other known super-SH3 structures (Fig. 5).

The interaction between the Itch PRR and β -PIX SH3" also reveals similarities to the interaction between the *E. coli* secreted protein EspFu and the SH3 domain of the insulin receptor tyrosine kinase substrate (IRTKS) (24). In the EspFu-IRTKS complex, recognition of the PRR by the SH3 domain of IRTKS requires the binding of two PXXP motifs in tandem, which results in formation of an extensive binding surface. The PRR of Itch exhibits a similar L shape exposing tandem PXXP motifs on two faces of the SH3 domain. Unlike IRTKS, the β -PIX SH3" lacks the hydrophobic pocket to accommodate the fourth proline. This would account for the

great discrepancy observed in the respective affinity of these complexes, because an additional IP motif within EspFu was found to mediate high-affinity binding toward this pocket with a reported K_D of 500 nM. In comparison, the PRR of Itch interacts as an extended class I ligand with a K_D of 1.6 μ M toward β -PIX.

Despite the fact that Itch PRR makes extensive hydrophobic contacts, salt bridges, and hydrogen bonds with both SH3 domains of β -PIX, its affinity is still similar to most of the other SH3 domains tested. Among the SH3 domain-containing proteins tested, only endophilin was able to establish a high affinity interaction with the PRR of Itch. This is consistent with our findings indicating that endophilin is a major binding partner of Itch (Table 1). Itch was found to ubiquitylate endophilin and target it for proteasomal degradation, thereby impacting signaling by the EGF receptor (5, 8, 25).

Intriguingly, endophilin was the only SH3 domain-containing protein targeting the first PXXP motif of the Itch PRR. Assuming that the PRR adopts the same conformation in complex with endophilin as it does with β -PIX, this would place the turn of the L-shaped peptide in a proper conformation to allow another face of the SH3 domain to contact additional motifs in the peptide. In the absence of crystallographic data for the com-

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

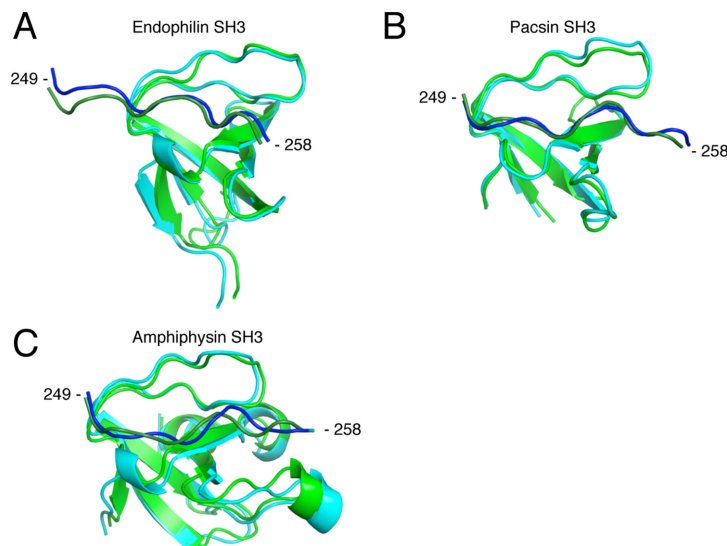


Figure 10. Structural alignment between the initial complex and the frame corresponding to the centroid from clustered frames post-MD simulations for the endophilin complex (A), for the pacsin complex (B), and for the amphiphysin complex (C). The RMSD cut-off for two structures to be considered neighbors in the GROMOS clustering algorithm was 0.20, 0.17, and 0.13 nm, respectively, for each complex. Shown is a representation of the initial complexes modeled from the Itch PRR (dark green) in complex with β -PIX-SH3' (green). Blue, frame corresponding to the cluster centroid. Structural alignment and schematic representation were done using PyMOL (Schrödinger) (12, 13, 21, 22, 46).

plex formed between Itch and endophilin, we can only speculate that extensive rearrangements of a longer PRR sequence and/or the SH3 domain could favor a more ideal fit with endophilin. Thus, the specific architecture of the Itch PRR can accommodate the formation of a variety of protein complexes. In addition to β -PIX, other SH3 domain-containing proteins may also dimerize on the Itch PRR. We indeed isolated the Grb2 protein in our proteomics studies. Grb2 contains two distinct SH3 domains that could bind in tandem to the PRR of Itch, and this tandem binding would resemble a super-SH3-like complex.

Interestingly, in contrast to the characterized SH3 domain-containing partners of Itch, there is still no evidence that β -PIX is ubiquitylated (8). This suggests that super-SH3 complexes with Itch serve an alternative biological function that might be independent of a classical ubiquitylation process.

Experimental procedures

Cell culture and transfection

HEK-293T cells were obtained from the ATCC and were maintained at 37 °C with 5% CO₂ in high-glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone), penicillin (Invitrogen; 100 units/ml), and streptomycin (Invitrogen; 100 mg/ml). Cells were transfected with the indicated plasmids using calcium/phosphate precipitates (26). Typically, cells were transfected using 5 μ g of plasmid/55 cm².

Plasmids

The plasmids encoding amphiphysin II, GFP-pacsin 1, and GFP-endophilin A1 were a kind gift from P. S. McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University). GFP and

FLAG-tagged β -PIX were generously provided by A. Weiss (Howard Hughes Medical Institute, University of California) and J. P. Fawcett (Dalhousie University). We have produced the various PRR sub-sequences by annealing oligonucleotides (Thermo Fisher) coding the indicated amino acids with an additional tyrosine at the C terminus of the peptide to facilitate protein quantification by UV spectroscopy (absorbance at 280 nm) and introduced these sequences in the pGEX-4T1 vector. Another GST-PRR (peptide 249–269) construct was created by the insertion of the PRR coding sequence preceded by three glycines in a modified pGEX-4T1 vector, where the thrombin cutting site was replaced with a TEV cutting site. This construct was used for large-scale protein purification (for ITC and crystallography assays) along with GST-fused constructs expressing endophilin, pacsin, amphiphysin, or β -PIX SH3s. These plasmids were obtained by PCR amplification and subcloning into the pGEX-4T1 TEV modified vector as described previously (8). We have further included an annealed sequence coding three copies of the FLAG epitope in the BamHI restriction site of the TEV modified GST-PRR (peptide 249–269). The FLAG-tagged construct behaved similarly in pulldown experiments and was used to introduce point mutations to change arginine to glutamic acids in Itch PRR (27).

Antibodies

Polyclonal antibodies against pacsin 1 were purchased from Genetex (GTX103078). Polyclonal antibodies against pan-endophilin and the GFP tag were bought from Thermo Fisher (36-3400, A-11122). Anti-amphiphysin I/II monoclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

(SC-58227). Monoclonal antibodies against the FLAG epitope were purchased from Sigma-Aldrich (F3165). Goat anti-rabbit-HRP and goat anti-mouse HRP IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (111-035-003 and 115-035-003).

Pulldown experiments

Transfected HEK-293T cells were washed in PBS and resuspended in buffer A (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing protease inhibitors. The cells were lysed by sonication, and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. For rat brain extracts (Pel-Freez Biologicals), tissue was homogenized in buffer A and centrifuged at 1000 rpm for 10 min before Triton X-100 was added to the resulting supernatant. Extracts were incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged at 45,000 rpm at 4 °C. Extracts were incubated with 10 μ g of the appropriate GST-fusion protein coupled to GSH Sepharose 4B (Bio-World) for 16 h at 4 °C. Beads were washed extensively in the same buffer and prepared for Western blotting analysis. To normalize the quantity of GST-fusion proteins used in each assay, purified beads were run on 10% SDS-PAGE along with a standard curve of BSA. The gel was stained with Coomassie, and densitometry analysis allowed the determination of the volume of beads needed to obtain the desired amount of GST-fusion protein.

Western blotting analysis

Protein extracts and purified proteins obtained by pulldown assays were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose for blotting with the appropriate primary and secondary antibodies. 0.1 μ g/ml of goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP conjugated IgG were used (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Antibody incubation and membrane washings were performed in PBS supplemented with 5% dry milk and 0.05% Tween 20. Immunoreactivity was detected by chemiluminescence using West-Pico SuperSignal (Thermo Fisher Scientific).

Expression and purification of proteins

The SH3 domains and PRR peptides were expressed as GST-fusion proteins in *E. coli* host strain TOPP2 (Stratagene). The cells were grown at 37 °C in Luria Broth medium, and protein expression was induced for 4 h at 30 °C with 0.7 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (Inalco). The cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 1 mM DTT), lysed by passage through a French press, and centrifuged at 105,000 \times g for 1 h at 4 °C. The supernatant was then collected and incubated for 1 h with GSH Sepharose 4B resin (GE Healthcare) at 4 °C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and washed with lysis buffer and TEV buffer (25 mM Na₂HPO₄, 125 mM NaCl, and 5 mM DTT). The GST tag was cleaved by incubating the resin for 2 h with 100 units of TEV protease. The proteins were eluted by extensive washes in TEV buffer. The SH3 domains were further purified using Q-Sepharose High Performance (GE Healthcare). PRR peptides were further purified over a C4-reverse phase HPLC column (Vydac). Proteins and peptides were desalted, quantified by absorbance at 280 nm, flash-frozen, lyophilized, and kept at

–80 °C until they were processed for ITC experiments and crystallography.

Isothermal titration calorimetry studies

ITC titrations were performed at 25 °C in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4 using a MicroCal VP-ITC system. Concentrations of injected PRR peptides in the syringe and SH3 domains in the cell varied from 150 to 350 μ M and from 15 to 35 μ M, respectively, keeping a molar ratio of about 10:1 between the syringe and the cell. Data were analyzed using MicroCal Origin Software, and all experiments fit the single binding site model with a 1:1 stoichiometry. Errors in K_D values were estimated from duplicate measurements.

Mass spectrometry

GST pulldowns with rat brain extracts (Pel-Freez Biologicals) were performed using GST alone, GST-PRR (residues 224–276), or GST-FLAG-PRR (residues 249–269). Fusion proteins alone were loaded as a control, and proteins were separated by SDS-PAGE. The resulting gels were stained with Imperial protein stain (Thermo Fisher), and gel sections corresponding to proteins above or below GST-fusion proteins (upper or lower gels) were processed with in-gel tryptic digest and subsequent nano-LC-MS/MS analysis by the proteomics platform of the Institute for Research in Immunology and Cancer (Montreal, Canada). Data analysis was performed using the Global Proteome Machine to display SH3 domain-containing proteins identified in the screening (28, 29).

Crystallography

Lyophilized PRR peptide and SH3 domains were suspended in water at a final concentration of 4.8 and 4 mM and mixed to a final 1.7:1 molar ratio. Crystals were obtained for β -PIX SH3 at 20 °C using the vapor diffusion method with a hanging drop containing an equal volume of protein complex and well solution (100 mM MIB buffer, pH 5.0, and 25% PEG 1500). Crystals were mounted in a loop and flash-cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K. Diffraction data were collected using a Pilatus 6M detector at beamline X25 at the National Synchrotron Light Source of the Brookhaven National Laboratory. The data set was indexed and integrated using XDS and scaled with XSCALE and the Diffraction Anisotropy Server (UCLA) (30, 31). Due to diffraction anisotropy, the resolution was cut to 1.55 Å to maintain decent completeness in the high-resolution bins. Molecular replacement was performed with Phenix using the crystal structure of AIP4 and β -PIX (PDB code 2P4R) as a search template. Model building was performed in Coot, refined with Phenix, and validated using MolProbity (32–34).

Modeling

The structure of the Itch PRR in complex with β -PIX-SH3' obtained in the crystallography study above served as an initial template. This structure depicts an atypical class II interaction that involves the participation of prolines 259 and 262. A copy of the PRR peptide was then oriented to this complex, and prolines 253 and 256 were aligned to create the class II motif in the PRR- β -PIX complex. We then replaced the SH3 domain of β -PIX by the SH3 domain of endophilin (PDB code 3IQL)

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

and removed the original PRR- β -PIX to obtain a chimeric PRR-endophilin complex. The same approach was used for pacsin (PDB code 2X3X) and amphiphysin (PDB code 1BB9) as well, except that the prolines 250 and 253 were instead aligned to the class II motif of the PRR- β -PIX complex in agreement with the results obtained in the pulldown studies. The resulting chimeric structures were then used as a template for the high-resolution modeling protocol FlexPepDock, implemented with the Rosetta framework (14, 15). FlexPepDock produced 300 low-resolution and 300 high-resolution structures. The resulting models had a peptide backbone RMSD that ranged between 2.5 and 4 Å when overlapped with the initial chimeric structure, showing that the flexible docking procedure was not only exploring local minima. The representation of the best model according to the FlexPepDock score was performed with PyMOL for the endophilin SH3 in complex with Itch PRR (Schrödinger). For pacsin and amphiphysin, we selected the third models for representation because they displayed a combination of properly docked prolines, optimized interactions, and best protein geometry according to MolProbity analyses (33). Residues establishing a hydrogen bond or a hydrophobic contact were identified using LigPlot+ (35, 36). The surface hydrophobicity color script used for representation was generously provided by H. A. Steinberg (Artforscience).

MD simulations

MD simulations and system equilibration were performed with the GROMACS version 5.0.5 molecular simulation package (37), using the GROMOS96 54a7 force field (38). The models of the SH3 domain-PRR peptide complexes obtained from FlexPepDock were centered in a cubic box. The periodic water box edges were extended at least 20 Å away from the complex to allow it to move freely during the production runs. The SPC216 water model (39) was used to solvate the system and add water molecules to the box. Chloride ions were added to neutralize the net charge of the solvated system. All three systems were submitted to 5000 steps of energy minimization using a steepest descent method to remove initial steric clashes and ensure appropriate geometry. The particle-mesh Ewald algorithm (40) was used in all calculations to consider electrostatic interactions with grid spacing around 1 Å, and van der Waals forces were considered with a cut-off distance of 1.4 Å. Each system was subjected to two rounds of equilibration after minimization. They were first gradually heated in a NVT ensemble from 0 to 300 K over 100 ps using the V-rescale coupling algorithm (41) with position restraints on the protein and the ligand. This was followed by NPT equilibration of 100 ps to reach the reference pressure of 1 atm by using the Parrinello-Rahman coupling algorithm (42) with isotropic coupling and with position restraints on the protein and the ligand. The LINCS algorithm was used to constrain all bonds involving hydrogen atoms (43). Each system ran for a 25-ns MD simulation under the same conditions as the equilibration procedures with a time step of 2 fs but without any position restraints. Computations were made on the supercomputer Guillimin from McGill University, managed by Calcul Québec and Compute Canada. Production runs requested 36 cores. The analysis for the trajectories was carried out using the standard software tools provided by the GRO-

MACS package, and visualization was performed with VMD (44) and PyMOL (Schrödinger).

Author contributions—A. A. conceived all experiments, except for ITC and crystallography, which were conceived by J. G. O.; G. D. collected the data presented in this paper; L. C. analyzed the crystal structure; M. L.-P. gave extensive technical assistance for the large-scale protein purifications and ITC experiments; MD experiments were performed and analyzed by A.-T. T. and A. S.; R. A. contributed to molecular cloning; G. D., L. C., J. G. O., and A. A. collectively analyzed the data and wrote the paper.

References

1. Rotin, D., and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 398–409
2. Gay, D. L., Ramón, H., and Oliver, P. M. (2008) Cbl- and Nedd4-family ubiquitin ligases: balancing tolerance and immunity. *Immunol. Res.* **42**, 51–64
3. Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**, 231–241
4. Sudol, M., and Hunter, T. (2000) New wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001–1004
5. Angers, A., Ramjaun, A. R., and 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**, 11471–11479
6. Desrochers, G., Corbeil, L., and Angers, A. (2013) From a conserved structure to regulation: CWH ubiquitin ligases tightly regulate key cellular events. in *Advances in Medicine and Biology*, Vol. 62 (Berhardt, L. V., ed) pp. 177–215, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY
7. Baumann, C., Lindholm, C. K., Rimoldi, D., and Lévy, F. (2010) The E3 ubiquitin ligase itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *FEBS J.* **277**, 2803–2814
8. Desrochers, G., Lussier-Price, M., Omichinski, J. G., and Angers, A. (2015) Multiple src homology 3 binding to the ubiquitin ligase itch conserved proline-rich region. *Biochemistry* **54**, 7345–7354
9. Janz, J. M., Sakmar, T. P., and Min, K. C. (2007) A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and β -p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 28893–28903
10. Malik, R., Soh, U. J., Trejo, J., and Marchese, A. (2012) Novel roles for the E3 ubiquitin ligase atrophin-interacting protein 4 and signal transduction adaptor molecule 1 in G protein-coupled receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **287**, 9013–9027
11. Kelil, A., Levy, E. D., and Michnick, S. W. (2016) Evolution of domain-peptide interactions to coadapt specificity and affinity to functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E3862–E3871
12. Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**, 343–355
13. Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., Okada, M., Kobayashi, H., Wada, H., Nakano, H., Ikegami, T., et al. (2006) Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7036–7041
14. London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., and Schueler-Furman, O. (2011) Rosetta flexpepdock web server: high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **39**, W249–W253
15. Raveh, B., London, N., and Schueler-Furman, O. (2010) Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins* **78**, 2029–2040
16. Anggono, V., and Robinson, P. J. (2007) Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurochem.* **102**, 931–943

Molecular basis of SH3 domains targeting the Itch PRR

17. Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmüller, U., Schneider-Mergener, J., and Cesareni, G. (1999) The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 32001–32007
18. Solomaha, E., Szeto, F. L., Yousef, M. A., and Palfrey, H. C. (2005) Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamin: specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 23147–23156
19. Zucconi, A., Dente, L., Santonico, E., Castagnoli, L., and Cesareni, G. (2001) Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage λ reveals new potential partners of synaptojanin 1. *J. Mol. Biol.* **307**, 1329–1339
20. Wuertenberger, S., and Groemping, Y. (2015) A single PXXP motif in the C-terminal region of srGAP3 mediates binding to multiple SH3 domains. *FEBS Lett.* **589**, 1156–1163
21. Jozic, D., Cárdenes, N., Deribe, Y. L., Moncalián, G., Hoeller, D., Groemping, Y., Dikić, I., Rittinger, K., and Bravo, J. (2005) Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 972–979
22. Moncalián, G., Cárdenes, N., Deribe, Y. L., Spínola-Amilibia, M., Dikić, I., and Bravo, J. (2006) Atypical polyproline recognition by the CMS N-terminal Src homology 3 domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 38845–38853
23. Hoelz, A., Janz, J. M., Lawrie, S. D., Corwin, B., Lee, A., and Sakmar, T. P. (2006) Crystal structure of the SH3 domain of betapix in complex with a high affinity peptide from pak2. *J. Mol. Biol.* **358**, 509–522
24. Aitio, O., Hellman, M., Kazlauskas, A., Vingadassalom, D. F., Leong, J. M., Saksela, K., and Permi, P. (2010) Recognition of tandem PxxP motifs as a unique Src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21743–21748
25. Azakir, B. A., Desrochers, G., and Angers, A. (2010) The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *FEBS J* **277**, 1319–1330
26. Kingston, R. E., Chen, C. A., and Rose, J. K. (2003) Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 10.1002/0471142727.mb0901s63
27. Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and Griffiths, G. M. (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* **114**, 2405–2416
28. Craig, R., and Beavis, R. C. (2004) Tandem: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* **20**, 1466–1467
29. Fenyő, D., Eriksson, J., and Beavis, R. (2010) Mass spectrometric protein identification using the global proteome machine. *Methods Mol. Biol.* **673**, 189–202
30. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
31. Strong, M., Sawaya, M. R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2006) Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8060–8065
32. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., et al. (2010) Phenix: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
33. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
34. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501
35. Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011) Ligplot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2778–2786
36. Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1995) Ligplot: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**, 127–134
37. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25
38. Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., and van Gunsteren, W. F. (2011) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54a7 and 54b7. *Eur. Biophys. J.* **40**, 843–856
39. Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., and Straatsma, T. P. (1987) The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* **91**, 6269–6271
40. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. G. (1995) A smooth particle mesh ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593
41. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101
42. Parrinello, M., and Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190
43. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E. M. (1997) Lincs: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472
44. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) Vmd: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38, 27–28
45. Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobítz, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Taly, J. F., and Notredame, C. (2011) T-coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and rna sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* **39**, W13–W17
46. Martín-García, J. M., Luque, I., Ruiz-Sanz, J., and Camara-Artigas, A. (2012) The promiscuous binding of the Fyn SH3 domain to a peptide from the ns5a protein. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1030–1040

Annexe 2

Role of the ubiquitin ligase ITCH in clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor

Riham Ayoubi¹, Peter S. McPherson², Annie Angers¹

¹Department of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Abstract

Once activated by ligand, epidermal growth factor receptor (EGFR) is endocytosed in clathrin-coated pits. ITCH is an E3 ubiquitin ligase that interacts with and ubiquitinates several proteins involved in clathrin-mediated endocytosis (CME) including endophilin. To further investigate the function of ITCH in EGFR endocytosis, the internalization of fluorescent EGF was measured in ITCH^{-/-} HeLa cells. In the absence of ITCH, there was a significant decrease in the CME of EGF. Rescue experiments using wild-type ITCH confirmed the importance of the protein for normal EGF uptake. ITCH point mutations that disrupt the interaction with endophilin failed to rescue the defects in EGFR uptake, as did a non-catalytic form of ITCH. ITCH^{-/-} cells also displayed a delay in the rate of phospho-EGFR degradation as well as a prolonged ERK1/2 signaling. Our study describes an important pathway regulating EGFR trafficking and reveals for the first time that the protein ITCH is required for CME of EGFR.

Keywords: ITCH, AIP4, E3 ligase, PRR, SH3, HECT, EGFR, RTK, EGF, Endocytosis, Clathrin, MAPK.

Introduction

Uptake of extracellular growth factors occurs through ligand-dependent endocytosis of cell surface receptors. Upon ligand binding, the plasma membrane invaginates to form clathrin-coated pits (CCPs) that harbor receptors such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), which subsequently pinch off and deliver the ligand-receptor complex to endosomes. During this process, EGFR transduces signals important for cell growth, differentiation, proliferation and motility. Once the clathrin-dependent route is saturated, clathrin-independent endocytosis takes place allowing fast degradation of the receptor in the lysosomes (1,2). Ubiquitination is a post-translational modification that can regulate receptor trafficking, sorting, and downregulation (3). Phosphorylation of EGFR after dimerization makes it possible for the ubiquitin ligase CBL to bind the phosphorylated tyrosine 1045 (pY1045) of EGFR, an interaction that allows the receptor to activate CBL ligase activity upon phosphorylation. CBL ubiquitinates EGFR, a signal that targets the receptor to degradation in lysosomes (4-6). Interestingly, CME is also regulated by ubiquitination of endocytic adaptors. CBL itself is a substrate for another ubiquitin ligase, ITCH (also known as AIP4, atrophin-interacting protein 4) (7).

ITCH is an ubiquitin ligase that contains an N-terminal C2 domain, four WW domains and a homologue of the E6-AP carboxyl terminus (HECT) catalytic domain. ITCH typically uses its WW domains to interact with PPxY motifs of its substrates, like CBL. However, ITCH also contains a proline rich region (PRR) that recognizes several of the SH3 domain-containing proteins involved in CME. These include endophilin, amphiphysin, PACSIN, Grb2, (8,9) and SNX9 (10). We previously tested the affinity of the ITCH PRR for these different proteins and discovered that the affinity for endophilin was the highest amongst those tested (9). Here, we demonstrate that an

ITCH protein with mutations in arginine 252, 255, and 258 is unable to bind endophilin. Endophilins are N-BAR proteins that participate in the internalization of EGFR by sensing and driving membrane curvature, while acting as a scaffold to recruit other crucial endocytic proteins (11,12). For example, a CBL/CIN85/endophilin complex mediates downregulation of EGFR following activation (13). The interactions of ITCH with CBL, endophilin and other SH3-domain containing proteins suggests a role for ITCH in the internalization process of the EGF receptor. Therefore, we examined whether loss-of-function of ITCH affects the endocytosis of stimulated EGFR. We used CRISPR/Cas9 to knockout (KO) ITCH in HeLa cells and found that it is required for ligand-bound EGFR but not the transferrin receptor endocytosis. Importantly, while the overexpression of wild-type ITCH successfully restores the level of internalized EGF/EGFR, neither a ligase-dead mutant nor a PRR mutant unable to bind SH3 endophilin rescues the phenotype. The present study provides an example of a HECT domain ubiquitin ligase functioning as an important regulator of EGFR endocytosis, further enhancing the importance and complexity of both EGFR signaling and the ubiquitination process as a regulator of endocytic mechanisms.

Experimental procedures

Cell culture and transfection

HEK-293T cells and HeLa cells were grown in high-glucose DMEM (GE Healthcare) supplemented with 10% bovine calf serum (GE Healthcare), penicillin (Invitrogen, 100 units/mL), streptomycin (Wisent, 100 µg/ml) and 2 mM L-glutamate in an incubator set at 5% CO₂ and 37°C. HEK-293T cells were transfected using the calcium/phosphate method and HeLa cells using jetPRIME[®] transfection reagent (Polyplus) according to the manufacturer's instructions. Cells were serum-starved in DMEM media with 2 mM L-glutamate before endocytosis experiments.

Antibodies

Purified Mouse Anti-Itch/ITCH from BD Biosciences (Catalog #611198), Rabbit polyclonal anti-c-CBL from Cell Signaling (Catalog #2747), Rabbit polyclonal anti-endophilinA2 from Abcam (Catalog #ab130600), Rabbit monoclonal EGFR from Cell signaling (D38B1), Mouse mAb anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Catalog #9107), Rabbit polyclonal anti-Phospho-EGF Receptor (Tyr1045) (Catalog #2237), Phospho-EGF Receptor (Tyr1148) (Catalog #4404) and Rabbit monoclonal Phospho-EGF Receptor D7A5 (Tyr1068) (Catalog #3777) from Cell signaling, Rabbit polyclonal anti-GFP from Invitrogen (Catalog #A-6455) and Anti-β Actin from Millipore (Catalog #MAB1501) were used for western blot. Mouse monoclonal anti-extracellular EGFR from Abcam (ab30) was used for immunofluorescence.

Mutagenesis

All GFP-ITCH Full mutants were generated using QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions and using primers designed to introduce point mutations by changing arginine to glutamic acid (Table 1).

CRISPR/Cas9 KO

CRISPR/Cas9-mediated ITCH KO was performed as described (14). Briefly, for HeLa cells, guide RNAs were designed to target a unique sequence in the ITCH human genomic DNA using the Benchline online tool. Two guide RNAs were selected at positions 100 bp apart (Table 2). They were cloned individually into pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 vector and both vectors were transfected into the cells. For COS-7 cells, one guide RNA was used (Table 2). At 24h post-transfection, the cells were puromycin treated with a concentration of the antibiotic determined by a puromycin kill curve on parent cells. After selection, cells were diluted to obtain a single cell colony. Single colonies were expanded, DNA was extracted using QuickExtract genomic DNA extraction solution (Epicentre Biotechnologies) and then screened by PCR amplification of the region of interest. The knockout was verified by sequencing the DNA modification and by Western blot. A second ITCH^{-/-} cell line was prepared similarly from COS-7 cells but using a single guide RNA (Table 2).

Endocytosis assay and rescue experiments

Cells plated on coverslips were starved for 2h at 37°C before addition of Alexa Fluor 647-EGF (Invitrogen; Catalog #E35351) in cold serum-free media. Cells were kept at 4°C in the dark for 1h. EGF-free media at 37°C was added and cells were then allowed to internalize the bound EGF

for 20 min at 37°C. Cells were then gently acid washed (0.2M acetic acid/0.4M NaCl) for 30 sec and fixed in 4% Paraformaldehyde.

For rescue experiments, parent HeLa cells or ITCH KO cells were transfected with empty pEGFP-C2 vector and ITCH KO cells were transfected with the indicated GFP-ITCH constructs. At 24 h post transfection, endocytosis assays were performed using 2 ng/ml Alexa Fluor-647 EGF. A similar endocytosis assay was used to observe transferrin uptake using 100 µg/mL of Alexa Fluor-647 (Catalog #T23366) or 568 (Catalog #T23365) conjugated transferrin (Invitrogen).

For the mosaic experiments, parent and ITCH KO cells were transfected with pEGFP-C2 and mCherry, respectively. At 24 h post transfection, cells were detached and mixed at a 1:1 ratio before seeding on coverslips for another 24 h. Endocytosis assays were then performed at 2 ng/ml Alexa Fluor-647 EGF.

Pull-down assays

All GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* DH5a and purified on Glutathione-Sepharose beads in HEPES buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. HEK-293T cells were transfected with different GFP-ITCH constructs. The next day, cells were washed 3x with PBS, lysed and incubated for 20 min at 4°C with 20 mM HEPES buffer with protease inhibitors supplemented with Triton-X100 at 1% final concentration. Lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 15000 rpm using a microcentrifuge. Supernatants were then incubated with the mentioned fusion proteins overnight at 4°C followed by an elution in 1x SDS-PAGE sample buffer. All eluted samples were then run on SDS-PAGE denaturing gels followed by immunoblotting.

Imaging and statistical analysis

Cells were imaged on a Leica TCS-SP8 confocal microscope using a 63× oil immersion objective. Images were processed using the LasX software. Internalized AF647-EGF was quantified in 60 to 90 cells for each condition from three independent experiments by drawing a constant area box around each cell using ImageJ. Corrected total cell fluorescence was compared between groups using R-studio software (R Core Team, 2016). The normality and homogeneity of data were verified using the Shapiro-Wilk test for the former and Levene test for the latter. Depending on the specific biological question, statistical analyses were carried out using a two-way ANOVA, one-way ANOVA (followed by Bonferroni's post hoc comparison) or Student's t test. P-values < 0.001 were considered significant.

Degradation chase experiments

Cells were treated with 100 µg/ml cycloheximide to block new protein synthesis. Cells were then deprived of serum for 2 h and stimulated with a low concentration of recombinant human EGF (Peprotech; Catalog #AF-100-15) for 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120 and 240 min. Cells were lysed in 20 mM HEPES buffer, 1% Triton-X-100 with protease and phosphatase inhibitors, and centrifuged for 15min at 15000rpm. Total cell lysates were separated on denaturing SDS-PAGE and immunoblotted using the indicated antibodies.

Results

KO of ITCH causes a deficit in CME of EGFR

Following binding to EGF, EGFR is internalized to be degraded in lysosomes (15). Since multiple SH3-domain containing proteins involved in endocytosis were shown to bind the ubiquitin ligase ITCH (9,10,16,17), we hypothesized that the absence of ITCH could influence the endocytosis of EGFR. To test this hypothesis, we generated ITCH KO cells using CRISPR/Cas9. At low concentrations, at or below 2 ng/ml, EGF triggers CME of the EGFR, but at concentrations above ~ 2-5 ng/ml EGF, EGFR saturates the CME pathway and can enter cells through clathrin-independent endocytosis (6). We thus tested EGFR internalization at various concentrations of EGF (2, 5, 10 and 20 ng/ml). The cells were acid washed before fixation so that only internalized fluorescent EGF was visible. We quantified endocytosed EGF and compared the total fluorescence of EGF-positive puncta between ITCH KO and parental HeLa cells. Upon incubation of the cells with 2 ng/ml of fluorescent EGF at 37°C for 20 min, a significant decrease in the amount of internalized EGF was observed in ITCH KO cells compared to parental controls (Fig. 1A/B). This phenotype was gradually less visible when higher concentrations of EGF were used, such that by 5 ng/ml the difference seemed less obvious and at 10 or 20 ng/ml there was seemingly no difference between KO and parental cells (Fig. 1A). Statistical analysis revealed significant differences only at 2 ng/ml (Fig. 1B). Identical results were seen in COS-7 cells (Fig. 2A/B).

The alterations in EGFR endocytosis occurred despite the fact there were no changes in the levels of the ITCH substrates Endophilin-A2 or c-CBL in the ITCH KO cells (Fig S1A). Moreover, endogenous levels of total EGFR remained unchanged in control and ITCH KO cells (Fig. S2A) and there was no change in the level of EGFR at the cell surface (Fig. S2B).

Alterations in EGFR CME are not due to a general endocytic defect.

We next sought to determine if the deficit measured in EGFR internalization was due to a general impairment of CME in ITCH KO cells. We thus tested the effect of the absence of ITCH protein on the endocytosis of Transferrin. Unlike EGFR, the transferrin receptor is internalized in a constitutive and stimulation-independent manner. After 20 min of fluorescent transferrin uptake, there was no difference in the level of internalized fluorescent in ITCH KO cells compared to control (Fig. 3). Together, our data demonstrate that CME of EGFR is dependent on the ubiquitin ligase ITCH, although the CME machinery appears to function normally.

Mutations in the PRR of ITCH efficiently reduce SH3 domain binding.

The ITCH PRR interacts with the SH3 domain of several endocytic proteins with the highest affinity for endophilin. The ITCH PRR is a 20 amino acid stretch (PSRPPRPSRPPPTPRRP), bearing four canonical sites for recognition by SH3 domains; three class II and one class I (16). In previous studies, we determined that endophilin bound specifically to the class II motif RPPRPSR (residues 252–258) (9). We speculated that the arginines would be critical for the recognition of endophilin by full-length ITCH. We created four different point mutations in the PRR, replacing arginine residues with glutamic acid (Fig. 4A). We obtained R252E, R255E, R252,255,258E and R265,266E ITCH mutants. These GFP-tagged ITCH mutants were overexpressed in HEK-293T cells followed by a pull-down assay using 10 µg of the GST-SH3 domain of endophilin A2. While

a single point mutation in R 252 or 255 reduced the affinity of the SH3 domain for ITCH, mutating the R residues 252, 255 and 258 simultaneously almost abolished the interaction between the SH3 of endophilin A2 and ITCH (Fig. 4B). Mutating residues 262-266 had little effect on the affinity between ITCH and endophilin A2-SH3 (Fig. 4B). To challenge the binding capacity of this triple mutant, we performed the same pull-down assay with a increasing amounts of GST fusion proteins. Only negligible binding of Endophilin SH3 could be detected (Fig. 4C), while all other SH3 domains tested did not bind at this mutant (Fig. S3).

Rescue of EGFR internalization

In order to further demonstrate the contribution of ITCH to CME of EGFR, we performed a rescue experiment using GFP-ITCH wild-type, catalytically inactive (CA) and SH3-binding deficient (R252,255,258) mutants. While EGFR internalization was fully re-established by overexpression of GFP-ITCH wild-type, both mutants failed to rescue the phenotype (Fig. 5). This indicates that both ITCH ubiquitin ligase activity and scaffolding capacities are needed for CME of EGFR.

EGFR degradation and signaling in ITCH KO cells

We next questioned whether the lack of internalization phenotype is accompanied by any change in the rate of receptor degradation. For this purpose, we stimulated the cells at a low concentration of EGF and immunoblotted for total and phosphorylated EGFR. When compared to wild-type HeLa cells, the levels of total EGFR are comparable at all time points in ITCH KO cells (Fig. 6A). However, activated EGFR (pY1068 and pY1148) seemed to be slightly more stable in ITCH KO cells, although this trend did not reach statistical significance (Fig. 6B).

Similarly, activated ERK1/2 remained activated longer in ITCH KO cells when compared to control. Together, these results suggest that EGFR signalling might be slightly upregulated in ITCH knockouts.

Discussion

EGFR uptake from the plasma membrane to the inside of the cell controls many cellular functions including proliferation and migration. This process is highly regulated, and a dysregulation of the EGFR trafficking is strongly associated with oncogenesis (18). Here we focus on the role played by the ubiquitin ligase ITCH to control the internalization of EGFR. ITCH binds to c-CBL through its WW domains, and its PRR region interacts with Endophilin, two key players in EGF receptor endocytosis (7,8).

When using low concentrations of EGF, only the clathrin-mediated route is enabled to internalize the stimulated receptor (6). We found here that the absence of ITCH caused a deficiency in the internalization of low levels of EGF, implicating CME. Previously, some evidence was shown eluding to the possibility that ITCH is involved in the regulation of CME endocytosis players. The ligase ITCH can bind many SH3 domain-containing proteins like Intersectin-1s, amphiphysin, PACSIN and β -PIX. Endophilin is recruited to the endocytic site through CIN85/CBL, and is a major binding partner to ITCH (9,16). Our results reveal for the first time that the internalization process of the stimulated EGFR is dependent on ITCH.

The CBL family of ubiquitin ligases are known to ubiquitinate EGFR post-activation and send it to degradation in the lysosomes. First, CBL was shown to be a multi-adaptor protein that recruits CIN85 and endophilin to form a complex with activated EGFR (13). Then, CBL proteins were found to be polyubiquitinated by ITCH in a degradative way, which suggest that ITCH is a negative regulator of EGFR degradation (7,19). Knockdown of CBL in HEK293T cells did not significantly affect the level of EGF-activated EGFR internalization at 100ng/ml but delayed its ubiquitination and degradation (20). In PAE (porcine aortic endothelial) cells, CBL knockdown

reduces the level of internalized receptor up to 40-50% compared to the control, showing that this internalization is dependent on CBL (21). Sorkin et al. later identified ubiquitination as part of an essential mechanism through which EGFR can be internalized, when showing that mutating 21 lysine residues in the tyrosine domain of EGFR significantly reduced the receptor internalization (3). This clathrin-mediated internalization also depends on adaptor proteins like the BAR and SH3 domain-bearing protein, endophilin. At synapses, an endophilin triple knockout impaired uncoating and provoked an accumulation of clathrin-coated vesicles, delaying endocytosis and impairing synaptic transmission (12). In breast cancer cells, an EGF internalization deficiency is noticeable after the silencing of endophilin A2 (22).

In rescue experiments, the triple arginine mutant failed to recover the normal level of intracellular EGF, indicating that ITCH PRR availability is important to complete the endocytic complexes. While it is not rare for a ubiquitin ligase to play the role of an adaptor protein, it is uncommon for one to bear a PRR region, like in the case of ITCH. Therefore, ITCH could be fulfilling the role of endophilin and other proteins binding partner while the endocytic machinery is being recruited to the plasma membrane. PRR-SH3 interactions are known to drive the formation of the clathrin pit. Dynamin for example, the GTPase responsible for the fission of clathrin-coated pits, uses its PRR to bind the SH3 domains of endophilin and amphiphysin (23,24). In addition, these interactions can control the endocytic trafficking and degradation of the cargo. The Rin1-STAM complex functions as a regulator of EGFR trafficking. The Rab5 exchange factor Rin1 (Ras interaction/interference 1) binds the SH3 domain of STAM (signal transducing adaptor molecule) via its PRR. Both proteins colocalize to the stimulated EGFR at endosomes, to guide the sorting of the receptor to lysosomes (25). A similar colocalization between ITCH and endophilin A1 is seen after overexpression of both proteins and EGF stimulating the cells (8). The SH3 domain-

containing protein intersectin1 is also another substrate of ITCH acting at the endocytic site. Intersectin1 stimulates the ligase CBL, thus stimulating EGFR ubiquitination. By binding the PRR in both CBL and its inhibitor sprouty 2, intersectin disrupts the sprouty 2-CBL interaction, leading to an enhanced EGFR signaling (26). The isoform 1s of intersectin is directly monoubiquitinated by ITCH, a modification that does not lead to its degradation (27).

Similarly, our data show that an ITCH ligase dead mutant is unable to restore a normal level of internalized EGF. As a substrate of ITCH at the endocytic vesicle, CBL ubiquitination can be directly affected by the loss of a catalytically active ubiquitin ligase. Any change in the ubiquitination levels of ITCH substrates at the plasma membrane can disturb the formation of the protein complexes carrying the cargo. The ubiquitination of the adaptor protein eps15 gives an example on the importance of this post-translational in completing a normal endocytosis. Eps15 ubiquitination by Parkin prevents it from binding ubiquitin on the receptor, a modification that delays the internalization and degradation of EGFR, causing an amplified PI3K–Akt signaling (28).

Transferrin endocytosis was also followed in ITCH^{-/-} cells but was not dependent on the presence of the ubiquitin ligase ITCH. This can be supported by the fact that ITCH interacts with CBL and Grb2 (29), two proteins specifically implicated in the endocytosis of EGFR. In addition, the EGF and transferrin receptors were shown to take different sorting routes that directs each to its own destination (30). We conclude that compared to EGFR, the transferrin receptor is a constitutively internalized receptor for which the endocytosis mechanism is not ITCH-dependent.

In the absence of ITCH, the endogenous levels of total EGFR, CBL and endophilin A2 remain unchanged between the parental or ITCH^{-/-} HeLa at any given time. However, after stimulation

with low EGF levels, the phosphorylated EGFR follows a slower degradation rate in *ITCH*^{-/-} compared to WT cells, accompanied by a prolonged stimulation of pERK. In the future, the ubiquitination state of the stimulated EGFR and c-CBL should be assessed in the *ITCH*^{-/-} cell line in order to better understand any events that could be related to the internalization deficiency. In order to confirm if the regulatory effect of ITCH is specific to EGFR endocytosis, another ligand-dependent receptor internalization should to be studied in the *ITCH*^{-/-} cell line. ITCH is known to ubiquitinate CXCR4, a GPCR with critical functions in brain and heart development. CXCR4 stimulation activated multiple signalling cascades like MAPK and AKT. The ubiquitination-dependent degradation of CXCR4 is reduced by the knockdown of ITCH (31). Notch is another receptor substrate of ITCH which is important for the development and survival of T cells. ITCH is not involved in the early steps of Notch endocytosis but is responsible for a K29 polyubiquitination required for trafficking of the receptor to lysosomes (32).

In summary, we discover that clathrin-mediated endocytosis of EGFR is dependent on the ubiquitin ligase ITCH. We also determine that ITCH does not only function as a ubiquitin ligase but also as an adaptor protein to facilitate this process.

References

1. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-2765
2. Sigismund, S., Algisi, V., Nappo, G., Conte, A., Pascolutti, R., Cuomo, A., Bonaldi, T., Argenzio, E., Verhoef, L. G., Maspero, E., Bianchi, F., Capuani, F., Ciliberto, A., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2013) Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *EMBO J* **32**, 2140-2157
3. Goh, L. K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010) Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **189**, 871-883
4. Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**, 3663-3674
5. Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., and Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **274**, 22151-22154
6. Sorkin, A., and Duex, J. E. (2010) Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 15**, Unit 15

14

7. Magnifico, A., Ettenberg, S., Yang, C., Mariano, J., Tiwari, S., Fang, S., Lipkowitz, S., and Weissman, A. M. (2003) WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* **278**, 43169-43177
8. Angers, A., Ramjaun, A. R., and 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**, 11471-11479
9. Desrochers, G., Cappadocia, L., Lussier-Price, M., Ton, A. T., Ayoubi, R., Serohijos, A., Omichinski, J. G., and Angers, A. (2017) Molecular basis of interactions between SH3 domain-containing proteins and the proline-rich region of the ubiquitin ligase Itch. *J Biol Chem* **292**, 6325-6338
10. Baumann, C., Lindholm, C. K., Rimoldi, D., and Levy, F. (2010) The E3 ubiquitin ligase Itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *FEBS J* **277**, 2803-2814
11. Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* **155**, 193-200
12. Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O'Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., and Camilli, P. D. (2011) Recruitment of endophilin to clathrin coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72**, 587-601

13. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-187
14. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308
15. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905
16. Desrochers, G., Lussier-Price, M., Omichinski, J. G., and Angers, A. (2015) Multiple Src Homology 3 Binding to the Ubiquitin Ligase Itch Conserved Proline-Rich Region. *Biochemistry* **54**, 7345-7354
17. Janz, J. M., Sakmar, T. P., and Min, K. C. (2007) A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *J Biol Chem* **282**, 28893-28903
18. Tomas, A., Futter, C. E., and Eden, E. R. (2014) EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol* **24**, 26-34
19. Courbard, J. R., Fiore, F., Adelaide, J., Borg, J. P., Birnbaum, D., and Ollendorff, V. (2002) Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBLC and AIP4/ITCH. *J Biol Chem* **277**, 45267-45275
20. Pennock, S., and Wang, Z. (2008) A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in epidermal growth factor receptor downregulation. *Mol Cell Biol* **28**, 3020-3037
21. Huang, F., Goh, L. K., and Sorkin, A. (2007) EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16904-16909

22. Baldassarre, T., Watt, K., Truesdell, P., Meens, J., Schneider, M. M., Sengupta, S. K., and Craig, A. W. (2015) Endophilin A2 Promotes TNBC Cell Invasion and Tumor Metastasis. *Mol Cancer Res* **13**, 1044-1055
23. Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1997) The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8569-8574
24. Grabs, D., Slepnev, V. I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L. C., and De Camilli, P. (1997) The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* **272**, 13419-13425
25. Kong, C., Su, X., Chen, P. I., and Stahl, P. D. (2007) Rin1 interacts with signal-transducing adaptor molecule (STAM) and mediates epidermal growth factor receptor trafficking and degradation. *J Biol Chem* **282**, 15294-15301
26. Okur, M. N., Ooi, J., Fong, C. W., Martinez, N., Garcia-Dominguez, C., Rojas, J. M., Guy, G., and O'Bryan, J. P. (2012) Intersectin 1 enhances Cbl ubiquitylation of epidermal growth factor receptor through regulation of Sprouty2-Cbl interaction. *Mol Cell Biol* **32**, 817-825
27. Dergai, O., Dergai, M., and Rynditch, A. (2018) Ubiquitin-ligase AIP4 controls differential ubiquitination and stability of isoforms of the scaffold protein ITSN1. *FEBS Lett* **592**, 2259-2267
28. Fallon, L., Belanger, C. M., Corera, A. T., Kontogiannea, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., Voortman, J., Haber, M., Rouleau, G., Thorarinsdottir, T., Brice, A., van Bergen En Henegouwen, P. M., and Fon, E. A. (2006) A regulated interaction with the UIM protein

Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol* **8**, 834-842

29. Desrochers, G. (2015) *Caractérisation des interactions établies par la région riche en prolines de la ligase de l'ubiquitine Itch*

Thèse doctorale

30. Leonard, D., Hayakawa, A., Lawe, D., Lambright, D., Bellve, K. D., Standley, C., Lifshitz, L. M., Fogarty, K. E., and Corvera, S. (2008) Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *J Cell Sci* **121**, 3445-3458
31. Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H., and Benovic, J. L. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* **5**, 709-722
32. Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2008) AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One* **3**, e2735

Figure1

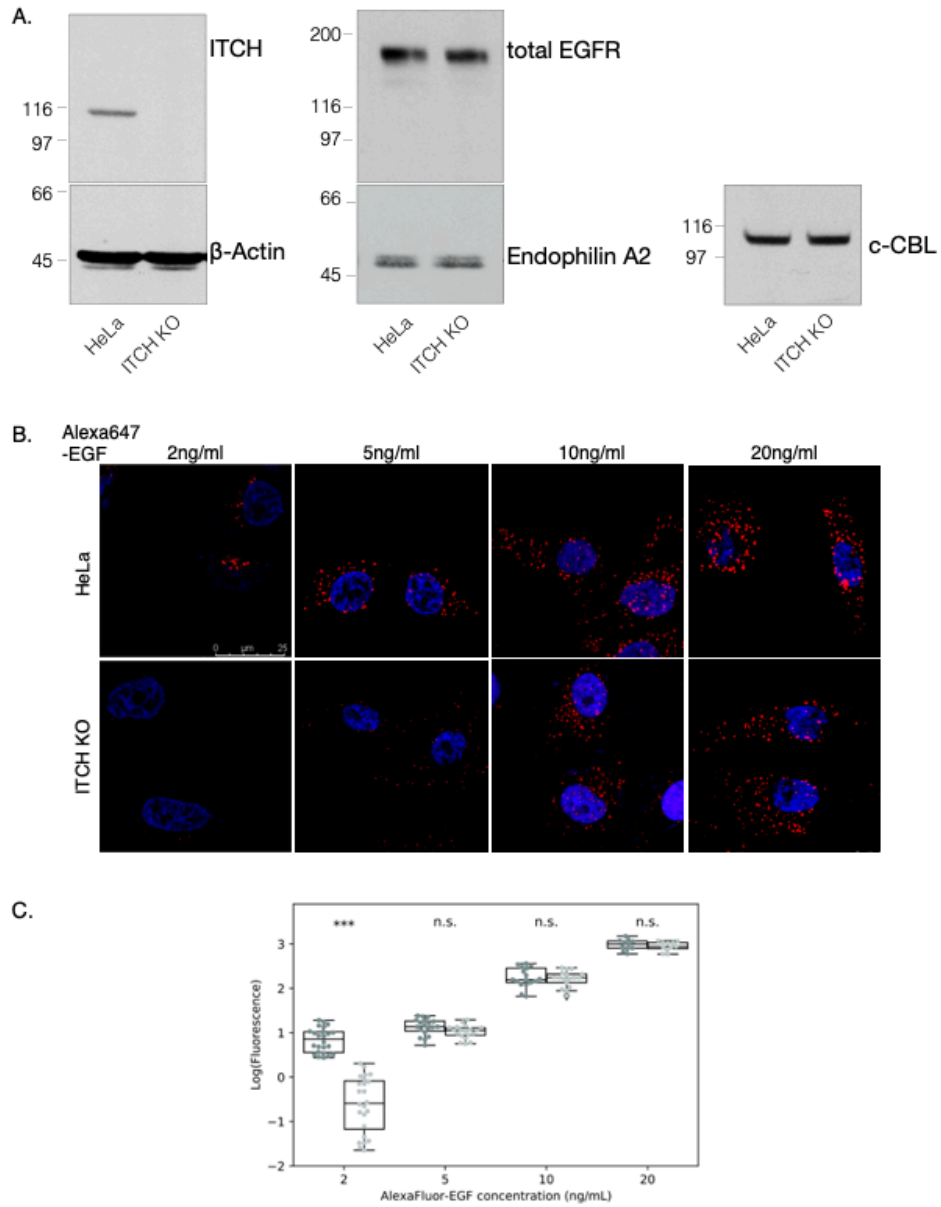


Figure1. Endocytosis assay to detect clathrin-mediated internalization of EGF in HeLa ITCH^{-/-} cells.

A) Western blot for the determination of the endogenous levels of ITCH partners involved in CME of EGFR. The cells at steady-state were lysed, and total lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies against the proteins shown. B) Uptake of different concentrations of AlexaFluor647-EGF by ITCH knockout HeLa cells vs control cells upon starvation. Cells were starved for 2h and AlexaFluor647 EGF diluted in serum-free media was added at 20, 10, 5 and 2 ng/ml. Cells were gently acid washed to remove any extracellular bound EGF. Images were captured upon 20min of endocytosis. C) Quantification showing mean value of intracellular EGF fluorescence. The reduced level of intracellular EGF in ITCH knockout cells compared to parent cells is only statistically significant at 2ng/ml. *t* test *** $p < 0.001$. The difference is non-significant (*n.s*) at 5, 10 and 20ng/ml EGF. *n* = 50 cells from three independent experiments., The nucleus is DAPI stained (blue). Scale bar, 25 μ m.

Figure 2

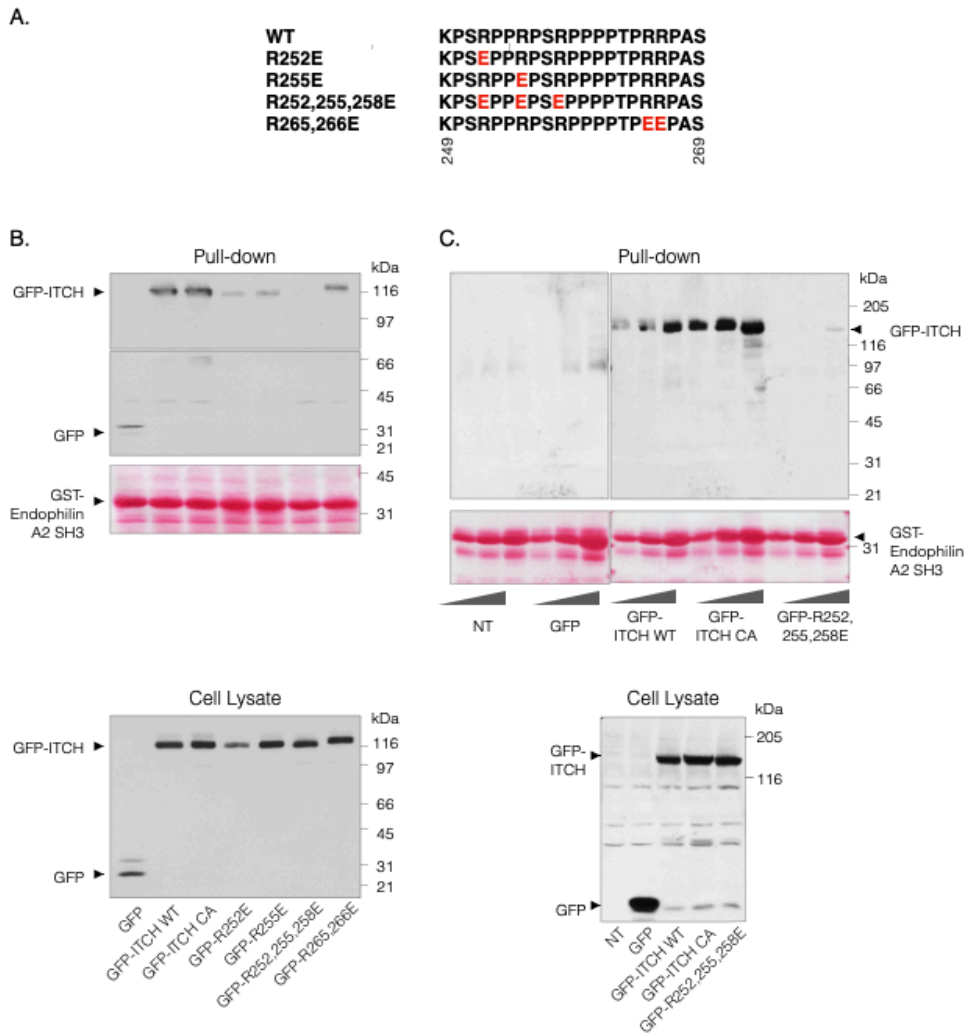


Figure2. Pull-down assays testing the affinity of PRR mutated full ITCH to the SH3 domain of endophilin A2.

A) Positions of the arginine residues replaced with glutamic acid in the region spanning from residue 249 to 269 in the PRR of ITCH. B) The cell lysate panel immunoblot shows the overexpressed levels of GFP, GFP-ITCH WT, CA, R252E, R255E, R252,255,258E and R265,66E in the total lysates of transfected HEK293T cells. 10 μ g of purified GST-endophilin A2 SH3 was incubated with lysates from these cells and the pull-down top panel shows GFP-tagged ITCH proteins bound to endophilin A2 SH3. The triple arginine mutant does not bind to the SH3 domain of endophilin A2. C) A similar experiment focusing only on the R252,55,58E mutant in comparison to GFP-ITCH WT and CA in the presence of a gradient of fusion proteins concentrations (5, 10 and 20 μ g). The cell lysate panel shows anti-GFP western blot of the starting material. The anti-GFP western blot of the pull-down shows GFP-tagged ITCH proteins bound to the different concentrations of purified fusion protein. ITCH residually binds to 20 μ g of endophilin A2 SH3. At the bottom of each pull-down experiment is the Ponceau-S staining for the fusion protein.

Figure3

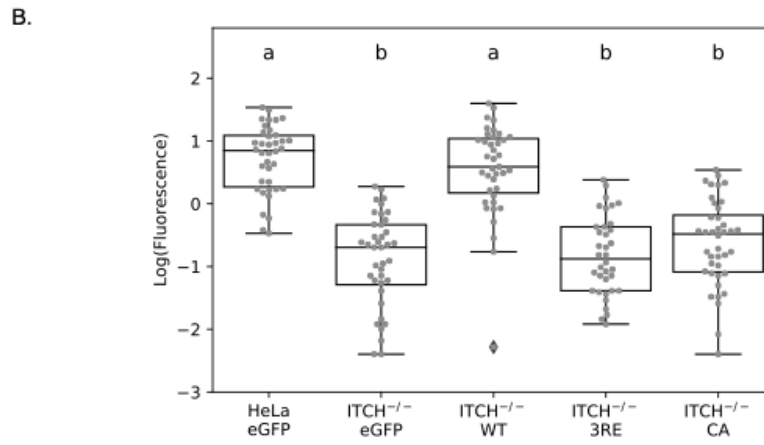
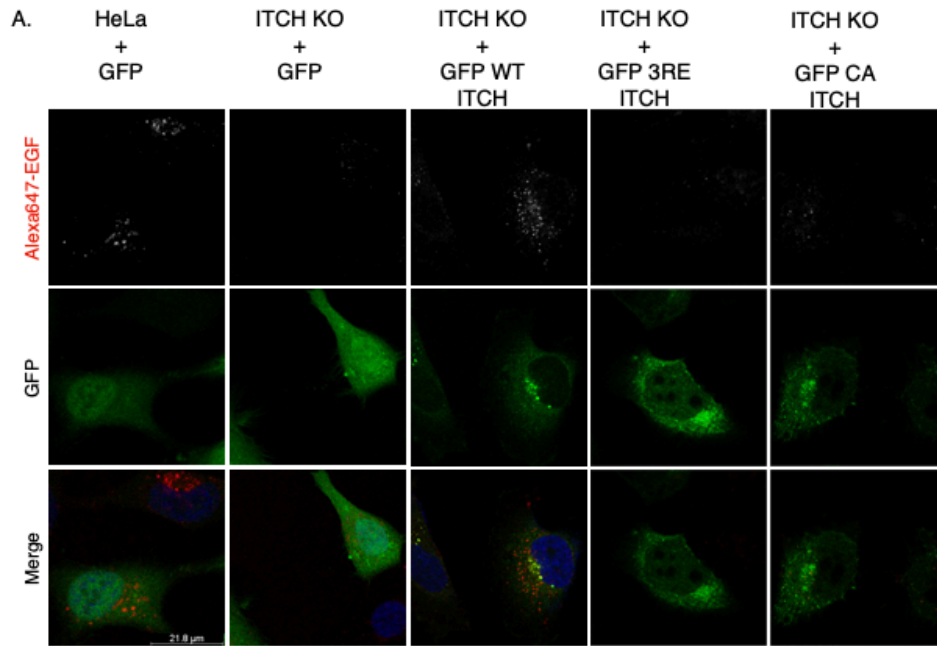


Figure3. Rescue experiment using ITCH CA and triple arginine mutant.

A) As a control (first lane), WT and ITCH Knockout HeLa cells were overexpressed with GFP. ITCH knockout cells expressing GFP-ITCH WT, CA and R252,55,58E were allowed to internalize 2 ng/ml AlexaFluor647-EGF (red) for 20min. B) Quantification of the mean value of intracellular EGF fluorescence and statistical significance determined by *Anova* and *Bonferroni* tests. a and b refer to two different groups of values significantly different one from another. Parent HeLa cells and ITCH^{-/-} cells overexpressed with GFP-ITCH WT (group a) are significantly different from ITCH^{-/-} cells overexpressed with GFP, GFP-ITCH CA or R252,255,258E (group b). *n=40 cells* from three independent experiments. The nucleus is DAPI stained (blue). Scale bar, 21 μm.

Figure4

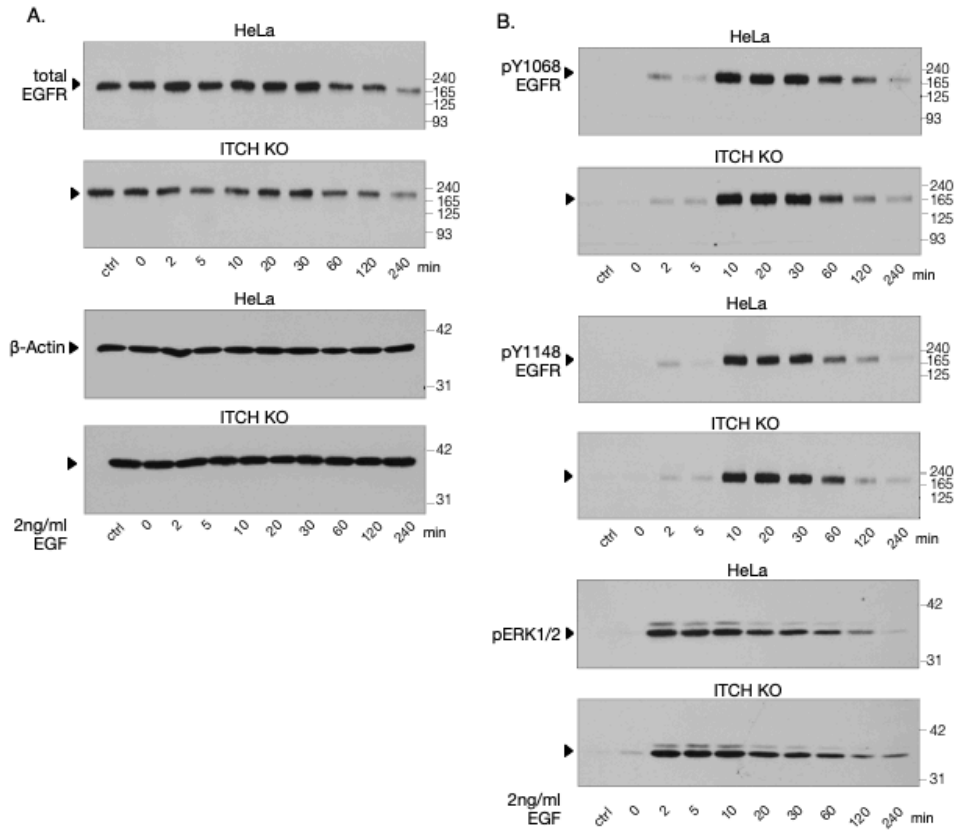
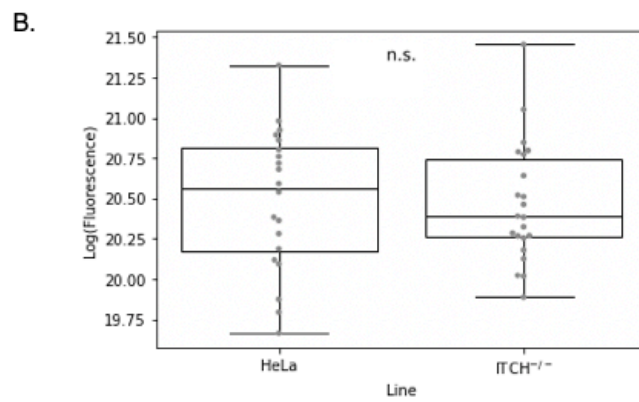
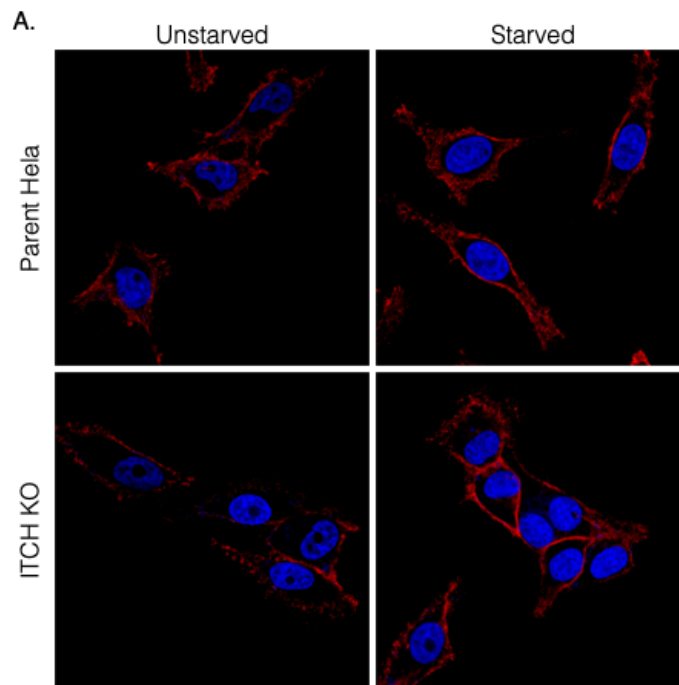


Figure4. Degradation of activated EGFR upon CME in ITCH^{-/-} cells.

After starvation for 2h, WT and ITCH knockout HeLa cells were stimulated with 2 ng/ml recombinant EGF for the indicated amounts of time. Total lysates were subjected to immunoblotting with A) anti-total EGFR and β -Actin as a loading control and B) anti-pY1068 and pY1148 EGFR to follow the activated degradation of the receptor over time and pERK1/2 to detect the effect on downstream signaling pathway. ITCH^{-/-} cells are showing a delay in phospho-EGFR degradation and an a prolonged ERK signaling.

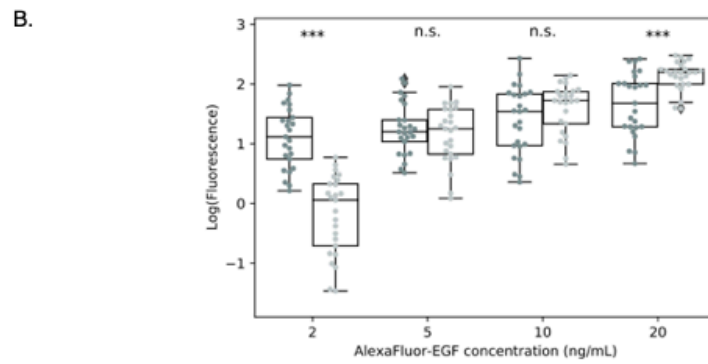
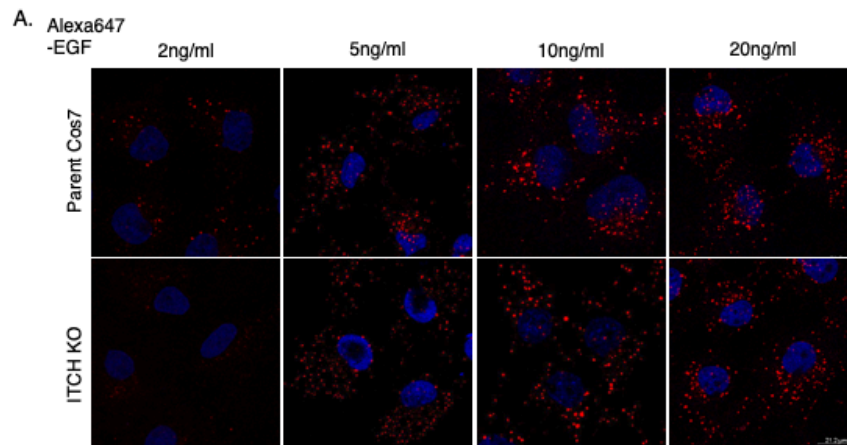
FigureS1



FigureS1. Immunofluorescence to compare the levels of extracellular EGFR in HeLa ITCH^{-/-} cells.

A) An antibody that recognizes the extracellular domain of EGFR was used, followed by Fluor568-conjugated secondary antibody. Images of starved or unstarved cells were captured at steady state. The red signal shows non internalized EGFR. B) Quantification showing mean value of intracellular EGF fluorescence. The difference is non-significant (*n.s*) based on *t* test, $p > 0.1$, $n = 20$. The nucleus is DAPI stained (blue).

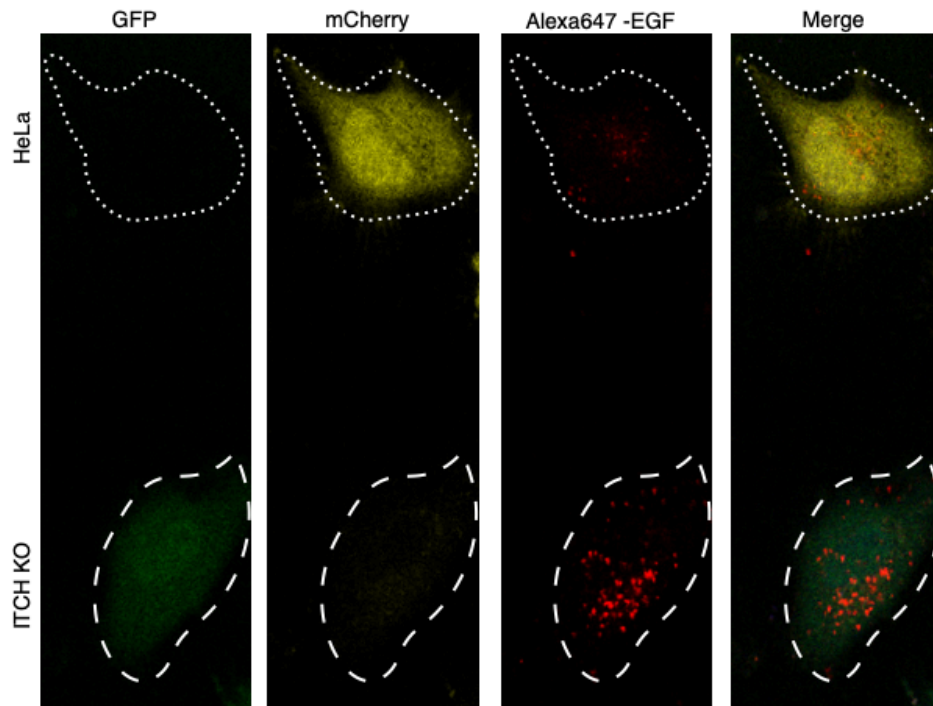
FigureS2



FigureS2. Endocytosis assay to detect clathrin-mediated internalization of EGF in Cos7 ITCH^{-/-} cells.

A) Uptake of different concentrations of AlexaFluor647-EGF by ITCH knockout Cos7 cells vs control cells upon starvation. Cells were starved for 2h and AlexaFluor647 EGF diluted in serum-free media was added at 20, 10, 5 and 2 ng/ml. Cells were gently acid washed to remove any extracellular bound EGF. Images were captured upon 20min of endocytosis. B) Quantification showing mean value of intracellular EGF fluorescence. The level of intracellular EGF in ITCH knockout cells compared to parent cells is statistically significant at 2ng/ml. *t* test *** $p < 0.001$. The difference is non-significant (*n.s*) at 5 and 10ng/ml EGF. *n* = 50 cells from three independent experiments. The nucleus is DAPI stained (blue). Scale bar, 21 μ m.

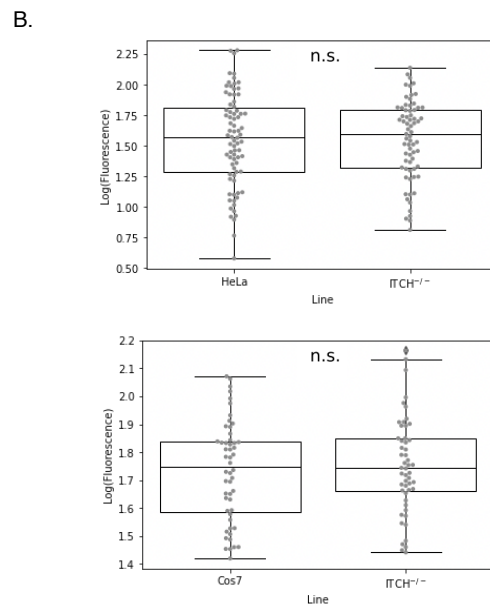
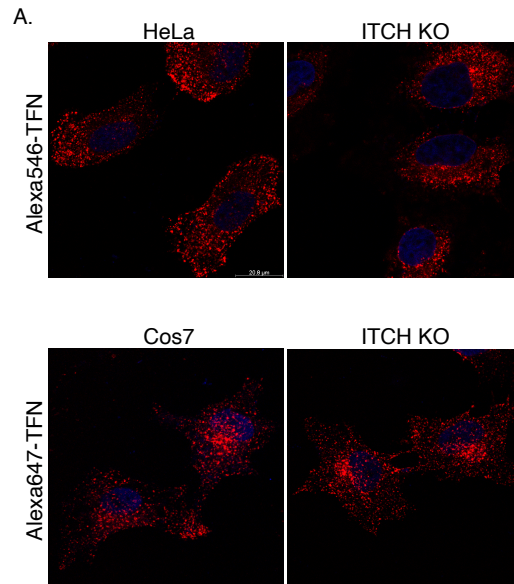
FigureS3



FigureS3. Endocytosis assay to detect clathrin-mediated internalization of EGF by a mosaïque of parent and ITCH^{-/-} cells.

HeLa cells are overexpressing GFP (green) and ITCH^{-/-} cells mCherry (yellow). Cells were captured in the same microscopic field after 20min of endocytosis using 2ng/ml of AlexaFluor-647 EGF. HeLa cell is shown with large lines, ITCH^{-/-} cell with tight lines.

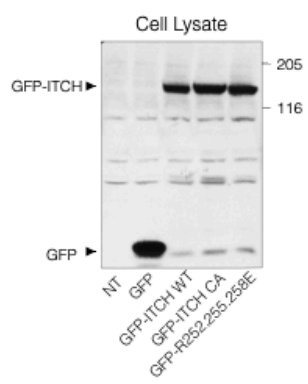
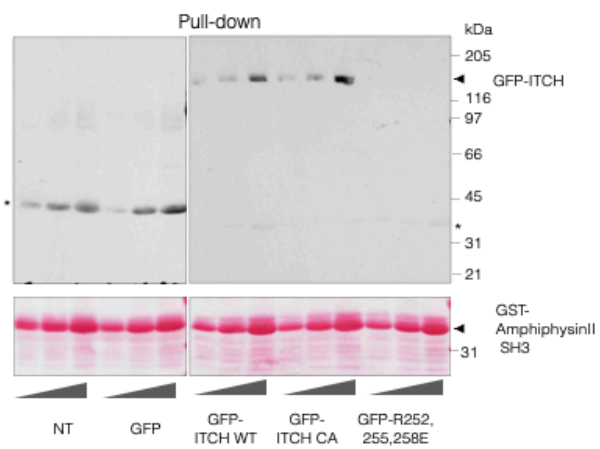
FigureS4



FigureS4. Endocytosis assay to detect clathrin-mediated internalization of transferrin in HeLa and Cos7 ITCH^{-/-} cells.

A) HeLa and Cos7 ITCH^{-/-} cells vs parent cells allowed to internalize AlexaFluor-transferrin. Cells were gently acid washed to remove any extracellular bound transferrin. Images were captured upon 20min of endocytosis. B) Quantification showing mean value of intracellular EGF fluorescence. The difference between ITCH knockout cells and parent cells is non-significant (*n.s*) in both cell lines. only statistically significant at 2ng/ml. *t* test $p > 0.1$, $n = 80$. The nucleus is DAPI stained (blue).

FigureS5



FigureS5. Pull-down assays testing the affinity of PRR mutated full ITCH to the SH3 domain of amphiphysin II.

The cell lysate panel immunoblot shows the overexpressed levels of GFP, GFP-ITCH WT, CA and R252,255,258E in the total lysates of transfected HEK293T cells. A gradient of purified GST-amphiphysin II SH3 concentrations (5, 10 and 20 μ g) was incubated with lysates from these cells and the pull-down shows GFP-tagged ITCH proteins bound to amphiphysin II SH3. At all concentrations, the triple arginine mutant does not bind to the SH3 domain of amphiphysin II.

Tables

Table1. Primers used for ITCH mutagenesis.

R252E-FWD	5'-ATCACTCTCAAATGGTGGTTTTAAACCTTCTGAGCCTCCAAGACCTTCAC-3'
R252E-REV	5'-GTGAAGGCTTTGGAGGCTCAGAAGGTTTTAAACCACCATTGAGAGTGAT-3'
R255E-FWD	5'-GTTTTAAACCTTCTAGACCTCCAGAGCCTTCACGACCACCACCACC-3'
R255E-REV	5'-GGTGGTGGTGGTCGTAAGGCTCTGGAGGCTAGAAGGTTTTAAAC-3'
R252-255-258E-FWD	5'CTCCATCACTCTCAAATGGTGGTTTTAAACCTTCTGAGCCTCCAGAGCCTCAGAGCCACCACCACCACCCCA-3'
R252-255-258E-REV	5'TGGGGTGGGTGGTGGTGGCTCTGAAGGCTCTGGAGGCTCAGAAGGTTTTAAACCACCATTGAGAGTGATGGAG-3'
R265-266E-FWD	5'-CACGACCACCACCACCACCAGAGGAGCCAGCATCTGTCAATGGTTCA-3'
R265-266E-REV	5'-TGAACCATTGACAGATGCTGGCTCCTCTGGGGTGGGTGGTGGTGGTCGTG-3'

Table2. Guide RNAs used for ITCH CRISPR/Cas9 knockout.

HeLa Exon7	gRNA1	GTGAAAATAGGAGAGTCAGT
	gRNA2	CCAAACATAAGGTCGAGAGT
Cos7 Exon1	gRNA	CGGGTGTTTACCGGGACTCC