

2M11.3457.6

Université de Montréal

***Caractérisation de la protéine grey-lethal et de son rôle  
dans le trafic intracellulaire***

par  
Janie Beauregard

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Science (M.Sc.)  
en Biologie moléculaire

Août, 2006

©, Janie Beauregard, 2006



QH

506

U54

2007

V.001

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
***Caractérisation de la protéine grey-lethal et de son rôle  
dans le trafic intracellulaire***

Présenté par :

Janie Beauregard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Benoit Coulombe

---

président-rapporteur

Dr. Jean Vacher

---

directeur de recherche

Dr. Daniel Sinnett

---

examineur externe

## RÉSUMÉ

L'homéostasie osseuse résulte en un équilibre entre la formation et la résorption de la matrice osseuse. Les ostéoblastes, des cellules d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la formation de la matrice tandis que ce sont les ostéoclastes, des cellules multinucléées de la lignée hématopoïétique, qui ont la fonction de résorber cette même matrice. L'ostéopétrose autosomale récessive est une maladie rare caractérisée par une accumulation anormale de tissu osseux due à un défaut de résorption. Il en résulte des os denses, fragiles, un sous-développement de la moelle osseuse et une anémie.

La souris grey-lethal est le modèle animal idéal pour l'étude de l'ostéopétrose récessive infantile maligne. En plus d'être ostéopétrotique, caractérisée par l'absence de cavité médullaire, cette souris a aussi un phénotype au niveau du pelage qui est gris au lieu d'être agouti. Nous avons montré que les ostéoclastes *gl/gl*, bien que normalement différenciés, sont incapables de résorber l'os dû à un défaut de formation de leur bordure plissée. Gl est donc essentiel à l'activation et à la fonction des ostéoclastes. La mutation affectant le gène chez la souris a été identifiée par clonage positionnel. La mutation chez la souris grey-lethal consiste en une délétion du promoteur, de l'exon 1 et d'une partie de l'intron 1 du gène ce qui entraîne l'abolition totale de l'expression de la protéine. Depuis, plusieurs mutations du gène ont été identifiées chez des patients ostéopétrotiques, révélant ainsi toute l'importance du rôle joué par *gl* dans l'ostéoclaste.

Ce mémoire porte sur la caractérisation de la protéine Gl afin d'en définir son rôle dans la cellule. Diverses approches complémentaires ont été entreprises pour l'étude de la protéine (338 a.a.). La caractérisation structurale et l'étude de localisation de la protéine Gl ont permis de démontrer qu'elle GL possède un peptide signal unique et un domaine transmembranaire en C-terminal. La protéine Gl (38kDa) possède aussi 10 sites de glycosylation qui résultent en une masse moléculaire apparente de ~60kDa. Cette protéine transmembranaire de type I localise au réticulum endoplasmique (RE) basée sur sa co-localisation avec la Calnexine (marqueur du RE). Ces résultats suggèrent que la protéine Gl fait partie du compartiment

vésiculaire intracellulaire et qu'elle participe au trafic protéique. De plus, l'identification de partenaires potentiels par crible double-hybrides a aidé à mieux définir encore la fonction de GL dans le trafic intracellulaire.

En somme, ces approches cellulaires et moléculaires complémentaires permettront de mieux définir le rôle général de la protéine GL et plus spécifiquement son rôle dans la maturation et l'activité des ostéoclastes en association avec ses partenaires protéiques.

Mots clés : ostéopétrose, ostéoclaste, grey-lethal, protéine, caractérisation, trafic intracellulaire

## SUMMARY

Bone homeostasis relies on a tight equilibrium between bone matrix formation and resorption. Osteoblasts, a cell type derived from mesenchymal precursors, are responsible for the formation of bone matrix whereas osteoclasts, a multinucleated cell derived from haematopoietic precursors, have the function of resorption of this same matrix. Autosomal recessive osteopetrosis is a rare disorder characterised by an abnormal accumulation of bone tissue due to a defect of resorption. This results in dense and fragile bones, underdevelopment of bone marrow and anaemia.

The grey-lethal (*gl*) mouse is the most relevant animal model for studying malignant infantile osteopetrosis. As well as being osteopetrotic, characterised by the absence of medullar cavity, this mouse has a coat color phenotype that is grey instead of agouti. We have demonstrated that *gl/gl* osteoclasts, although well differentiated, were unable to resorb bone due to a defect of their ruffled border formation. Gl is thought essential to osteoclasts activation and function. The mutation affecting the gene in the mouse has been identified by positional cloning. The mutation affecting the grey-lethal mouse consists in a deletion of the promoter, exon1 and part of intron1 which leads to total abolition of gene and protein expression. Since then, several mutations have been identified in osteopetrotic patients, revealing the importance of the role played by *gl* in osteoclasts.

This work presents the characterisation of the Gl protein in order to define its role in cells. Diverse complementary approaches have been undertaken for the study of the protein (338 a.a). The structural characterisation and localisation studies of the Gl protein have demonstrated that Gl possesses a unique signal peptide and a trans-membrane domain in its C-terminal region. The Gl protein (38kDa) also possesses 10 glycosylation sites resulting in a shift of mass to 60kDa. This type 1 transmembrane protein localises to the endoplasmic reticulum (ER) based on its colocalisation with Calnexin (ER marker). These results suggest that the Gl protein is part of the intracellular vesicular compartment and participates in

protein trafficking. Identification of potential partners by two-hybrids screening will allow defining the role of GL in intracellular trafficking.

In summary, these cellular and molecular complementary approaches will help to define the general role of GL protein and more specifically its role in maturation and activation of osteoclasts in association with specific proteins partners.

Key words: osteopetrosis, osteoclasts, grey-lethal, protein, characterisation, intracellular trafficking

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TITRE DU MÉMOIRE</b>	<b>i</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>v</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>xvi</b>
<b>DÉDICACE</b>	<b>xviii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>xix</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1. Le tissu osseux	2
1.1 Anatomie de l'os	2
1.2 Les types cellulaires du tissu osseux	4
1.2.1 Les ostéoblastes	4
1.2.2 Les ostéocytes	5
1.2.3 Les cellules bordantes	6
1.2.4 Les ostéoclastes	6
1.3 La matrice extracellulaire	8
2. Les ostéoblastes et les ostéoclastes	10
2.1 La différenciation des ostéoblastes	10
2.1.1 Rôles de Runx2 et Ostérix	10
2.1.2 Rôle des BMPs	11
2.2 La différenciation des ostéoclastes	12
2.2.1 Les progéniteurs des ostéoclastes	12
2.2.2 Ostéoclastogenèse	13
3. Le remodelage osseux	17
3.1 La phase de quiescence et d'activation	17

3.2 Phase de résorption	17
3.3 Phase d'inversion	18
3.4 Phase de formation	19
4. Les désordres osseux	21
4.1 L'ostéoporose	21
4.2 Maladie de Paget	21
4.3 Ostéomalacie et « Rickets »	22
4.4 L'ostéopétrose	22
4.4.1 Modèles murins de défaut de différenciation des ostéoclastes	23
4.4.2 Modèles murins de défaut de fonction des ostéoclastes	24
4.4.3 L'ostéopétrose chez l'humain	26
5. Biosynthèse et trafic des glycoprotéines	29
5.1 Généralités	29
5.2 Peptide signal et translocation	30
5.2.1 Le clivage du peptide signal et l'ancrage à la membrane	32
5.3 La N-Glycosylation	33
5.3.1 Biosynthèse de la partie centrale de l'oligosaccharide	35
5.3.2 L'oligosaccharyltransférase (OST)	35
5.3.3 Le repliement des glycoprotéines	36
5.3.4 Le cycle Calnexine /Calreticuline	37
5.3.5 La dégradation des glycoprotéines dépendante du RE	39
5.3.6 Export et rétention au RE	41
5.3.7 Remodelage des sucres dans le Golgi	42
5.3.8 Les N-glycans et les lysosomes	44
6. Gène et protéine Gl	46
6.1 Phénotypes de la souris grey-lethal ( <i>gl</i> )	46
6.1.1 Phénotype squelettique	46
6.1.2 Phénotype du pelage	47
6.2 Caractérisation cellulaire et moléculaire de la souris <i>gl</i>	47
6.2.1 Les ostéoclastes <i>gl/gl</i>	48
6.2.2 Les mélanocytes	50

6.3 Le gène <i>gl</i>	50
6.3.1 Identification de la mutation <i>gl</i>	52
6.3.2 L'expression du gène <i>gl</i>	52
6.4 Grey-lethal chez l'humain	52
6.4.1 Mutation ostéopétrotique du gène Gl humain	54
6.5 La protéine Gl	54
6.5.1 Homologie humaine de la protéine Gl	57
7. Objectifs	58
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>59</b>
1. Caractérisation de la protéine	60
1.1 Constructions	60
1.2 Peptide signal	61
1.3 Charge et chasse (Pulse-Chase)	62
1.4 Domaine Transmembranaire et Sécrétion	63
1.5 Études de glycosylation	63
1.5.1 Tunicamycine et Brefeldine A	63
1.5.2 KIF, CST, DMJ, MDNJ	64
1.5.3 EndoH et pGNaseF	64
2. Localisation de la protéine	66
2.1 Constructions	66
2.2 Mutagenèse de la région C-Terminale de Gl	68
2.3 Immunofluorescence	69
3. Les anticorps	70
3.1 Constructions	70
3.1.1 GL-His-Tag	70
3.1.2 GL-CT-GST	71
3.2 Production des antigènes	71
3.2.1 Production de GL-His-Tag	72
3.2.2 Production de GL-CT-GST	73

3.3 Immunisation des lapins	74
3.4 Purification des sérums	75
3.5 Tests des anticorps	76
3.5.1 Immunofluorescences	76
3.5.2 Immunoprécipitations	77
4. Crible Double-hybrides	79
4.1 Construction	79
4.2 Contrôles	80
4.3 Crible double-hybrides	82
4.4 Analyse des clones et séquençage	83
4.5 Clonage dans un vecteur d'expression de mammifère	84
4.6 Transfection et immunoprécipitation	84
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b>	<b>90</b>
1. Caractérisation structurale de la protéine Gl	91
1.1 La protéine Gl possède un peptide signal	91
1.2 Gl est une protéine stable de 60 kDa	92
1.3 La protéine Gl possède un domaine transmembranaire	94
1.4 La protéine Gl est N-Glycosylée	95
1.5 La protéine Gl réside dans le réticulum endoplasmique	98
1.5.1 La protéine Gl est sensible à l'EndoH	99
2. Localisation de la protéine Gl	102
2.1 La protéine Gl est localisée et retenue au RE	103
2.1.1 Transfection de GL-FL-pEGFP.N1	103
2.1.2 Co-localisation avec la Calnexine	104
2.2 Localisation des mutants de Gl en fusion GFP	104
2.2.1 Délétion des domaines transmembranaire et C-terminal de la protéine Gl	104
2.2.2. Délétion de la région C-terminal de la protéine Gl	105

2.2.3 Mutagenèse des lysines de la région C-terminale cytosolique de Gl	106
3 . Production d'anticorps contre la protéine Gl	108
3.1 Tests en immunofluorescence des anticorps	109
3.2 Tests des anticorps en immunoprécipitation	110
3.3 Tests des anticorps en co-immunoprécipitation	113
4. Crible Double-Hybrides	115
4.1 Isolation et analyse des clones	115
4.2 Transfections et immunoprécipitations	118
4.3 Co-immunoprécipitation avec GL-FL-pEGFP.N1	118
 <b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b>	 <b>123</b>
 La souris grey-lethal	 124
L'étude de l'ostéopétrose	124
Les rôles connus de la protéine Gl	126
Résultats	126
Cacactérisation structurale de la protéine GL	127
Les études de localisation de la protéine Gl	128
• La perte du domaine transmembranaire et C-terminal de Gl	129
• La perte du domaine C-terminal de Gl	129
Les partenaires du crible double-hybrides	131
• La protéine Contactin 4	133
• La protéine « ubiquitin-conjugating enzyme E2N »	134
• Ran binding protein 9 (RanBPM)	138
Partenaires en TAP-tag	140
Gl comme sous-unité $\beta$ de CLC-7	141
La fonction de Gl	145

<b>CONCLUSION</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>166</b>

## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1 : Morphologie des os longs	3
Figure 2 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes	5
Figure 3 : Ostéoclaste mature	7
Figure 4 : Différenciation des ostéoblastes	11
Figure 5 : Différenciation des précurseurs des ostéoclastes	13
Figure 6 : Différenciation et activation des ostéoclastes	14
Figure 7 : Ostéoclastogénèse supportée par les ostéoblastes	15
Figure 8 : Le remodelage osseux	20
Figure 9 : Voies de signalisation de différenciation et activation des ostéoclastes	25
Figure 10 : La souris sclérotique <i>oc/oc</i> en comparaison à un patient atteint d'ostéopétrose infantile maligne	27
Figure 11 : Modèles d'ostéopétrose murins et leurs homologues chez l'humain	28
Figure 12 : Le trafic protéique	30
Figure 13 : Translocation co-translationnelle	31
Figure 14 : Topologie des protéines	33
Figure 15 : Le cœur du N-oligosaccharide	36
Figure 16: Le cycle Calnexine/Calreticuline	39
Figure 17 : ERAD et rétro-translocation	40
Figure 18 : La voie sécrétoire et ses organelles	42
Figure 19 : Biosynthèse des N-oligosaccharides	43
Figure 20 : Phénotypes de la souris ( <i>gl</i> )	48
Figure 21 : Caractérisation des ostéoclastes <i>gl</i>	51
Figure 22 : Caractérisation du gène <i>gl</i>	53
Figure 23 : Mutation ostéopétrotique du gène <i>Gl</i> humain	55
Figure 24 : La protéine Grey-Lethal	56
Figure 25 : Analyse de la protéine Gl	57

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Figure 26 : Peptide signal	92
Figure 27 : Charge et chasse (Pulse-Chase)	93
Figure 28 : Domaine transmembranaire et sécrétion	95
Figure 29 : Prédiction des sites de N-Glycosylation de la protéine Gl	96
Figure 30 : Traitements à la Tunicamycine et BFA	98
Figure 31 : Sites de clivages de l'EndoH et PNGaseF	99
Figure 32 : Traitements à l'EndoH et PNGaseF	100
Figure 33 : Traitements au KIF, CST, DMJ, MDNJ	102
Figure 34 : Immunofluorescence de transfections transitoires de GL-FL-pEGFP.N1	103
Figure 35 : Co-localisation de GL-FL-pEGFP.N1 avec la Calnexine	104
Figure 36 : Transfections des mutants de GL dans pEGFP.N1	107
Figure 37 : Anticorps produits contre la protéine Gl	108
Figure 38-A : Tests des anticorps GL-HIS en immunofluorescence	109
Figure 38-B : Tests des anticorps VL en immunofluorescence	110
Figure 39 : Tests des anticorps en immunoprécipitation	111-112
Figure 40 : Tests des anticorps en co-immunoprécipitation	113
Figure 41 : Crible double-hybrides	116
Figure 42 : Analyse des immunoprécipitation par Western des clones double-hybrides	119
Figure 43 : Co-immunoprécipitation de GL et des protéines exprimées à partir des clones double-hybrides	120

## ANNEXE

Figure S1 : Constructions pour les études de caractérisation et localisation de la protéine	166
Figure S2 : Constructions pour les anticorps, le double-hybrides et le TAP-Tag	167
Figure S3 : Procédure de la purification TAP	168

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau I : Séquences des amorces PCR	87
Tableau II : Contrôles de « mating »	88
Tableau III : Contrôles de « mating » de la librairie de levure	89

### CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Tableau IV : Sommaire des tests des anticorps produits lors de cette étude	114
Tableau V : Résultats du crible de la librairie de levure double-hybrides	117
Tableau VI : Clones double-hybrides sélectionnés	121
Tableau VII : Résumé des clones double-hybrides en co-immunoprécipitation	122

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

a.a. : acide aminé  
Ade : adénine  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
Amp : ampicilline  
ARN : acide ribonucléique  
BSA : Bovine serum albumine  
dNTP : désoxyribonucéoside triphosphate  
DMSO : Dimethylsulfoxide  
DO : densité optique  
FBS : Fetal Bovine Serum  
GAM : goat anti mouse  
GAR : goat anti rabbit  
*gl* : gène grey-lethal  
GL : protéine grey-lethal  
His : histidine  
HRP : horse radish peroxidase  
IgG : immunoglobulines  
Kan : kanamycine  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
Leu : leucine  
mA: milliAmpère  
ml : millilitre  
mg : milligramme  
ng : nanogramme  
NGS : normal goat serum  
pb : paire de bases  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PMSF : Phenylmethylsulfonyl-Fluorid  
RE : réticulum endoplasmique

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium dodécylsulfate

Trp : tryptophane

μg : microgramme

μl : microlitre

V : Volts

X-α-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

**DÉDICACE**

À mon conjoint François...

À mes parents...

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur, le Dr. Vacher, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fait confiance pour prendre en charge le projet de caractérisation de la protéine GI. Je tiens à le remercier pour son encadrement technique et intellectuel ainsi que pour son support financier tout au long de mes travaux de recherches.

Un énorme merci au Dr. Seidah et à sa technicienne Suzanne Benjannet pour leur contribution au projet. Merci aussi au Dr. Coulombe et à sa technicienne Annie Bouchard pour leur aide dans l'expérience TAP-TAG.

J'aimerais évidemment remercier tous les membres du laboratoire, tout particulièrement Mathieu et Monica, pour leur soutien au cours de ces trois années. Merci à Sean N'Guyen pour son aide lors du crible double-hybrides.

Merci aux IRSC (Skeletal Health Training Program) pour le soutien financier.

Merci aux membres du Jury d'avoir accepté de corriger mon mémoire.

Merci à mon conjoint François, à ma famille et à mes amis pour vos encouragements soutenus tout au long de mes études. Un merci supplémentaire à mon amoureux François... ton amour, ton soutien et tes encouragements ont été réconfortants et essentiels pour passer au travers ces trois années. Merci encore à tous et je vous aime.

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## 1. Le tissu osseux

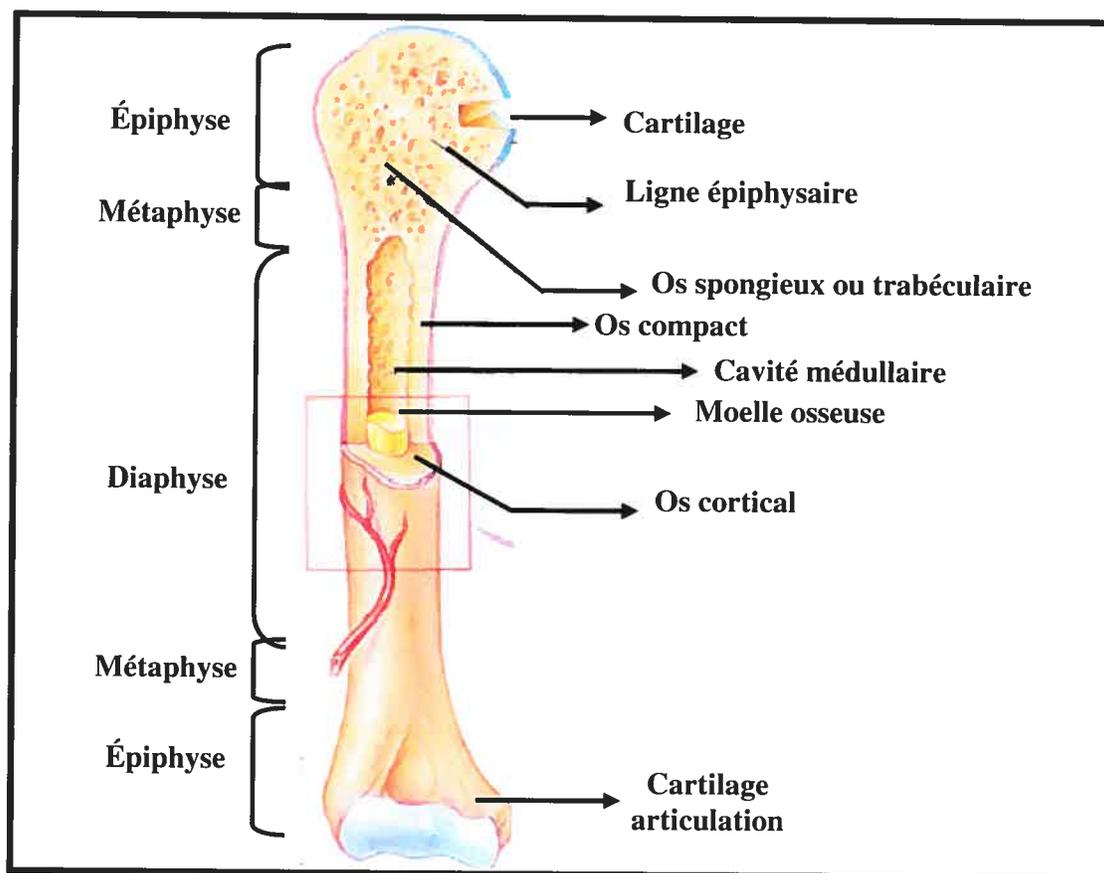
Le tissu osseux est un tissu squelettique conjonctif spécialisé caractérisé par la solidité de sa matrice extracellulaire. C'est un tissu de soutien qui est en renouvellement constant. Le squelette comporte trois fonctions principales : une fonction mécanique, une fonction métabolique et une fonction hématopoïétique.

C'est la résistance du tissu osseux qui lui confère sa fonction mécanique et/ou de locomotion. La capacité de l'os à supporter les contraintes mécaniques lui donne son rôle de soutien du corps et de protection des organes. Le dynamisme du tissu osseux, qui est constamment remodelé par l'effet de la pression mécanique, entraîne la libération et/ou le stockage de sels minéraux. Ce contrôle du métabolisme phosphocalcique de l'os lui attribue sa fonction métabolique de réserve en calcium et en phosphore. La fonction hématopoïétique de l'os se situe au niveau de son espace médullaire qui contient la moelle osseuse où se situent les cellules souches à l'origine des trois lignées de cellules sanguines et/ou globules (cellules rouges, granuleuses ou blanches et plaquettaires) et les cellules osseuses. Les cellules stromales de la moelle osseuse fourniront le support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques dont certaines seront des cellules souches capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes,...).

### 1.1 Anatomie de l'os

Le tissu osseux primaire est le premier tissu formé qui est destiné à être remplacé et est de type fibreux. Chez l'adulte, le tissu osseux est lamellaire puisque la matrice osseuse est disposée en lamelles superposées de collagène. Les os sont principalement constitués de tissu osseux mais contiennent aussi du tissu hématopoïétique, du tissu conjonctif, du tissu cartilagineux, du tissu adipeux, des vaisseaux et des nerfs. Les trois types anatomiques de l'os sont les os longs (tibia, fémur), les os courts qui ont une ossification endochondrale et les os plats (sternum, côtes calvaria) à ossification membranaire. Les os sont généralement constitués d'une zone externe de tissu osseux compact et d'une zone interne de tissu spongieux. Le tissu osseux compact et/ou cortical représente 85% de l'os et 95% du poids du tissu osseux et a un rôle mécanique. Il est constitué d'une enveloppe résistante composée d'ostéons cylindriques (systèmes de Havers) alignés de façon parallèle à la diaphyse. Les

ostéons sont composés de lamelles osseuses concentriques disposées autour du canal de Havers. Les canaux contiennent les capillaires sanguins et les nerfs amyéliniques enrobés de tissu conjonctif. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux, les canaux de Volkmann. Le tissu spongieux et/ou trabéculaire est retrouvé à l'intérieur des os courts et plats et dans les épiphyses et métaphyses des os longs. Il représente 10% du tissu osseux et a une fonction métabolique. Il est formé de trabécules de tissu osseux ramifiés délimitant les espaces occupés par la moelle osseuse et les vaisseaux (Figure 1) (Guise and Mundy, 1998).



**Figure 1 : Morphologie des os longs**

Structures retrouvées dans les os longs : épiphyse, diaphyse, métaphyse et la cavité médullaire contenant la moelle osseuse.

Adapté de [www.training.seer.cancer.gov](http://www.training.seer.cancer.gov)

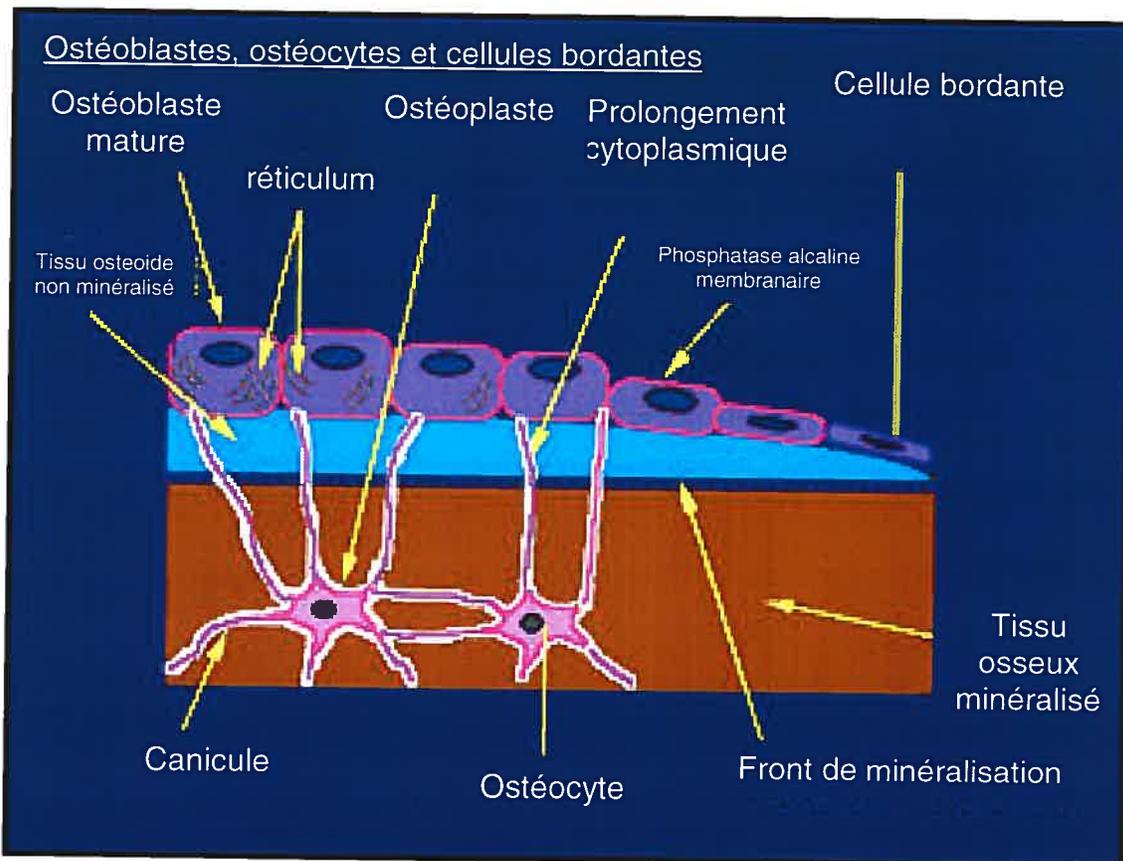
## 1.2 Les types cellulaires du tissu osseux

Il existe deux lignées de cellules osseuses : la lignée ostéoblastique et la lignée ostéoclastique. La lignée ostéoblastique comprend les cellules dites ostéoformatrices qui sont les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes. La lignée ostéoclastique comprend les pré-ostéoclastes et les ostéoclastes qui sont des cellules ostéorésorbantes. Seuls les ostéocytes se retrouvent à l'intérieur de la matrice osseuse tandis que les autres types cellulaires se situent à la surface du tissu osseux (Figure 2). Les cellules de types ostéoformatrices dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes tandis que les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocyttaire.

### 1.2.1 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes dérivent de la division de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse de l'os trabéculaire (Katagiri and Takahashi, 2002). Les ostéoblastes sont les cellules formatrices de la matrice osseuse et sont situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance. Leur noyau est situé au pôle basal de la cellule. Les ostéoblastes élaborent les constituants organiques de la matrice extracellulaire dont la principale et plus abondante protéine extracellulaire qui est le collagène de type I (Mackie, 2003). Les ostéoblastes sont responsables de la minéralisation de l'os, leur cytoplasme est donc riche en organites impliqués dans la synthèse protéique comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Leur membrane plasmique est abondante en phosphatase alcaline (ALP), une enzyme qui régule l'état d'activation des phosphoprotéines (Christenson, 1997). Celle-ci passe dans le sang circulant et est un index de la formation osseuse.

Les ostéoblastes reposent sur un tissu non minéralisé appelé ostéoïde qui est formé de collagène, de protéines non collagéniques (ostéocalcine) et de glycosaminoglycanes. Lorsque les ostéoblastes ont terminé leur déposition de matrice, leur devenir est variable : ils peuvent se transformer en ostéocytes en s'entourant de matrice extracellulaire, ils peuvent devenir quiescents sous forme de cellules bordantes de la surface osseuse ou peuvent mourir par mort cellulaire programmée ou "apoptose" (Aubin *et al.*, 1995). Les mécanismes de régulation des ostéoblastes seront mieux définis au prochain chapitre.



**Figure 2 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes**

Les ostéoblastes sont responsables de la formation osseuse, les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés qui ont peu de fonction métaboliques et les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos.

<http://dossier.univ-st-etienne.fr/lbto/www/tissu-osseux/chapitres/2origin.html>

### 1.2.2 Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés qui ne peuvent plus se diviser et qui sont entourés de matrice extracellulaire minéralisée. Environ 10 à 20 % des ostéoblastes deviendront des ostéocytes. Les ostéocytes se situent dans l'ostéoplaste et sont reliés entre eux par des jonctions de leurs prolongements cytoplasmiques. Ils communiquent entre eux par ces canicules formant un réseau. Ces cellules ont une activité métabolique limitée mais participent au maintien de la matrice osseuse et à l'homéostasie du calcium (Manolagas, 2000).

### 1.2.3 Les cellules bordantes

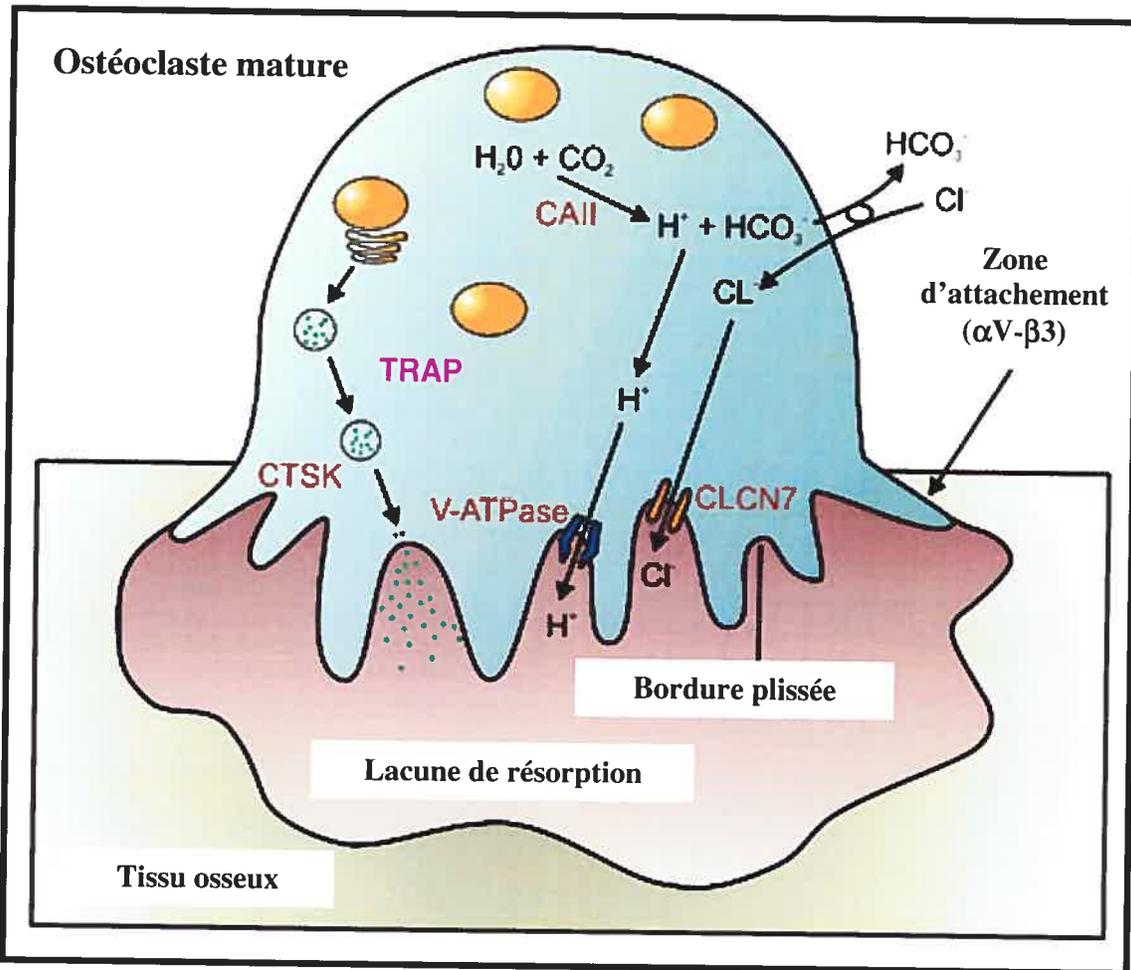
Chez l'adulte, seules 15% des surfaces trabéculaires sont recouvertes d'ostéoblastes actifs. La majorité de la surface trabéculaire est recouverte de cellules bordantes qui séparent l'espace osseux de l'espace médullaire. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos qui ne possèdent aucune activité de synthèse protéique mais qui ont la capacité de se différencier en ostéoblastes actifs. Ces cellules sont situées à la surface osseuse qui n'est pas soumise à la formation ou la résorption (Parfitt *et al.*, 1996). Ce sont des cellules possédant peu d'organites et qui sont reliées entre elles et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes.

### 1.2.4 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes ont comme fonction de résorber le tissu osseux ancien. Ce sont des cellules post-mitotiques très volumineuses avec un diamètre de 20 à 200  $\mu\text{m}$ . Elles sont aussi plurinucléées (10-20 noyaux en moyenne) puisque issues de la fusion de cellules mononucléées de la lignée hématopoïétique monocyte/macrophage (Suda *et al.*, 1992). Ce sont des cellules très mobiles qui se déplacent d'une lacune de résorption à l'autre. Lorsque l'ostéoclaste est activé, il développe son appareil lysosomal et se polarise en un domaine basolatéral et un domaine apical qui développe une bordure plissée en contact avec la surface osseuse et cet espace est favorable aux échanges métaboliques. La zone de contact de l'ostéoclaste à la matrice osseuse est dénuée de tout organite (zone claire) tandis que le cytoplasme est riche en vacuoles, vésicules et lysosomes contenant les enzymes de résorption de la matrice osseuse (Vaananen and Horton, 1995b).

Le marqueur le plus utilisé pour l'identification des ostéoclastes est la présence de l'activité de l'acide phosphatase tartrate-résistante (TRAP) dans leur cytoplasme (Suda *et al.*, 1997). Les ostéoclastes matures se caractérisent aussi par la présence du récepteur à la calcitonine, une hormone dont l'effet entraîne une rétraction et une inhibition de l'ostéoclaste et par des récepteurs à la vitronectine, une intégrine communément appelée récepteur  $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$

( $\alpha V$ - $\beta 3$ ) qui peut également se lier à l'ostéopontine, une molécule nécessaire à l'adhésion de l'ostéoclaste via les podosomes (Marchisio *et al.*, 1988; Wada *et al.*, 1997). L'attachement à la surface osseuse par les récepteurs  $\alpha V$ - $\beta 3$  se nomme la zone d'attachement et permet la formation de la lacune de résorption (lacune de Howship).



**Figure 3 : Ostéoclaste mature**

L'attachement via l'intégrine ( $\alpha V$ - $\beta 3$ ) induit la polarisation et l'activation de l'ostéoclaste. La bordure plissée se forme et il y a sécrétion de protons et enzymes nécessaires à la résorption. Adapté de (Bailemans *et al.*, 2005b)

Lorsque l'ostéoclaste est activé, il y a induction de sécrétion de protons  $H^+$  par les pompes vacuolaires  $H^+$ -ATPase ou V-ATPase situées dans la bordure plissée et il y a aussi sécrétion d'enzymes protéolytiques lysosomales comme la cathépsine K (CTSK ou CATK), TRAP et

l'anhydrase carbonique II (CAII) dans la lacune de résorption (Blair *et al.*, 1989; Vaananen *et al.*, 1990). Les pompes V-ATPases sont associées aux canaux chlore CLC7 qui permettent le passage d'ions chlore (Cl<sup>-</sup>) pour compenser les différences de potentiel membranaire de la lacune (Blair and Schlesinger, 1990; Kornak *et al.*, 2001b). C'est l'acidification de la lacune de résorption par les protons qui entraîne l'activation de TRAP (phosphatase acide tartrate résistante) et CATK qui sont les deux enzymes responsables de la dégradation de la matrice minérale et collagénique de l'os (Figure 3) (Balemans *et al.*, 2005a; Boyle *et al.*, 2003; Halleen *et al.*, 1999). Les mécanismes de différenciation des ostéoclastes seront définis dans le prochain chapitre.

### 1.3 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire de l'os est calcifiée et comprend une partie organique et une phase minérale. La matrice extracellulaire organique est composée essentiellement de microfibrilles de collagène I minéralisée (Mackie, 2003). Le collagène est une glycoprotéine fibreuse rigide en forme de tresse qui est déposée de façon très organisée, d'un aspect lamellaire (Chandrasekhar *et al.*, 1984). La matrice extracellulaire est aussi composée de protéines non collagéniques comme les protéoglycanes, de sialoprotéines osseuses (ostéopontine), d'ostéonectine, d'ostéocalcine et de thrombospondine et fibronectine.

L'ostéocalcine est spécifique du tissu osseux et a une grande affinité pour l'hydroxyapatite. Sa fonction est d'inhiber la formation osseuse. Cette protéine est en partie synthétisée par l'ostéoblaste et passe dans la circulation sanguine donc peut être utilisée comme marqueur de la formation ostéoblastique (Ambroszkiewicz *et al.*, 2002). L'ostéonectine quant à elle est la glycoprotéine la plus abondante des protéines non collagéniques et a comme fonction de lier le collagène de type I. Les sialoprotéines comme l'ostéopontine auraient aussi un rôle dans l'adhésion cellulaire (Terminé *et al.*, 1981). La thrombospondine et la fibronectine sont les autres protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire (Mackie and Ramsey, 1996) tandis que les protéoglycanes (glycosaminoglycanes) jouent un rôle dans l'agencement des protéines de collagène (Fisher *et al.*, 1983).

La matrice extracellulaire contient aussi les cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes, ce qui joue un rôle crucial dans le remodelage osseux et la minéralisation de

la matrice extracellulaire. La phase minérale est constituée de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium) et de carbonate de calcium. L'os qui contient 98% du réservoir de calcium organique joue donc un rôle important dans le métabolisme phosphocalcique. La mobilisation du calcium est rapide grâce à l'activation des ostéoclastes par les hormones du métabolisme phosphocalcique comme la parathyroïde hormone (Terminé *et al.*, 1981).

## 2. Les ostéoblastes et les ostéoclastes

Les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse sont les cellules responsables de la régulation de la différenciation des ostéoclastes. C'est la découverte de nouveaux membres de la famille récepteur-ligand TNFs « *Tumor Necrosis Factors* » qui a clarifié les mécanismes de différenciation des ostéoclastes régulés par les ostéoblastes (Katagiri and Takahashi, 2002).

### 2.1 La différenciation des ostéoblastes

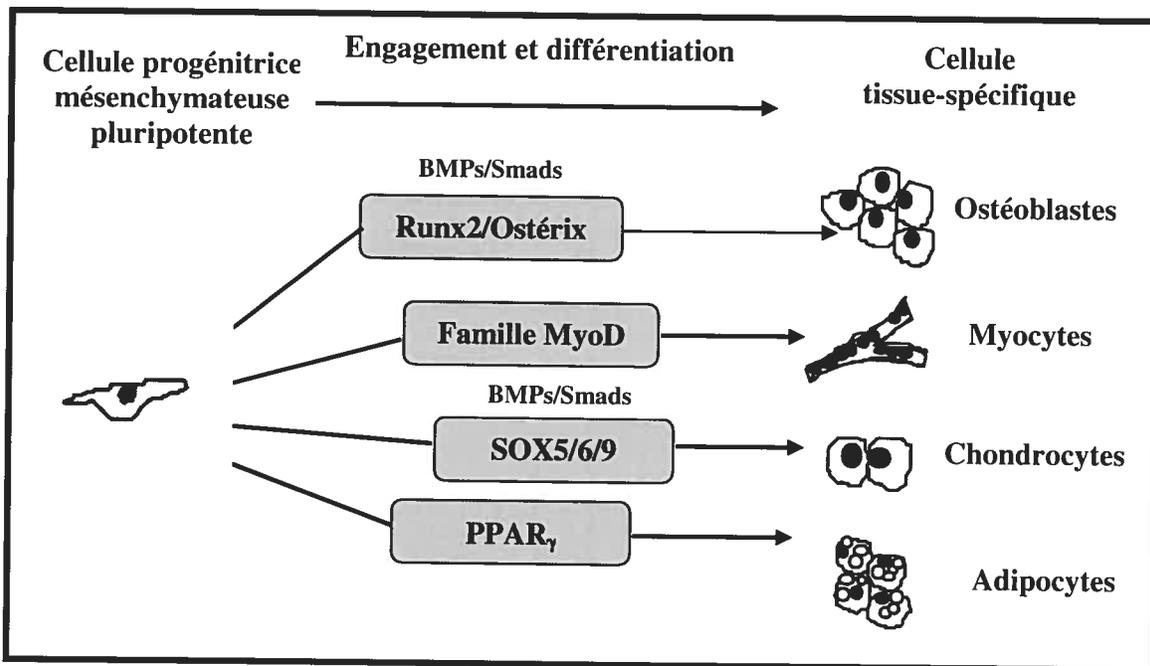
Les ostéoblastes sont des cellules qui dérivent de cellules mésenchymateuses non différenciées, tout comme les chondrocytes, les myocytes et les adipocytes (Rodan, 2003). Lors de leur différenciation, les cellules progénitrices acquièrent des phénotypes spécifiques sous le contrôle de facteurs de régulation spécifiques. Les cellules progénitrices vont acquérir leur phénotype tissu-spécifique tout en perdant leur pluripotentialité et ce sous le contrôle de divers stimuli. Par exemple, certains facteurs de transcription tissu-spécifiques comme Runx2 et Osterix régulent la différenciation des cellules progénitrices en ostéoblastes.

#### 2.1.1 Rôles de Runx2 et Ostérix

Ces facteurs de transcription sont essentiels à la différenciation des ostéoblastes puisque les souris mutantes de ces facteurs ne produisent pas d'ostéoblastes et par conséquent pas de tissu osseux. (Komori *et al.*, 1997). Runx2 semble interagir dans la signalisation des BMPs « *Bone Morphogenetic Proteins* » par la voie des Smads (voir plus bas) (Hanai *et al.*, 1999). L'expression de Runx 2 est élevée seulement chez les ostéoblastes matures. Runx2 pourrait aussi réguler la différenciation des chondrocytes. Ostérix quant à lui est un facteur de transcription de type doigt de zinc « *zinc finger* » dont la perte d'activité entraîne une absence de formation d'os malgré l'expression de Runx2. Ostérix agirait donc en aval de Runx2 (Nakashima *et al.*, 2002).

### 2.1.2 Rôle des BMPs

Les protéines BMPs sont des facteurs de croissance de la famille des TGF- $\beta$  « *Transforming Growth Factor- $\beta$*  » qui jouent un rôle critique dans la différenciation des ostéoblastes et qui agissent via les Smads qui sont aussi des facteurs de transcription (Schmitt *et al.*, 1999). Plusieurs gènes de BMPs ont été identifiés et de nombreuses protéines recombinantes sont capables d'induire la formation osseuse (Kingsley, 1994;Kingsley, 2001). Les BMPs sont les régulateurs clés de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes durant le développement. *In vitro* les BMPs induisent l'expression de l'ALP, de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et de son récepteur (PTHrP), du collagène de type I, de l'ostéocalcine, de Runx2 et Ostérix et stimulent la formation de nodules osseux en culture (Figure 4) (Ducy *et al.*, 1997;Yamaguchi *et al.*, 2000).



**Figure 4 : Différenciation des ostéoblastes**

Différenciation des ostéoblastes à partir de cellules progénitrices mésenchymateuses pluripotentes. Les facteurs de transcriptions MyoD, Sox et PPAR $\gamma$  sont impliqués dans la différenciation des myocytes, chondrocytes et adipocytes tandis que Runx2 et Ostérix déterminent la voie des ostéoblastes conjointement avec l'activation des BMPs et la voie des Smads. Adapté de (Katagiri and Takahashi, 2002).

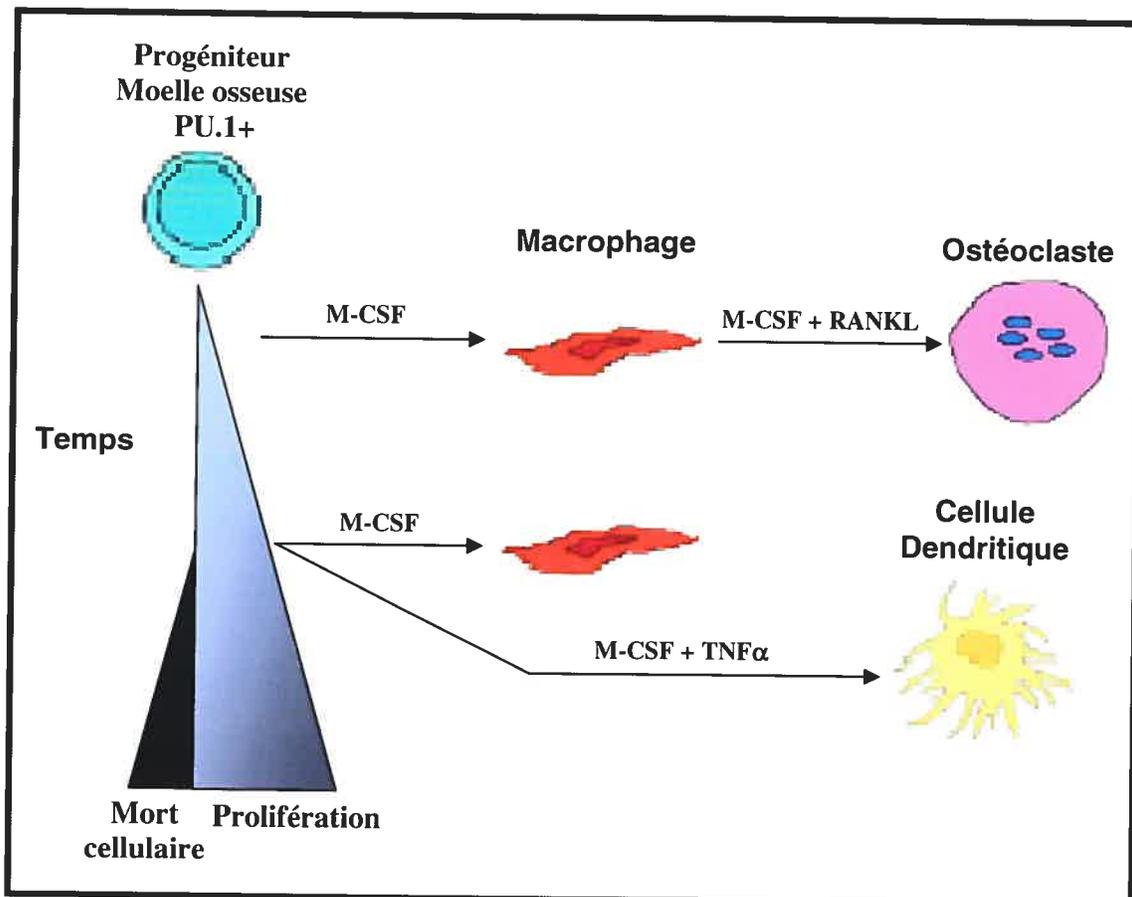
## 2.2 La différenciation des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées de la lignée monocyte/macrophage hématopoïétique et qui ont comme fonction la résorption de l'os (Teitelbaum, 2000). Comme mentionné plus haut, ces cellules sont caractérisées par la présence d'une bordure plissée contenant des pompes vacuolaires H<sup>+</sup>-ATPase impliquées dans l'acidification de la lacune de résorption. La bordure plissée est entourée d'une zone claire qui sert d'attachement à la surface osseuse pour le maintien du microenvironnement favorable à la résorption (Vaananen *et al.*, 2000). Ce sont les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse qui régulent la différenciation et l'activation des ostéoclastes.

### 2.2.1 Les progéniteurs des ostéoclastes

Plusieurs évidences démontrent que les ostéoclastes proviennent des cellules hématopoïétiques de la lignée monocyte/macrophage. La perte du gène PU.1, un facteur de transcription spécifique des cellules myéloïdes et cellules  $\beta$  entraîne l'arrêt du développement des macrophages et des ostéoclastes, ce qui suggère que ce facteur régule le stade initial de différenciation des cellules myéloïdes (Tondravi *et al.*, 1997). Il en est de même pour la perte du facteur M-CSF « *Macrophage Colony-Stimulating Factor 1* » qui abolit le support de l'ostéoclastogénèse par les ostéoblastes lorsqu'il n'est pas produit par ceux-ci (Yoshida *et al.*, 1990).

Plusieurs autres gènes ont été étudiés pour leur activité de régulation positive ou négative sur l'ostéoclastogénèse (Wagner and Karsenty, 2001). Ces études ont été basées sur des mutants spontanés ou induits chez la souris. La perte de ces gènes bloque la différenciation, la fusion des préostéoclastes et/ou la fonction des ostéoclastes matures, ce qui entraîne une accumulation anormale de tissu minéralisé et de cartilage (Figure 5).



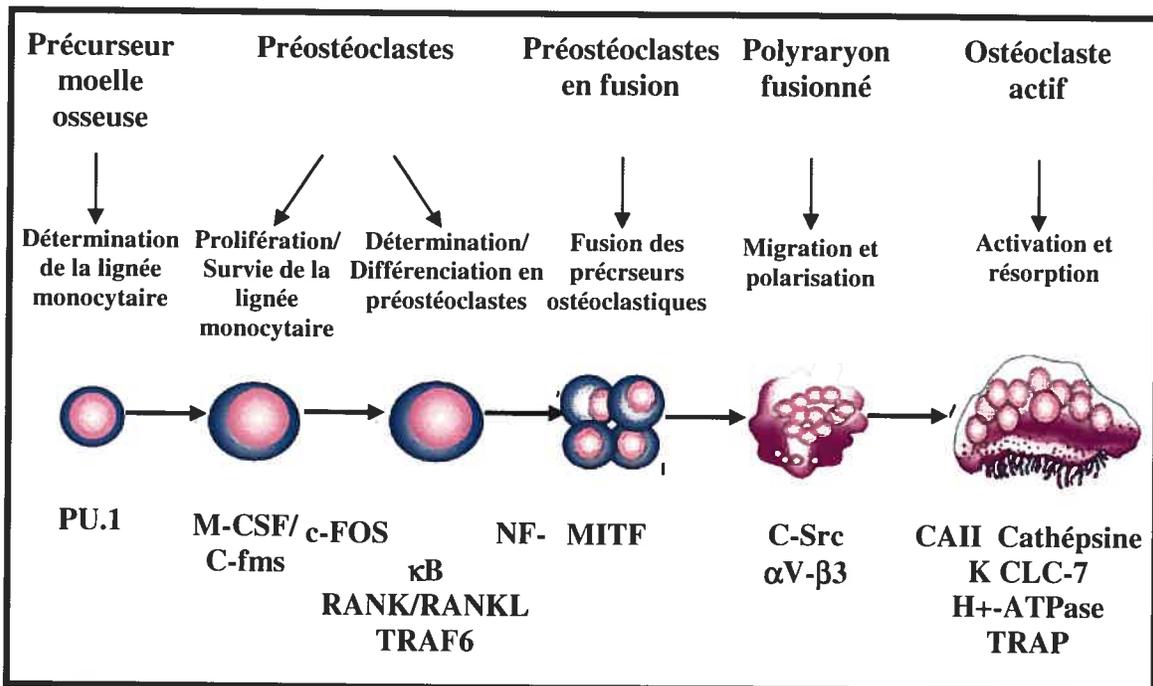
**Figure 5 : Différenciation des précurseurs des ostéoclastes**

Les précurseurs ostéoclastiques PU.1+ vont se différencier dans le temps sous l'influence des facteurs comme M-CSF et RANKL. Les précurseurs vont d'abord se différencier en macrophages et ensuite en ostéoclastes ou cellules dendritiques. Adapté de : (Servet-Delprat *et al.*, 2002)

### 2.2.2 Ostéoclastogénèse

Il est maintenant connu qu'il est nécessaire d'avoir un contact étroit entre les cellules stromales et hématopoïétiques pour avoir une ostéoclastogénèse (ou un système sans ostéoblastes mais avec M-CSF/RANKL). Ce système permet la production de deux facteurs hématopoïétiques essentiels et suffisants pour l'ostéoclastogénèse : la cytokine RANKL « *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand* » de la famille des TNFs qui se lie à son récepteur RANK et le facteur de croissance polypeptidique M-CSF qui se lie à son récepteur

C-fms (Yasuda *et al.*, 1998). Ceci entraîne l'activation de la voie de RANK à la surface des précurseurs de la lignée hématopoïétique. RANKL et M-CSF sont essentiels pour l'induction des gènes spécifiant la lignée ostéoclastique comme MITF « *Microphthalmia Transcription Factor* », TRAP, CATK, le récepteur à la calcitonine et les intégrines  $\alpha$ V- $\beta$ 3. L'activité des gènes M-CSF et RANK entraîne la fusion des précurseurs mononucléés issus de monocytes qui vont se développer en ostéoclastes matures et ce entre autre par la phosphorylation du facteur de transcription MITF par le M-CSF (Figures 6 et 9) (Hodgkinson *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 1998).



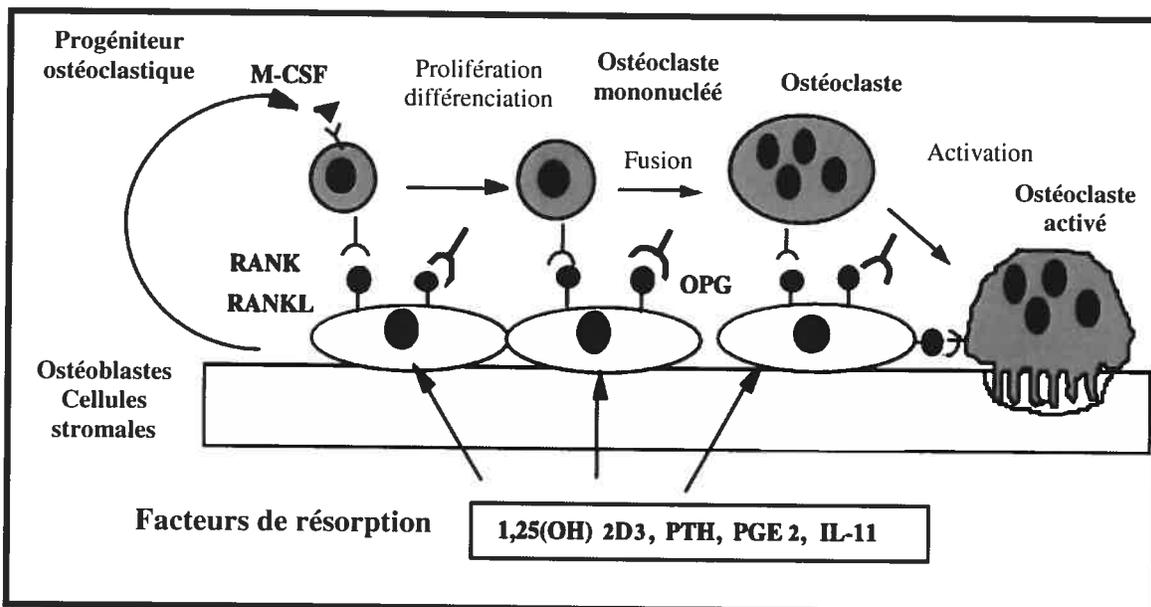
**Figure 6 : Différenciation et activation des ostéoclastes**

Les différents facteurs impliqués dans la détermination et la différenciation des préostéoclastes en ostéoclastes matures et actifs. Adapté de (Boyle *et al.*, 2003)

Les ostéoclastes matures seront stimulés à résorber par leur environnement. L'expression de RANKL par les ostéoblastes et les cellules stromales est régulée de façon positive par des hormones et facteurs de croissance comme la VitD (1,25 (OH)2D3), PTH, PGE2 (prostaglandine E2), IL-11 (interleukine 11) et des niveaux élevés de calcium (Katagiri and Takahashi, 2002; Takami *et al.*, 2000; Takami *et al.*, 1997). L'ostéoclaste est une cellule

polarisée et en réponse à l'activation de RANK par ses ligands, elle subira des changements structuraux internes conduisant à l'attachement de l'ostéoclaste à la surface osseuse et à la formation de la lacune de résorption (Figure 7).

La sécrétion des enzymes TRAP et CATK et la sécrétion de protons par les pompes vacuolaires  $H^+$ -ATPase permettra l'acidification et la dégradation de la matrice osseuse et les produits de dégradation (fragments de collagène, calcium et phosphate) seront endocytés par l'ostéoclaste et relargués dans la circulation (Halleen *et al.*, 1999; Nesbitt and Horton, 1997; Salo *et al.*, 1997). Les pompes  $H^+$ -ATPases sont associées aux canaux chlore CLC7 qui permettent le passage d'ions chlore ( $Cl^-$ ) qui compensent les différences de potentiel membranaire de la lacune (Blair and Schlesinger, 1990; Kornak *et al.*, 2001b)



**Figure 7 : Ostéoclastogénèse supportée par les ostéoblastes**

La différenciation et la fonction des ostéoclastes sont supportées par les ostéoblastes et cellules stromales. Les facteurs de résorption active l'expression de RANKL à la surface des ostéoblastes/cellules stromales et du M-CSF. Adapté de (Katagiri and Takahashi, 2002)

L'OPG (ostéoprotégérine) est un facteur soluble de la famille des TNFs mais elle a comme fonction d'inhiber la différenciation et l'activation des ostéoclastes. Elle est sécrétée par les ostéoblastes et son expression est stimulée par les mêmes hormones et facteurs qui stimulent les ostéoclastes (VitD, PTH,...). OPG lie RANKL situé à la surface des ostéoblastes, ce qui abolit la stimulation du récepteur RANK situé à la surface des ostéoclastes (Figure 7) (Lacey *et al.*, 1998; Simonet *et al.*, 1997).

### 3. Le remodelage osseux

Que ce soit dans l'os compact ou dans l'os trabéculaire, le tissu osseux est en renouvellement constant. C'est ce remodelage qui permet à l'os de s'adapter aux contraintes extérieures (Currey, 2003). Ce remodelage implique la formation et la résorption de tissu osseux grâce aux unités fonctionnelles de remodelage comprenant les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques dont les activités métaboliques sont étroitement reliées dans l'espace et dans le temps. Il y a donc coordination précise entre les activités des ostéoblastes et des ostéoclastes. L'os est ainsi formé de millions de ces unités fonctionnelles de remodelage ou BRU « *Bone Remodelling Units* » (Parfitt, 1983). Un cycle de remodelage a une durée d'environ quatre mois chez l'adulte avec une phase de formation plus longue que la phase de résorption (Baron *et al.*, 1977). Il y a quatre phases distinctes dans un cycle de remodelage osseux (Figure 8). Ces phases sont décrites ci dessous.

#### 3.1 La phase de quiescence et d'activation

La surface osseuse inactive est normalement recouverte de cellules bordantes qui empêchent l'accès des précurseurs mononucléés ou préostéoclastes. Sous l'influence des facteurs ostéorésorbants (PTH, VitD, PGE2) sécrétés par les ostéoblastes, les cellules bordantes se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes pour qu'ils puissent adhérer à la matrice osseuse. L'afflux des ostéoclastes est favorisé par la prolifération des précurseurs médullaires sous l'effet de facteurs comme le M-CSF, RANKL et MITF qui stimulent la prolifération, la différenciation et la fusion des préostéoclastes pour devenir des ostéoclastes actifs (Katagiri and Takahashi, 2002; Takahashi *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1991).

#### 3.2 Phase de résorption

Chaque ostéoclaste différencié et actif se fixe à la matrice osseuse sur le lieu de résorption et résorbe l'os ancien qui se retrouve dans la lacune. Cette phase débute par l'adhésion de l'ostéoclaste au niveau de la zone claire avec formation d'une zone d'attachement qui conduira à la polarisation de la cellule et de la formation de la membrane plissée. C'est la constitution d'un anneau périphérique hermétique qui permettra la formation d'une lacune de

résorption (lacune de Howship) entre la membrane de l'ostéoclaste et la matrice extracellulaire osseuse (Vaananen, 1993; Vaananen and Horton, 1995a). Cet anneau circonférentiel est fait de jonctions cellules-matrice extracellulaires ponctuelles ou podosomes. Chacun des podosome est fait d'une chaîne de molécules de la matrice extracellulaire (ostéopontine, sialoprotéines, thrombospondine, vitronectine et collagène-I), de molécules transmembranaires (intégrines  $\alpha V\text{-}\beta 3$ ) et de molécules intracytoplasmiques (taline, vinculine). C'est la région cytoplasmique dans laquelle se situe cet anneau d'actine, la zone claire, que la cellule est dépourvue d'organites (Marchisio *et al.*, 1988).

Grâce aux pompes vacuolaires  $H^+$ -ATPase, impliquées dans l'acidification de la lacune de résorption par sécrétion d'ions  $H^+$ , il y aura dissolution d'hydroxyapatite et relargage de calcium et de phosphore conduisant à l'activation des enzymes protéolytiques. Les pompes  $H^+$ -ATPases sont en paire avec les canaux chlore CLC7 par lesquels passent les ions chlore ( $Cl^-$ ) qui combrent les différences de potentiel membranaire de la lacune de résorption (Blair and Schlesinger, 1990; Kornak *et al.*, 2001b). C'est au niveau de la bordure plissée que de nombreux lysosomes de la cellule déversent leur contenu enzymatique : cathepsine K (CATK), collagénase, phosphatase acide (TRAP) et métalloprotéinases. La destruction de la matrice osseuse par les enzymes libère des produits de dégradation du collagène qui passe dans la circulation sanguine et qui sont des marqueurs de l'activité ostéoclastique (Li *et al.*, 2006; Vaananen *et al.*, 2000).

### 3.3 Phase d'inversion

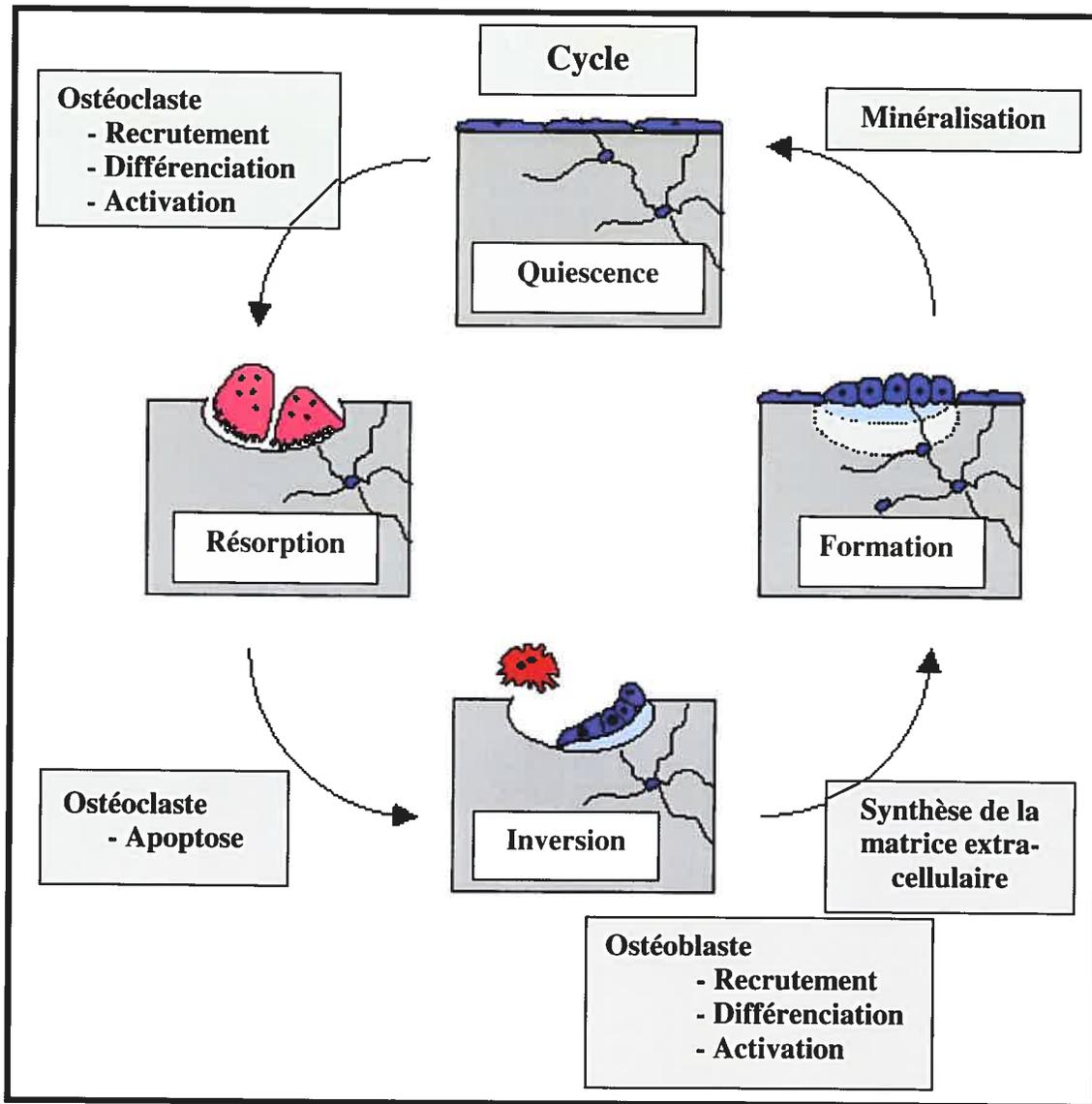
Des études *in vitro* démontrent que les ostéoclastes peuvent passer à travers plusieurs cycles de résorption (Baron *et al.*, 1977; Lakkakorpi and Vaananen, 1996). Lorsque les ostéoclastes ont achevé la résorption d'une lacune, ils peuvent se fissionner et redevenir des cellules mononucléées ou ils meurent par apoptose (Vaananen, 2005). Ils seront ensuite remplacés par des cellules mononucléées de types macrophagiques qui vont lisser le fond de la lacune.

### 3.4 Phase de formation

La phase de formation est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune. Ce fond de lacune est appelé ligne cémentante. Cette phase comporte deux temps : la production de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et la minéralisation de la matrice extracellulaire.

La production de matrice extracellulaire est liée à la prolifération et à l'activation des ostéoblastes. Une fois la résorption osseuse terminée, les cellules ostéoprogénitrices qui sont au fond de la lacune érodée (ligne cémentante) se divisent et se différencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes synthétisent alors une nouvelle matrice collagénique non minéralisée pour combler la lacune (Mackie, 2003). Cette matrice non minéralisée ou ostéoïde sera secondairement minéralisée ce qui lui conférera sa solidité. De nombreux facteurs de croissance sont sécrétés par les ostéoblastes ou stockés dans la matrice osseuse et relâchés lors de la résorption jouent un rôle essentiel dans l'ostéogenèse par leurs effets sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et leurs précurseurs (Takaoka, 1985).

La minéralisation se fait ensuite au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé. La phosphatase alcaline est l'enzyme synthétisée par les ostéoblastes qui est capable d'hydrolyser les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation (Christenson, 1997). Les ostéoblastes ensuite produisent les vésicules matricielles, réservoirs de phosphatases alcalines et d'ions, qui une fois déversées dans le milieu extracellulaire, initient la minéralisation du tissu ostéoïde en concentrant localement les ions calcium et phosphate. C'est l'ostéocalcine qui augmente la concentration locale de calcium extracellulaire et le fixe sur le tissu ostéoïde (Figure 2) (Ambroszkiewicz *et al.*, 2002).



**Figure 8 : Le remodelage osseux**

Le remodelage osseux résulte d'une coordination précise entre les activités des ostéoblastes et des ostéoclastes. Le cycle du remodelage osseux comporte quatre phases : une phase de quiescence, une phase de résorption, une phase d'inversion et une phase de formation.

## 4. Les désordres osseux

Jusqu'à l'âge de 20 ans, la masse osseuse augmente progressivement. On dira alors que le capital osseux est stable et il le sera pendant plusieurs années. Il diminuera lentement avec l'âge puisque chez la femme comme chez l'homme, les mécanismes de destruction du tissu osseux l'emporteront sur ceux de formation. Comme l'équilibre entre synthèse et résorption est très finement réglé, tout déséquilibre conduira à des maladies osseuses. Il existe divers désordres qui peuvent entraîner une diminution ou une accumulation anormale du capital osseux.

### 4.1 L'ostéoporose

L'ostéoporose est la maladie métabolique de l'os la plus répandue. Elle affecte environ 30% des femmes post-ménopausées aux États-Unis et jusqu'à 70% vers 80 ans (Melton, III, 1995). C'est une maladie systémique du squelette qui se caractérise par une faible densité osseuse et une détérioration architecturale du tissu osseux ce qui accroît la fragilité des os et leur susceptibilité aux fractures. Les conséquences les plus fréquentes de l'ostéoporose sont les fractures de la colonne vertébrale, de la hanche et des poignets. Les facteurs de risque utilisés pour évaluer la résistance des os et donc l'ostéoporose sont le « Bone Mineral Density » (BMD) et la taille et la qualité des os. Toutefois, la résistance osseuse ne peut être mesurée directement (*in vivo*) chez l'homme. Comme l'ostéoporose est un désordre à forte composante génétique, diverses approches ont été utilisées/étudiées afin d'identifier des gènes associés à cette maladie et permettre un meilleur diagnostic (Huang and Kung, 2006).

### 4.2 Maladie de Paget

La Maladie de Paget « *Paget's Disease of Bone* » (PDG) est une condition assez commune qui est caractérisée par des régions focales de résorption osseuse ostéoclastique accrue accompagnée d'une formation osseuse ostéoblastique accrue et désorganisée. Deux mécanismes sont proposés comme causant cette maladie. Le premier serait dû à une infection lente des ostéoclastes par un virus et le second serait d'origine génétique. Une hypothèse

unifiante est que la maladie serait causée par une prédisposition génétique à un agent infectieux (Daroszevska and Ralston, 2005;Reddy, 2006). La Maladie de Paget est la seconde maladie métabolique de l'os la plus répandue et a une morbidité dans 30% des cas avec des symptômes comme de la douleur, des déformités osseuses, la surdité et des complications comme l'ostéoarthrite (Tiegs *et al.*, 2000).

#### 4.3 Ostéomalacie et « Rickets »

Deux maladies sont associées à la régulation minérale de l'os : le « *X-Linked Hypophosphataemic Rickets* » (HYP) et le « *Oncogenic Hypophosphataemic Osteomalacia* » (OHO). Le défaut primaire dans le « *X-Linked Hypophosphataemic Rickets* » vient d'une metalloendopeptidase du zinc (PHEX) et chez le « *Oncogenic Hypophosphataemic Osteomalacia* », ce serait une glycoprotéine (MEPE) qui est un facteur phosphaturique qui est relargué par les tumeurs OHO (Francis *et al.*, 1997;Rowe *et al.*, 2000). Les symptômes classiques du « *X-Linked Hypophosphataemic Rickets* » sont une hypophosphatémie, un métabolisme inapproprié de la vitamine D en présence de bas taux de phosphate dans le sérum, une alkaline phosphatase élevée et des défauts du squelette. Les facteurs du « *Oncogenic Hypophosphataemic Osteomalacia* » sont en commun avec le « *X-Linked Hypophosphataemic Rickets* » sauf pour ce qui est des tumeurs qui sont d'origine mésenchymateuse et qui sécrètent les facteurs stimulant les symptômes (Rowe, 2000).

#### 4.4 L'ostéopétrose

L'ostéopétrose recouvre des maladies distinctes, hétérogènes et rares qui sont toutes caractérisées par un défaut de résorption osseuse avec augmentation ou non de l'activité des ostéoblastes (ostéosclérose). Il existe plusieurs modèles d'ostéopétrose chez la souris et certains de ces modèles ont été associés à des formes d'ostéopétrose humaine (Figure 11). Comme mentionné plus haut, plusieurs gènes ont été étudiés pour leur activité de régulation positive ou négative sur l'ostéoclastogenèse (Wagner and Karsenty, 2001) et ces études ont été basées sur des mutants naturels/spontanés ou des mutants induits générés chez la souris. La perte de ces gènes va bloquer le développement et/ou la fonction des ostéoclastes matures, ce qui entraîne une accumulation anormale de tissu minéralisé et de cartilage et donc l'ostéopétrose. Selon l'étape à laquelle la mutation affecte le processus de différenciation

ostéoclastique, il y aura soit une absence ou une diminution des ostéoclastes, soit un défaut de fonction des ostéoclastes (Figure 6) (Blin-Wakkach *et al.*, 2004).

#### 4.4.1 Modèles murins de défaut de différenciation des ostéoclastes

Seulement trois modèles murins présentent des arrêts ou diminution de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en précurseurs monocytaires : les mutants du facteur de transcription PU.1 (*PU.1<sup>-/-</sup>*) exprimé par les cellules hématopoïétiques et du couple M-CSF (*op/op*) et c-FMS (récepteur du M-CSF) (*csfr1<sup>-/-</sup>*) qui sont à la surface des précurseurs myélomonocytaires (Tondravi *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1990). Ce sont des gènes qui sont essentiels à la première étape de l'ostéoclastogenèse. Une fois cette première étape de différenciation terminée, les précurseurs myélomonocytaires pourront s'engager dans des voies spécifiques les conduisant à devenir des macrophages, des ostéoclastes ou des cellules dendritiques. Ces trois modèles sont donc ostéopétroriques.

L'engagement dans la voie ostéoclastique par rapport aux voies macrophagiques et dendritiques est contrôlé en partie par c-Fos, un facteur de transcription qui appartient au complexe API. Les souris mutantes pour ce facteur ont plus de macrophages que les souris contrôles et *in vitro* c-Fos active la différenciation des ostéoclastes tout en inhibant celle des cellules dendritiques (Grigoriadis *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 2001).

Le RANKL synthétisé et situé à la surface des cellules stromales est un activateur de la différenciation des ostéoclastes et agit par sa liaison au récepteur RANK qui lui est situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Au contraire, l'OPG, un facteur soluble sécrété par les ostéoblastes, inhibe l'interaction entre RANKL et RANK et donc inhibe la différenciation des précurseurs ostéoclastiques (Simonet *et al.*, 1997). La mutation des gènes RankL ou Rank entraîne des déséquilibres du métabolisme osseux et des atteintes du système immunitaire. Par contre, seule l'inactivation de RANK peut être corrigée par un transfert de moelle osseuse. En temps normal, l'activation de RANK déclenche une cascade de signalisation qui active NF- $\kappa$ B (Dougall *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 1999). Ce facteur de transcription est un dimère qui peut être composé de diverses combinaisons protéiques différentes mais similaires structurellement : p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), c-Rel (Rel) et RelB. Il y aura

anomalies du système immunitaire et inflammatoire suite à l'invalidation de chacun de ces gènes (Sha *et al.*, 1995;Snapper *et al.*, 1996). Toutefois, quoique la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B soit importante pour l'ostéoclastogenèse, l'homéostasie osseuse n'est pas affectée par ces mutations individuelles. Par contre, les doubles mutants pour p50 et p52 sont atteints d'ostéopétrose avec réduction du nombre de pré-ostéoclastes et de macrophages, ce qui implique que ces facteurs auraient une action redondante (Franzoso *et al.*, 1997).

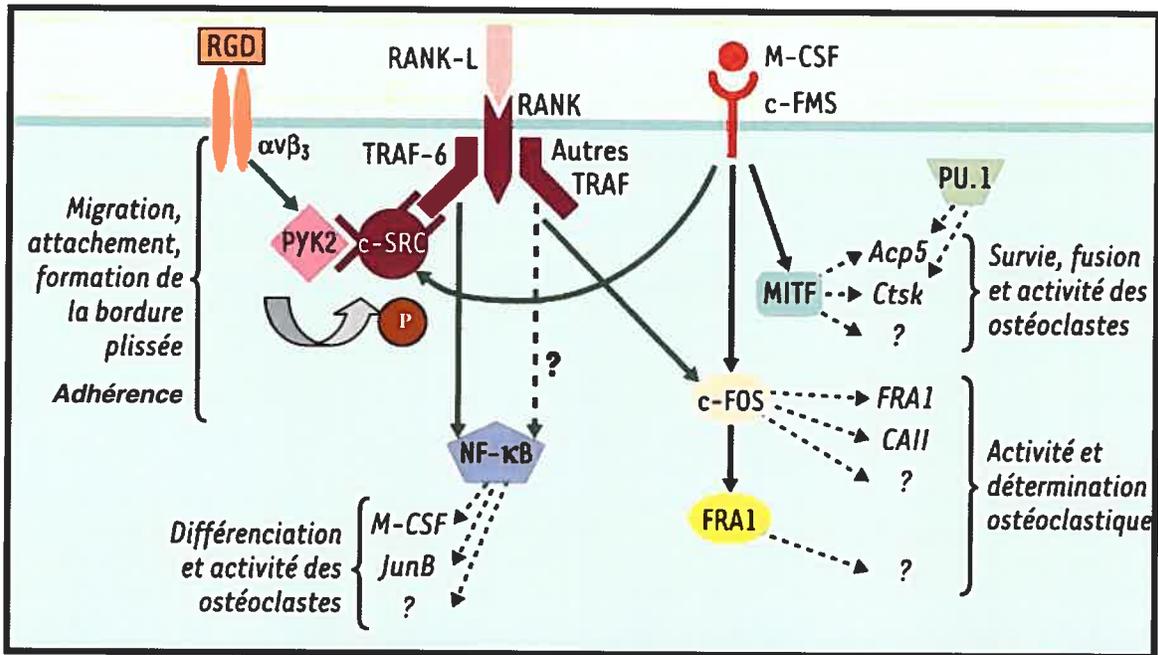
#### 4.4.2 Modèles murins de défaut de fonction des ostéoclastes

Chez les modèles d'ostéopétrose associés à des défauts de fonction, les ostéoclastes sont bien présents mais sont inactifs. Les défauts vont affecter les protéines impliquées dans les fonctions d'adhérence, de mobilité et de résorption des ostéoclastes. Les voies de signalisation de RANK et du M-CSF contrôlent les étapes cruciales de la différenciation des ostéoclastes mais également celles impliquées dans l'adhérence, la mobilité et la résorption des ostéoclastes (Figure 9).

Les « *TNF Receptor Associated Factors* » (TRAFs) jouent un rôle essentiel dans l'activité des ostéoclastes puisque le facteur TRAF6 est recruté suite à la liaison de RANKL sur son récepteur ce qui va permettre l'activation de NF- $\kappa$ B et c-Src, une tyrosine-kinase aussi impliquée dans la signalisation du M-CSF. La protéine c-Src intervient aussi dans la voie des intégrines, des protéines qui contrôlent l'attachement de l'ostéoclaste et dont la principale protéine de cette famille chez l'ostéoclaste est le récepteur à la vitronectine  $\alpha$ V- $\beta$ 3. L'activation de  $\alpha$ V- $\beta$ 3 lors de sa liaison aux protéines de la matrice active la Pyk2 « *Prolin Rich Tyrosine Kinase* » qui phosphoryle c-Src. Donc l'association des protéines Pyk2 et c-Src régule l'adhérence et la migration des ostéoclastes. Les mutants pour ces gènes présenteront alors un défaut d'association de l'ostéoclaste à l'os (Duong and Rodan, 1998;Lomaga *et al.*, 1999;McHugh *et al.*, 2000).

La protéine « *Microphthalmia transcription Factor* » (MITF) est activée suite à une phosphorylation par le M-CSF. Cette protéine contrôle l'expression des gènes impliqués dans la survie, la fusion et l'activité des ostéoclastes (Hodgkinson *et al.*, 1993;Luchin *et al.*, 2001). Le phénotype des animaux mutés pour ce gène est semblable à celui des souris *gl/gl* qui vont

développer à la fois une anomalie de pigmentation du poil et une ostéopétrose très sévère (Chalhoub *et al.*, 2003). Les ostéoclastes de ces souris ont des altérations dans leur cytosquelette et dans le développement de la bordure plissée. Le phénotype de la souris *gl* sera mieux défini lors du prochain chapitre.



**Figure 9 : Voies de signalisation de différenciation et activation des ostéoclastes**

Voies du RANKL et M-CSF qui lient leurs récepteurs tyrosine-kinase et activent les cascades de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes. Adapté de (Blin-Wakkach *et al.*, 2004)

Les facteurs de transcription induits par les voies de RANKL et M-CSF ne contrôlent pas que les gènes impliqués dans la différenciation des ostéoclastes, ils contrôlent aussi les gènes d'enzymes de dégradation de la matrice osseuse. L'expression de TRAP, la phosphatase qui participe à la déphosphorylation des protéines de la matrice, est régulée par PU.1 et MITF. L'expression de la CATK, une protéase qui participe à dégradation de la matrice osseuse, est également régulée par MITF. La perte de ces gènes entraîne une ostéopétrose mais de type modérée (Gowen *et al.*, 1999; Hayman *et al.*, 1996).

L'ostéoclaste actif est une cellule polarisée qui est caractérisée par la formation d'une bordure plissée qui délimite la lacune de résorption et l'acidification de la lacune permet la

dégradation de la matrice minérale et l'activation des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice organique. Cette activité est réglée par la pompe H<sup>+</sup>-ATPase et par le canal chlore CLC-7 (Nishi and Forgac, 2002). Les modèles d'ostéopétrose *oc/oc* (souris ostéosclérotiques) et *CLC-7<sup>-/-</sup>* présentent un défaut de leur système d'acidification (Kornak *et al.*, 2001b; Seifert and Marks, Jr., 1985). Les souris *oc/oc* ont une mutation dans le gène « *T Cell Immune Regulator 1* » (*Tcirg1*) ou *Atp6i* qui code pour l'isoforme  $\alpha 3$  de la sous-unité de 116kDa de la V-ATPase (Scimeca *et al.*, 2000). Ces souris ont une densité osseuse élevée et une réduction de leur cavité médullaire.

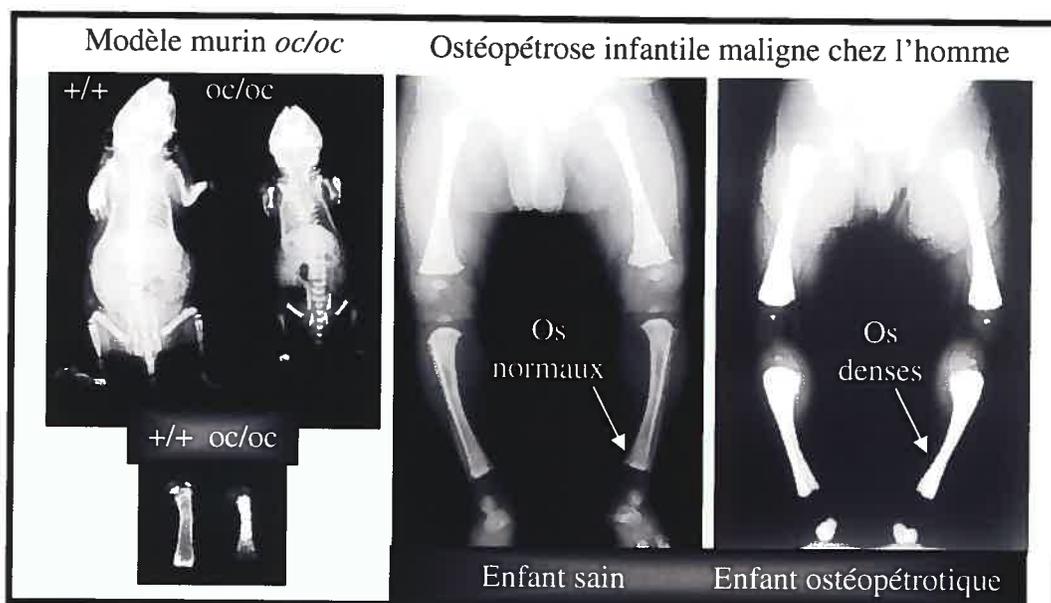
#### 4.4.3 L'ostéopétrose chez l'humain

Chez l'homme il y a deux formes majeures d'ostéopétrose. L'ostéopétrose maligne infantile est transmise de façon autosomale récessive et son incidence est de seulement 1/200 000. Ce type d'ostéopétrose est caractérisé par des symptômes sévères qui sont liés à des problèmes au niveau du remodelage osseux comme des problèmes de croissance, des malformations des os et du crâne et des retards d'éruption dentaire. Il y a aussi des anomalies d'hématopoïèse qui est extramédullaire et des anomalies neurosensorielles comme la cécité et des troubles de développement de l'appareil psychomoteur. Les patients non traités ont un taux de survie très faible dès l'enfance. Ces patients seront atteints d'infections, hémorragies et anémies ce qui diminuera énormément leur qualité de vie (Blin-Wakkach *et al.*, 2004).

Les patients atteints d'ostéopétrose infantile maligne ont un phénotype très semblable à celui des souris *oc/oc* (Figure 10). Des mutations du gène *TCIRG1* ont donc été recherchées chez ces patients et ont été décelées dans la moitié des cas. Le gène *TCIRG1* est donc le gène le plus souvent affecté chez ces patients (Frattoni *et al.*, 2000; Kornak *et al.*, 2000). Environ 10% des patients étudiés ont révélées des mutations dans le gène *CLCN7* (Frattoni *et al.*, 2003; Kornak *et al.*, 2001b). Des mutations de ce gène ont aussi été décelées chez des patients atteints d'ostéopétrose de type II (prochain paragraphe). Dans les dernières années, quelques cas de patients ayant une mutation dans le gène *GL* ont été découverts (Chalhoub *et al.*, 2003; Pangrazio *et al.*, 2006; Quarello *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2004). Des études plus poussées doivent être faites afin de déterminer la fréquence de mutations du gène *GL* dans la maladie. Pour le moment, la fréquence est évaluée à environ 3%. Une proportion des patients

ostéopétriques ne présentent aucune mutation dans la séquence de ces gènes. Certaines mutations pourraient être situées dans les régions régulatrices de ces gènes ou dans des gènes non identifiés (Sobacchi *et al.*, 2001).

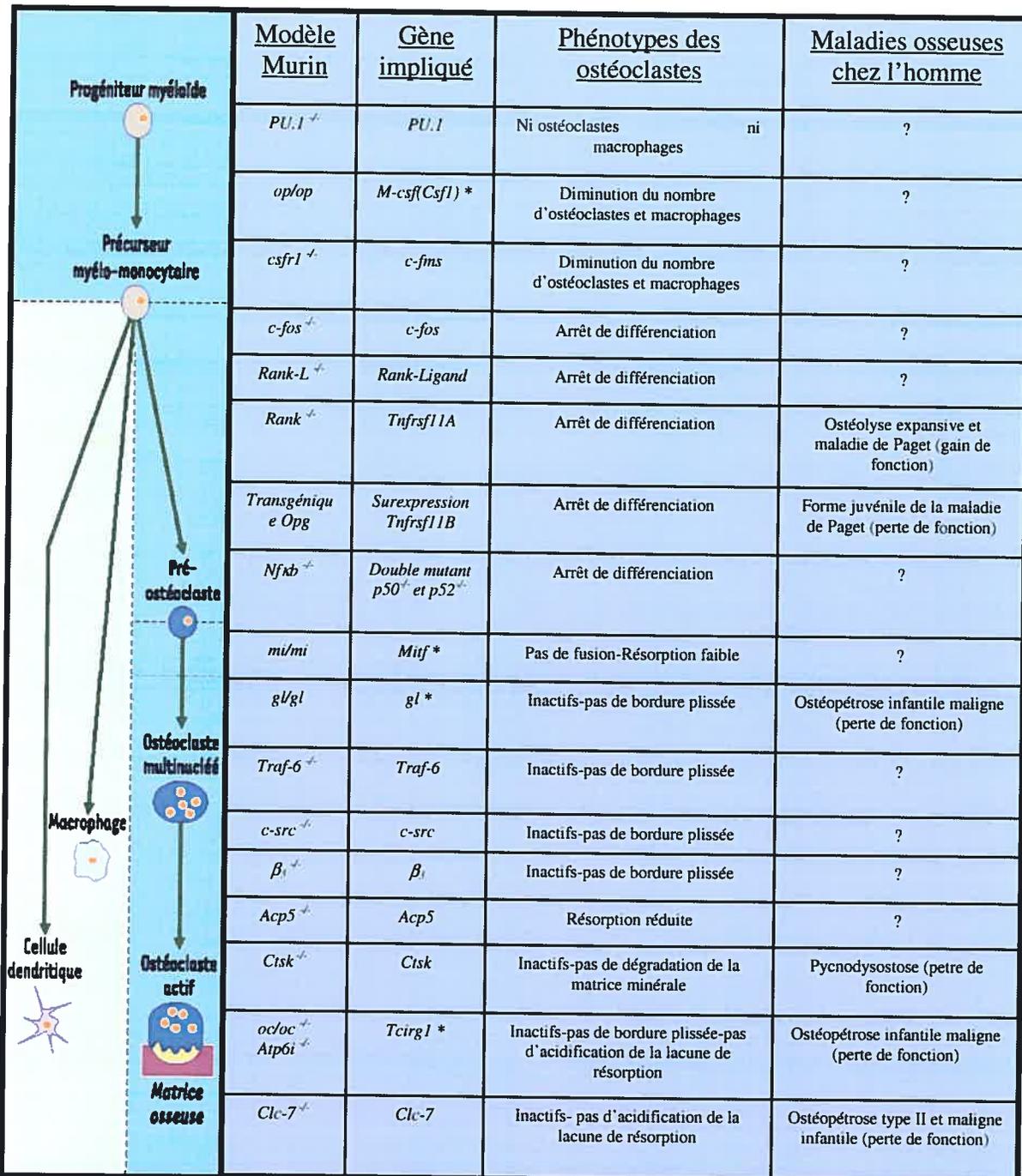
L'autre type d'ostéopérose est transmis de façon autosomale dominante. C'est un type plutôt bénin et souvent asymptomatique qui peut se caractériser par des fractures fréquentes, une ostéomyélite mandibulaire et une ostéoarthrite de la hanche. C'est l'ostéopérose de type II (ou maladie d'AlbersSchönberg) qui est la plus fréquente avec une incidence de 1/100000 (Blin-Wakkach *et al.*, 2004). Des mutations de *CLC-7* ont été détectées dans cette forme d'ostéopérose (Cleiren *et al.*, 2001; Frattini *et al.*, 2003). Les différents modèles d'ostéopérose murines et leurs correspondants chez l'humain sont résumés dans la Figure 11. Les modèles qui proviennent d'inactivations et/ou mutations de gènes qui sont spontanées sont marqués d'un astérisque (\*). Les autres modèles sont des modèles dont les inactivations/mutations ont été générées et/ou induites.



**Figure 10 : La souris sclérotique *oc/oc* en comparaison à un patient atteint d'ostéopérose infantile maligne**

Les radiographies mettent en évidence le retard de croissance, l'augmentation de la densité osseuse et l'absence de cavité médullaire dans les os longs.

Adapté de (Blin-Wakkach *et al.*, 2004).



	<u>Modèle Murin</u>	<u>Gène impliqué</u>	<u>Phénotypes des ostéoclastes</u>	<u>Maladies osseuses chez l'homme</u>
Progéniteur myéloïde	<i>PU.1<sup>-/-</sup></i>	<i>PU.1</i>	Ni ostéoclastes ni macrophages	?
Précurseur myélo-monocytaire	<i>op/op</i>	<i>M-CSF(Csf1) *</i>	Diminution du nombre d'ostéoclastes et macrophages	?
	<i>csfr1<sup>-/-</sup></i>	<i>c-fms</i>	Diminution du nombre d'ostéoclastes et macrophages	?
	<i>c-fos<sup>-/-</sup></i>	<i>c-fos</i>	Arrêt de différenciation	?
	<i>Rank-L<sup>-/-</sup></i>	<i>Rank-Ligand</i>	Arrêt de différenciation	?
	<i>Rank<sup>-/-</sup></i>	<i>Tnfrsf11A</i>	Arrêt de différenciation	Ostéolyse expansive et maladie de Paget (gain de fonction)
	Transgénique <i>Opg</i>	Surexpression <i>Tnfrsf11B</i>	Arrêt de différenciation	Forme juvénile de la maladie de Paget (perte de fonction)
	<i>Nfkb<sup>-/-</sup></i>	Double mutant <i>p50<sup>-/-</sup> et p52<sup>-/-</sup></i>	Arrêt de différenciation	?
Pré-ostéoclaste	<i>mi/mi</i>	<i>Mif *</i>	Pas de fusion-Résorption faible	?
	<i>gl/gl</i>	<i>gl *</i>	Inactifs-pas de bordure plissée	Ostéopétrose infantile maligne (perte de fonction)
Ostéoclaste multinucléé	<i>Traf-6<sup>-/-</sup></i>	<i>Traf-6</i>	Inactifs-pas de bordure plissée	?
	<i>c-src<sup>-/-</sup></i>	<i>c-src</i>	Inactifs-pas de bordure plissée	?
	<i>β1<sup>-/-</sup></i>	<i>β1</i>	Inactifs-pas de bordure plissée	?
	<i>Acp5<sup>-/-</sup></i>	<i>Acp5</i>	Résorption réduite	?
	<i>Ctsk<sup>-/-</sup></i>	<i>Ctsk</i>	Inactifs-pas de dégradation de la matrice minérale	Pycnodysostose (perte de fonction)
	<i>oc/oc<sup>-/-</sup> Atp6i<sup>-/-</sup></i>	<i>Tcirg1 *</i>	Inactifs-pas de bordure plissée-pas d'acidification de la lacune de résorption	Ostéopétrose infantile maligne (perte de fonction)
	<i>Clc-7<sup>-/-</sup></i>	<i>Clc-7</i>	Inactifs- pas d'acidification de la lacune de résorption	Ostéopétrose type II et maligne infantile (perte de fonction)

**Figure 11 : Modèles d'ostéopétroses murins et leurs homologues chez l'humain**

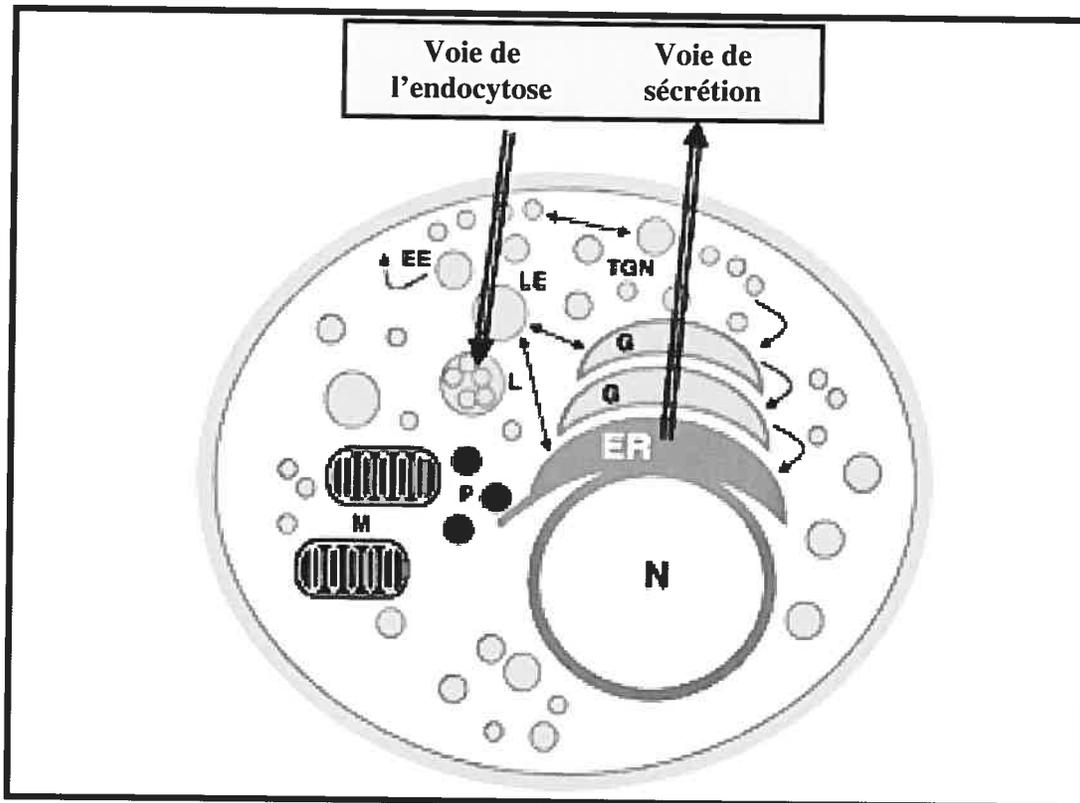
Invalidations/mutations spontanées (\*) ou induites des gènes impliqués dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes et qui mènent à une ostéopétrose. Adapté de (Blin-Wakkach *et al.*, 2004)

## 5. Biosynthèse et trafic des glycoprotéines

Les cellules eucaryotes ont évoluées de façon à pouvoir maintenir un équilibre homéostatique et à dialoguer avec leur environnement. Pour gérer toute cette biodiversité et spécificité de synthèse et de signalisation, les cellules ont développés des structures subcellulaires spécialisées que l'on nomme organelles et isolées du cytoplasme par des membranes lipidiques. Chacune de ces organelles a une fonction spécifique. Dans le cadre de mes études, je me suis intéressée au transport des protéines et plus particulièrement des glycoprotéines dans les voies de biosynthèse, transport, sécrétion/endocytose ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation et la spécification de l'adressage des protéines qui transitent et/ou résident dans ces organelles.

### 5.1 Généralités

Les protéines qui sont destinées à prendre les voies de biosynthèse et sécrétion vont intégrer le réticulum endoplasmique (RE), le compartiment où elles subiront les premières modifications telle la glycosylation. Les protéines seront aidées dans ces étapes par les protéines chaperonnes qui assureront le bon déroulement des modifications et les protéines seront soumises à un contrôle de qualité avant leur sortie du RE. En cas de défaut, ces protéines seront acheminées vers le protéasome. Certaines protéines seront résidentes du RE tandis que d'autres seront acheminées vers le Golgi où elles subiront d'autres modifications post-traductionnelles. Le réseau *trans*-Golgi (TGN : *trans*-Golgi network) permettra un triage tardif des protéines dans leur transport et spécifiera l'adressage de celles-ci vers les voies lysosomales ou vers des domaines spécifiques de la membrane plasmique. Selon les voies empruntées au TGN, les protéines qui seront sécrétées de façon constitutive ou régulée seront ciblées aux domaines basal ou apical des cellules polarisées. À l'inverse, les protéines du milieu extracellulaire entrent dans la cellule par pinocytose ou par recrutement par des récepteurs membranaires via les endosomes précoces (Figure 12) (Rothman and Orci, 1992).



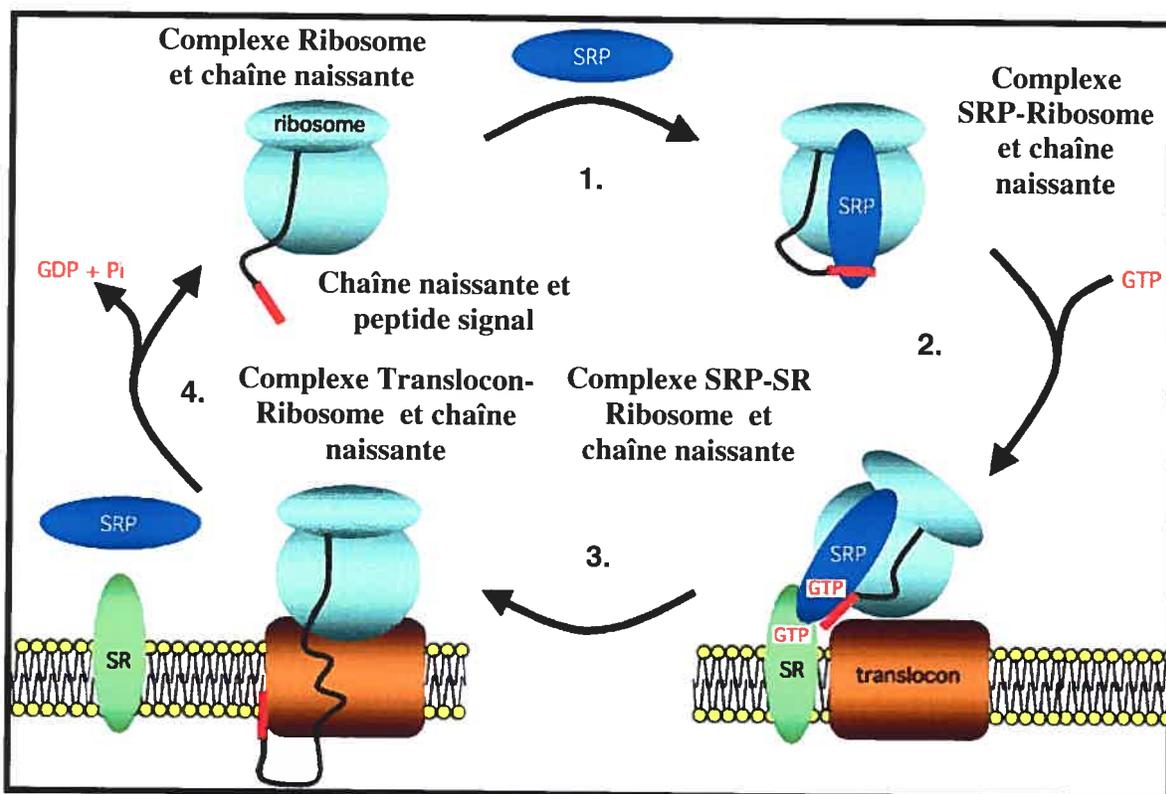
**Figure 12 : Le trafic protéique**

Le RE joue un rôle central dans le trafic protéique. Les organelles contenant des protéines qui ont transité par le RE sont en gris pâle tandis que les autres sont noires. Les flèches symbolisent les voies de trafic. N : Noyau, ER : Réticulum endoplasmique, G : Golgi, TGN : Réseau *trans*-Golgi, EE : Endosomes précoces, LE : Endosomes tardifs, P : Peroxisomes, M : Mitochondries. Adapté de (van and Braakman, 2005)

## 5.2 Peptide signal et translocation

Les protéines qui doivent être sécrétées à l'extérieur de la cellule traversent la membrane via un pore de translocation, le translocon (Keenan *et al.*, 2001). Chez les eucaryotes, les protéines destinées à la voie de sécrétion sont transloquées à travers la membrane du RE soit durant leur traduction (co-traductionnel) ou après (post-traductionnel). Une séquence d'environ 17 à 35 résidus hydrophobes située en région N-terminale des protéines, le peptide signal, destine les protéines à entrer dans le RE (Walter and Johnson, 1994). Le peptide signal lie le SRP « *Signal Recognition Particle* » et le complexe protéine-SRP est reconnue

par le récepteur du SRP (SR) qui est une composante du complexe du translocon dans la membrane du RE (Gilmore *et al.*, 1982). Les protéines SRP et SR sont des GTPases, des enzymes d'une large famille capable d'hydrolyser le GTP « *Guanine Tri-Phosphate* ». Ensemble, ils forment une chambre catalytique de deux molécules de GTP et stimulent leur activité GTPase ce qui entraîne le relargage du peptide signal du SRP et la dissociation du complexe (Miller and Walter, 1993). Lorsque les modifications sont co-traductionnelles, les protéines sont synthétisées par les ribosomes qui s'alignent du côté cytosolique de la membrane du RE. Dès que le peptide signal émerge du ribosome, le complexe protéine-SRP se lie au translocon ce qui assure une entrée directe de la protéine naissante dans le pore du translocon (Figure 13) (Johnson and van Waes, 1999).



**Figure 13 : Translocation co-traductionnelle**

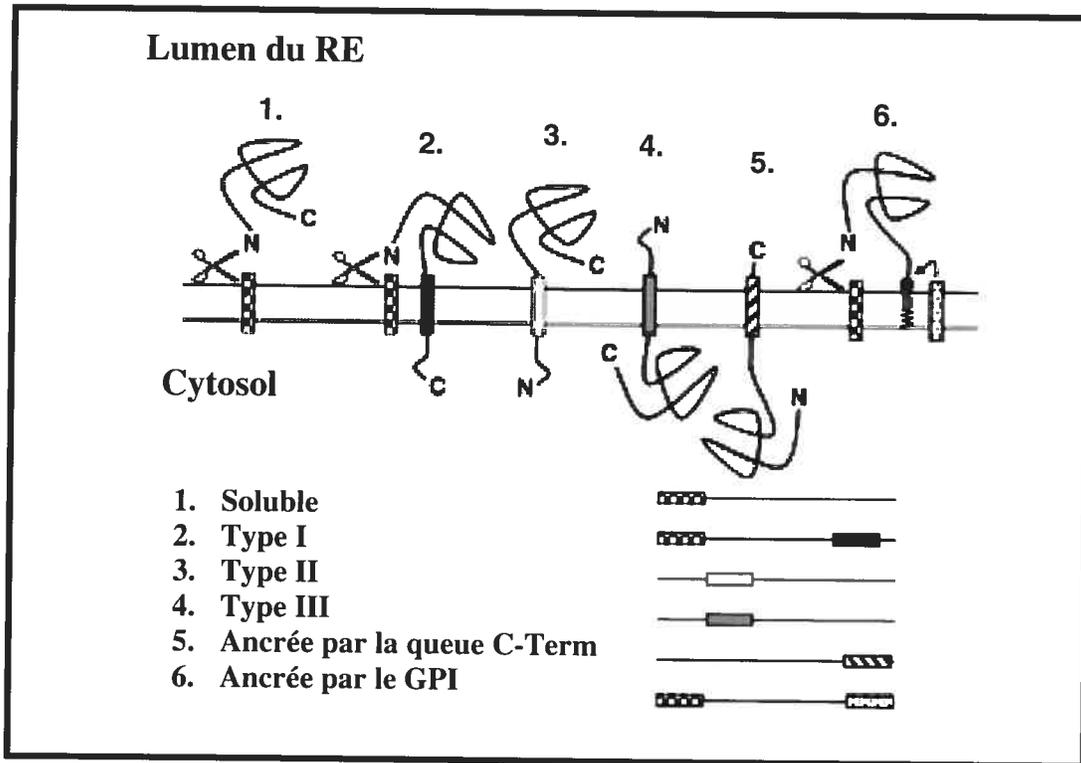
1. Le peptide signal est reconnu par le SRP et il y a arrêt de l'élongation 2. Interaction SRP/SR et transfert à la membrane 3. Accrochage au translocon et relargage du peptide signal 4. Hydrolyse du GTP et dissociation. Adapté de (Egea *et al.*, 2005)

Le centre du translocon est le complexe hétéro-trimérique Sec61 composé d'une sous-unité  $\alpha$  qui traverse dix fois la membrane du RE et de sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  qui ne la traversent qu'une fois (Clemons, Jr. *et al.*, 2004). Ceci forme un canal dont la partie centrale sera hydrophobe et où il y aura translocation de la protéine vers le lumen du RE.

### 5.2.1 Le clivage du peptide signal et l'ancrage à la membrane

Pour la plupart des protéines qui entrent dans le RE, le peptide signal sera clivé par une peptidase et ce bien avant la fin de la synthèse et translocation de la protéine. Ce clivage se fait dans le lumen du RE et va générer une séquence N-terminal luminaire (Blobel and Dobberstein, 1975).

Par contre, plusieurs protéines resteront ancrées à la membrane. Les protéines ancrées avec un seul domaine transmembranaire peuvent être divisées en cinq catégories : les protéines accrochées par leur région C-terminale (« *Tail-Anchored Proteins* »), les protéines ancrées au GPI « Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol » et les protéines transmembranaires de type I, II et III (Figure 14). Pour les protéines transmembranaires de type I, le domaine C-terminal de la protéine n'est pas complètement transloqué. Ces protéines ont une séquence d'environ vingt résidus hydrophobes qui agit comme un signal stop dans le translocon. Ces protéines ont donc un ectodomaine N-terminal dans le lumen du RE, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal. Au contraire, la protéine transmembranaire de type II a un domaine N-terminal cytoplasmique et C-terminal luminaire. Il existe aussi plusieurs types de protéines transmembranaires avec plusieurs domaines transmembranaires qui peuvent avoir leurs domaines C-terminal et N-terminal dans le lumen du RE (type I) ou dans le cytosol (type II) (van and Braakman, 2005). Le repliement des protéines débute dès que le polypeptide émerge du translocon (Nicola *et al.*, 1999).



**Figure 14 : Topologie des protéines**

: peptides signal clivables   
 : signal stop   
 : signal d'ancrage,  
 : signal d'ancrage réversible   
 : signal d'ancrage par la région C-term  
 : signal d'ancrage GPI. La flèche  $\swarrow$  indique que le signal d'ancrage GPI est retiré et les  $\bowtie$  sont les peptidases de signal. Adapté de (van and Braakman, 2005)

### 5.3 La N-Glycosylation

Des études récentes ont prédit que plus de la moitié des protéines eucaryotes étaient des glycoprotéines (Apweiler *et al.*, 1999). Environ 90% de ces protéines subiraient des N-Glycosylations et il y aurait en moyenne 1,9 N-Glycosylation par chaîne polypeptidique. Avec un poids moléculaire d'environ 3 kDa, ce groupe d'oligosaccharides constitue une bonne proportion de la masse des glycoprotéines en plus de couvrir une bonne fraction de leur surface. Que ce soit intra ou extracellulaire, les N-glycans sont utilisés comme des tags ou des signaux spécifiques reconnus par un spectre de protéines liant les carbohydrates, c'est-à-dire les lectines (Weis and Drickamer, 1996). Les glycans sont importants pour la

signalisation puisqu'ils sont exposés à la surface des glycoprotéines, ils sont polaires et peuvent être présents en plusieurs copies par protéine.

La plupart des protéines synthétisées dans le RE sont des glycoprotéines. Comme mentionné auparavant, les N-glycans seront impliqués dans une multitude de processus : ils stabilisent les protéines contre leur dénaturation et protéolyse, augmentent leur solubilité, modulent la réponse immunitaire, facilitent l'orientation des protéines relativement aux membranes, confèrent une rigidité structurale aux protéines, régulent le « *turnover* » des protéines ainsi que leur charge et point isoélectrique et régulent les interactions avec les pathogènes. Aucune autre modification covalente est aussi commune et chimiquement complexe et n'est employée dans autant de fonctions diverses (Helenius and Aebi, 2004).

La biosynthèse des glycoprotéines est une tâche partagée entre le RE et l'appareil Golgi. Le RE et le cytosol se chargent de la synthèse du polypeptide et du cœur de l'oligosaccharide. L'oligosaccharide sera couplé de façon covalente au polypeptide dans le RE et ensuite débutera les modifications initiales du N-glycan. Une fois que la glycoprotéine s'est repliée et oligomérisée correctement, elle transite dans le Golgi où elle subira d'autres modifications.

Ces différentes configurations des N-glycans ne sont pas simplement des intermédiaires dans leur biosynthèse mais ont aussi des fonctions spécifiques. Elles jouent un rôle dans trois stades de maturation des glycoprotéines et pour chacun de ces stades, les N-glycans doivent avoir une conformation bien différente. Cette première phase a lieu dans le RE où des formes partiellement hydrolysées du cœur de l'oligosaccharide sont essentielles pour le bon repliement et le contrôle de qualité des protéines. Les glycans ont alors une fonction de contrôle dans la fidélité de la production protéique. Ces étapes seront expliquées en détails ci-dessous. La seconde phase implique un rôle dans le transport intracellulaire et le ciblage des protéines. Cette phase est illustrée par le rôle des mannoses 6-phosphate dans le ciblage des hydrolases lysosomales et ceci aura lieu dans le RE, Golgi et *trans*-Golgi. La troisième et dernière phase prend place une fois que la protéine est mature et qu'elle a atteint l'espace extracellulaire, les lysosomes, la membrane plasmique ou tout autre lieu de ciblage. Les fonctions des glycans chez ces protéines matures seront alors aussi variées que leurs structures elles-mêmes (Helenius and Aebi, 2001).

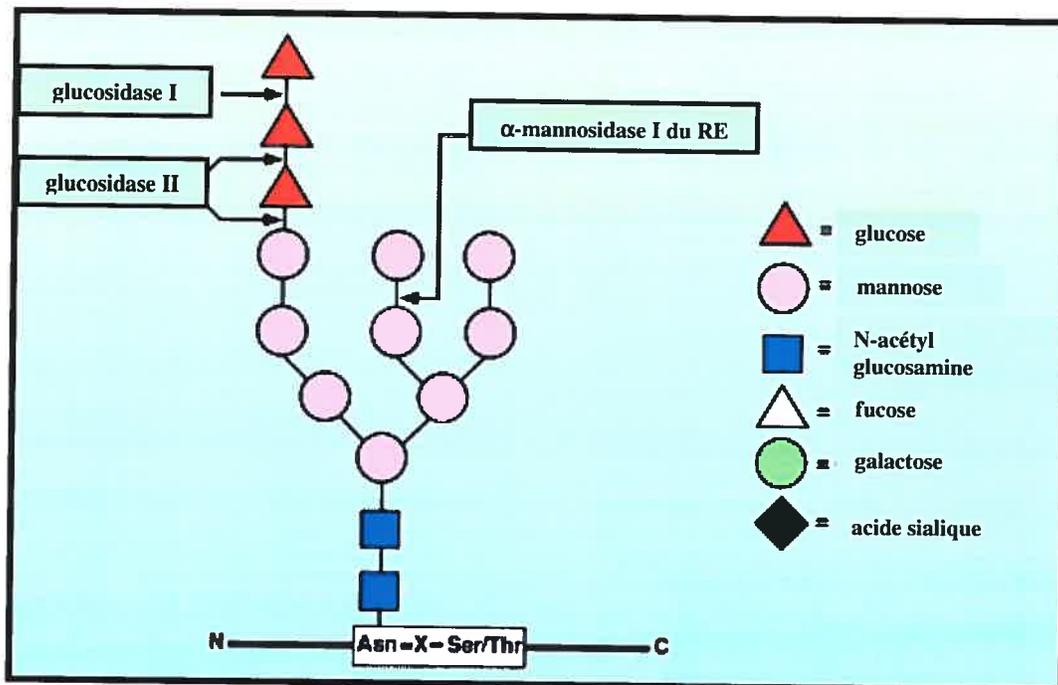
### 5.3.1 Biosynthèse de la partie centrale de l'oligosaccharide

Les N-glycans sont ajoutés aux protéines en bloc dans le RE en tant qu'oligosaccharides présynthétisés. Le centre de l'oligosaccharide a une structure bien définie et est composé d'une unité en forme de branche de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamines ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) (Figure 15). Le centre du glycan est le produit d'une biosynthèse dans laquelle des monosaccharides sont ajoutés à un transporteur lipidique, le dilichol-pyrophosphate, par une monosaccharide-transférase dans la membrane du RE (Burda and Aebi, 1999). La synthèse a lieu des deux côtés de la membrane du RE. Sept sucres seront ajoutés dans le cytosol avant qu'il y ait translocation du côté luminal par une flipase ATP-indépendante et bi-directionnelle (Hirschberg and Snider, 1987).

### 5.3.2 L'oligosaccharyltransférase (OST)

L'OST est associée au complexe du translocon (Chapitre 1 : Section 5.1) et avec la peptidase signalé, BiP, la Calnexine (voir plus bas) et possiblement d'autres facteurs qui font partie du complexe d'accueil que tout polypeptide naissant rencontre lorsqu'il quitte le complexe du translocon et entre dans le lumen. L'OST interagit avec le polypeptide qui émerge, reconnaît les séquences de glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) et y ajoute le N-oligosaccharide du côté nitrogène du résidu Asn par un lien N-glycosidique.

Les glycosylations ont lieu au fur et à mesure que le polypeptide traverse le translocon et entre dans le RE et révèle un site Asn-X-Ser/Thr. L'OST examine les polypeptides à une vitesse d'environ cinq résidus à la seconde, ce qui implique que le polypeptide acquiert ses glycans même s'il n'est pas encore replié dans sa bonne conformation (Kowarik *et al.*, 2002; Nilsson and von, 1993). C'est le glucose terminal (Figure 15) de l'oligosaccharide qui est l'élément central de reconnaissance de l'OST.



**Figure 15 : Le cœur du N-oligosaccharide**

Les N-glycans sont ajoutés aux polypeptides dans le RE par un lien N-glycosidique sur une Asparagine selon la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. Les résidus glucose et mannose terminaux seront retirés par les glucosidases et mannosidases du RE. Adapté de (Helenius and Aebi, 2001; Nilsson and von, 1993).

### 5.3.3 Le repliement des glycoprotéines

Même si la perte d'un simple glycan ne semble pas essentielle pour une glycoprotéine, celle-ci s'avère souvent importante lorsque plus d'une glycosylation est perdue. L'emplacement des glycosylations prend alors toute son importance dans son effet global. Le repliement des protéines dans le RE commence dès que le polypeptide émerge du translocon et se continue après que la chaîne polypeptidique se soit dissociée du ribosome et du complexe du translocon. Contrairement aux protéines du cytosol, la plupart des protéines du RE vont acquérir des ponts disulfures (Fassio and Sitia, 2002b). De plus, plusieurs protéines sont des oligomères donc vont s'assembler en homo et hétéro-oligomères, ce qui complétera leur processus de repliement (Chen *et al.*, 1995). Il est maintenant connu que lorsque le processus de glycosylation est bloqué, la plupart des polypeptides subissent un mauvais repliement ou un repliement incomplet. Comme ces protéines sont dans l'incapacité d'acquérir leur bonne

conformation, elles ne pourront passer le contrôle de qualité du RE et elles seront retenues au RE et éventuellement dégradées (Klausner and Sitia, 1990). La comparaison des glycoprotéines natives et de leur version non glycosylée démontre que la présence des glycans accroît leur stabilité, leur solubilité et leur résistance aux protéases (Imperiali and O'Connor, 1999). Les processus de rétention et dégradation seront décrits ultérieurement.

#### 5.3.4 Le cycle Calnexine /Calreticuline

Les glycans ont aussi un rôle indirect dans le repliement des protéines et ceci est basé sur la liaison des glycoprotéines nouvellement synthétisées dans le RE aux lectines du RE. Dans ce processus, les glycans servent de signaux de triage que la cellule modifie pour refléter le statut de repliement des protéines. L'existence du cycle Calnexine/Calreticuline a été postulé dans les années 1990 (Hammond *et al.*, 1994; Hammond and Helenius, 1994). Ce processus débute lorsque les glycans sont ajoutés aux polypeptides dans le RE. Le premier glucose est rapidement éliminé par la glucosidase I et est suivi du retrait d'un second glucose par la glucosidase II. Le glycan monoglucosylé généré lie la glycoprotéine aux lectines Calnexine et/ou Calreticuline.

La Calnexine est une protéine transmembranaire de type I tandis que la Calreticuline est une protéine soluble. Ces deux protéines sont des lectines monomériques qui lient le calcium et qui possèdent des signaux de rétention au RE. Ces protéines séquestrent les glycoprotéines et servent de chaperonnes qui préviennent l'agrégation et l'export des protéines mal repliées du RE (Pieren *et al.*, 2005). Ceci protège aussi l'intermédiaire de repliement de la glycoprotéine d'une dégradation prématurée tout en l'exposant à l'Erp57, une thiol-disulfide oxidoreductase qui aide à la formation des ponts disulfures. La formation des ponts disulfures est généralement essentielle au bon repliement. Erp57 forme un complexe avec la Calnexine et Calreticuline et lie directement les glycoprotéines (Fassio and Sitia, 2002a) (Figure 16).

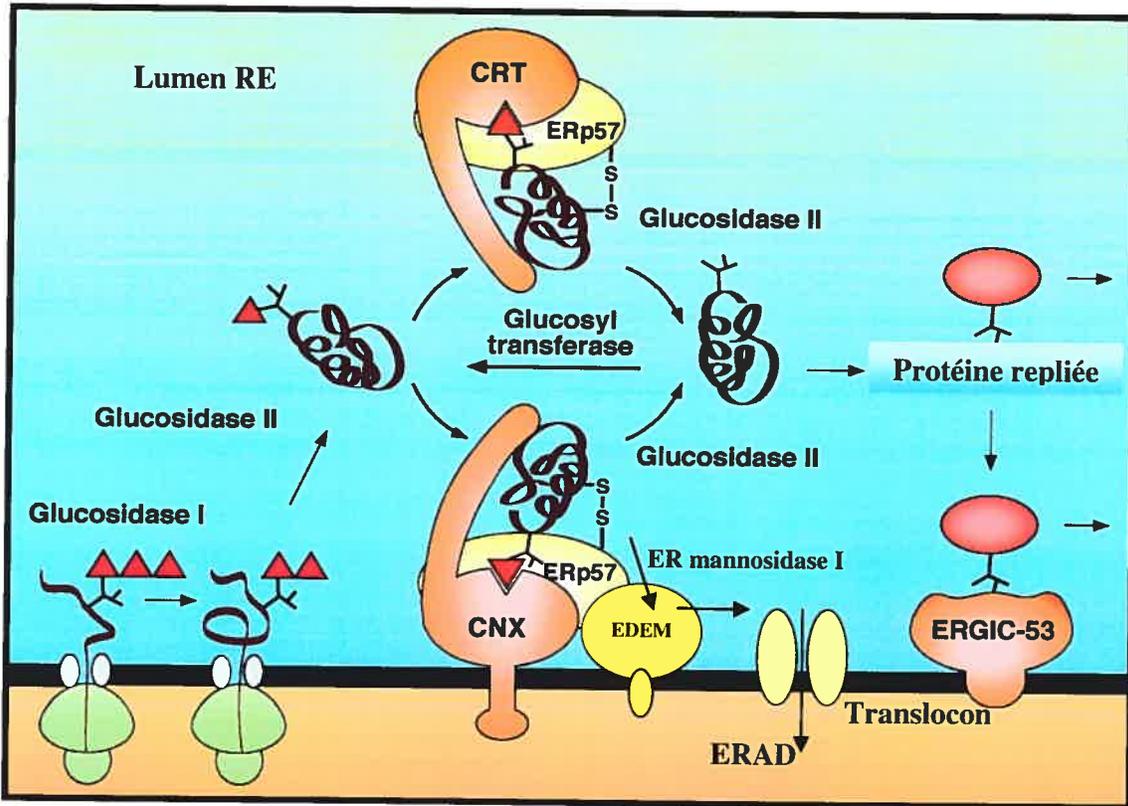
Afin de relarguer les glycoprotéines du cycle Calnexine/Calreticuline, la glucosidase II retire le dernier résidu de glucose restant. La glycoprotéine ne lie plus les lectines et est donc libre de quitter le RE à moins d'être reconnue par une enzyme soluble, l'UDP-Glc ou la glycoprotéine glucosyltransférase (GT). Cette enzyme reglucosyle seulement les glycoprotéines qui ne sont pas complètement repliées ou mal repliées. Lorsque reglucosylées

par la GT, les glycoprotéines relient les lectines et retournent dans le cycle Calnexine/Calreticuline jusqu'à ce qu'elles soient bien repliées et oligomérisées, sinon elles seront dégradées.

La glucosidase I retire le glucose le plus à l'extérieur de la glycoprotéine. C'est une glycoprotéine transmembranaire avec une activité glucosidase. Avec la glucosidase II, elle prévient la liaison de la glycoprotéine à l'OST et permet l'entrée dans le cycle Calnexine/Calreticuline. La glucosidase II joue un double rôle dans le cycle car elle prépare la protéine à entrer dans le cycle et permet aussi sa sortie du cycle, ce qui prévient une saturation du système (Trombetta *et al.*, 1996).

Il existe plusieurs inhibiteurs des glucosidases I et II et des mannosidases comme la Castanospermine (CST) et la N-Méthyl-Déoxynojirimycine (MDNJ) pour les glucosidases I et II, la Kifunensine (KIF) pour la mannosidase I et la 1-Déoxymannojirimycine (DMJ) pour les mannosidases I et II (Marcus and Perlmutter, 2000). Lorsqu'il y a inhibition des glucosidases, il y a accélération et perte d'efficacité du repliement et de la sécrétion des glycoprotéines donc arrêt du système de contrôle de qualité avec sécrétion de protéines mal repliées, dégradation prématurées des protéines et induction du UPR « *Unfolded Protein Response* » (Hebert *et al.*, 1996).

ERGIC-53 est une lectine mannose-spécifique située dans le compartiment ERGIC « *Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment* » qui lie les glycoprotéines hors du cycle Calnexine/Calreticuline (Hauri *et al.*, 2000a; Hauri *et al.*, 2000b). ERGIC-53 servirait de cargo pour le trafic RE→Golgi des glycoprotéines (Figure 16). Cette protéine transiterait du compartiment ERGIC au *cis*-Golgi et serait responsable de l'export de plusieurs glycoprotéines lysosomales et sécrétoires.



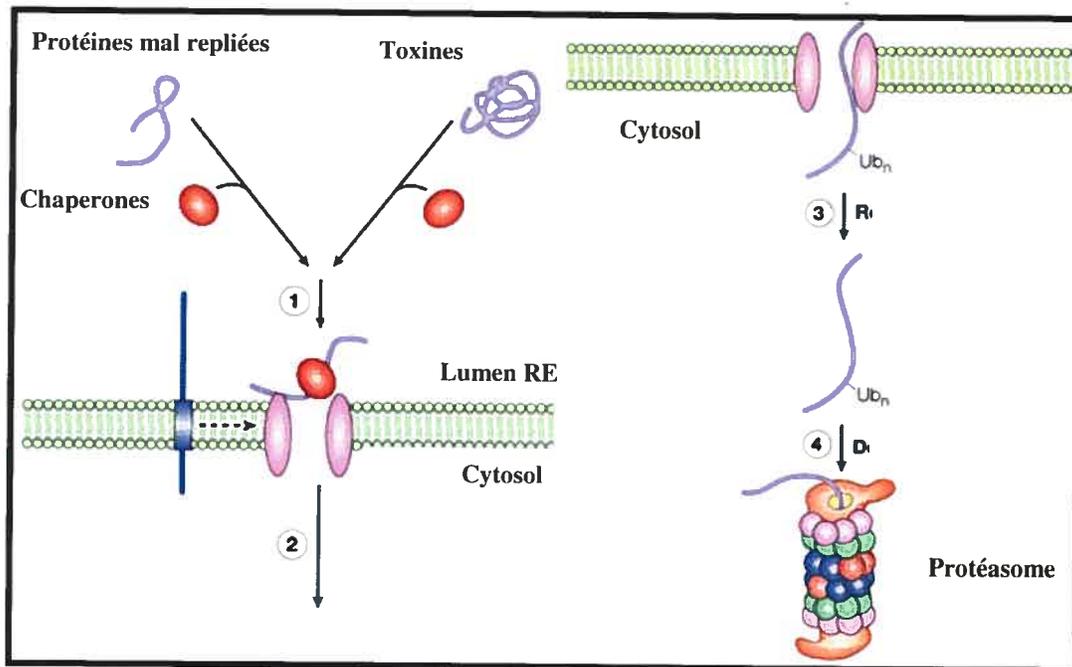
**Figure 16: Le cycle Calnexine/Calreticuline**

Lorsque les glucoses sont retirés par les glucosidases I et II les glycoprotéines lient les lectines Calnexine (CNX) et/ou Calreticuline (CRT) et sont exposées à ERp57 pour la formation de ponts disulfures. Lorsque le dernier glucose est retiré par la glucosidase II, il y a dissociation du complexe et si la protéine est mal repliée, elle sera reglucosylée par la glucosyltransférase (GT). Le cycle est répété jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée ou dégradée. La protéine bien repliée n'est plus reconnue par la GT et liera la lectine ERGIC-53 via ses résidus mannoses pour sa sortie du RE. Sinon, les mannoses seront enlevés et la protéine sera dégradée par l'ERAD. Adapté de (Helenius and Aebi, 2001)

### 5.3.5 La dégradation des glycoprotéines dépendante du RE

Lorsqu'une glycoprotéine est incapable d'acquies sa bonne conformation, elle sera retenue au RE et éventuellement dégradée. Le processus de dégradation utilisé est l'ERAD « *ER - Associated Degradation* » et ce processus prévient l'accumulation de protéines mal repliées et non fonctionnelles dans le RE. Le ERAD est impliqué dans trois étapes qui sont la reconnaissance de la protéine mal repliée, sa retrotranslocation dans le cytoplasme et sa

dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome « ubiquitin-proteasome system » (UPS) (Figure 17) (Yoshida, 2003).



**Figure 17 : ERAD et rétro-translocation**

- ① Les protéines mal repliées sont reconnues et dépliées par les chaperonnes du RE
- ② Les polypeptides passent à travers le pore et sont poly-ubiquitinés dans le cytosol
- ③ Les polypeptides ubiquitinylés ( $Ub_n$ ) sont relargués du RE dans le cytosol et ④ sont dégradés dans le protéasome. Adapté de (Tsai *et al.*, 2002)

Le délai dans la dégradation des glycoprotéines par le ERAD est lié à la taille des mannoses par l'action des mannosidases dont la plus abondante est la  $\alpha$ -1,2 exomannosidase qui est liée à la membrane du RE et qui enlève le mannose terminal de la deuxième branche du coeur de l'oligosaccharide (Chapitre 1 : Figure 15) (Herscovics, 2001). Si les mannosidases sont inhibées par la KIF, un inhibiteur spécifique, la dégradation des glycoprotéines est beaucoup plus lente (Liu *et al.*, 1999). Au contraire, si elle est sur-exprimée, la dégradation sera accélérée (Wu *et al.*, 2003). L'action des mannosidases est assez lente, jusqu'à 1 hre dans certaines cellules de mammifères, ce qui sert de contrôle de protection pour les protéines nouvellement synthétisées (Jakob *et al.*, 1998). EDEM « ER Degradation Enhancing  $\alpha$ -Mannosidase-Like Protein » est aussi inhibée par la KIF et accélère la dégradation si elle est

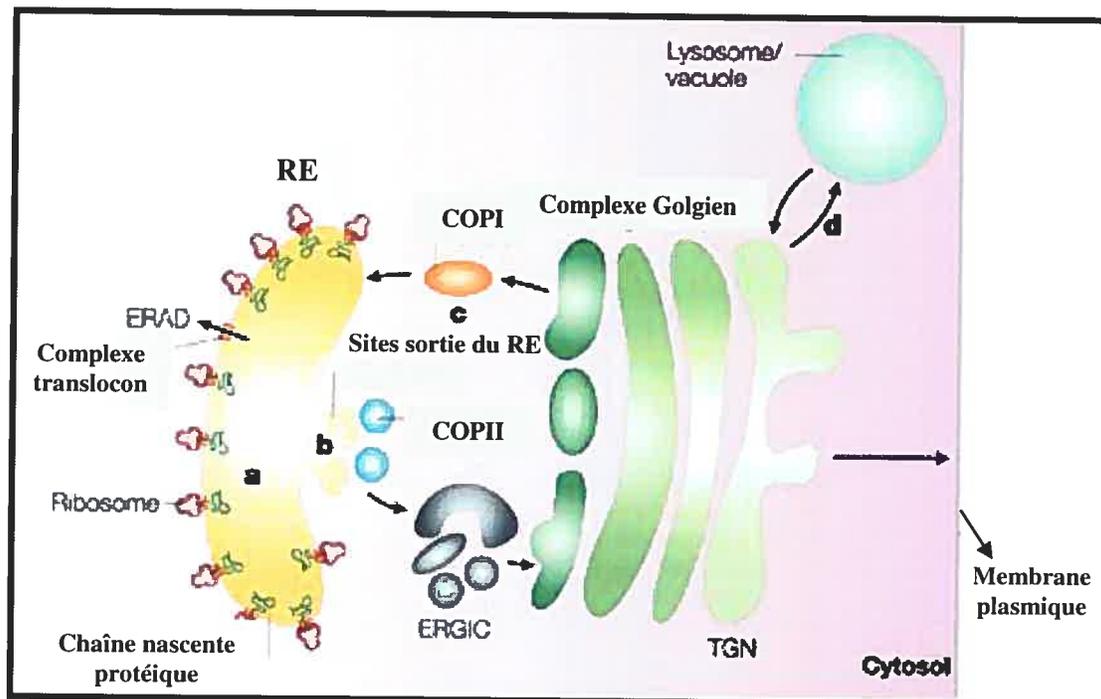
surexprimée. Une fois que la perte de mannoses commence, EDEM compétitionne avec le cycle Calnexine/Calreticuline pour la glycoprotéine. Le rôle de plusieurs de ces mannosidases est mal compris mais on sait que chez les mammifères, en plus d'une RE  $\alpha$ -1,2 mannosidase I, il y a une RE mannosidase II, et ce en plus des autres mannosidases retrouvées dans le Golgi.

### 5.3.6 Export et rétention au RE

Lorsque les protéines du RE rencontrent les « standards » du système de contrôle de qualité, elles peuvent quitter le RE dans des vésicules recouvertes de COPII « *Coat Complex II* » (Palade, 1975). Les glycoprotéines sont recrutées spécifiquement aux COPII par la lectine ERGIC 53 (Chapitre 1 : Section 5.3.4) (Appenzeller *et al.*, 1999). Les protéines membranaires qui sont exportées hors du RE ont des motifs di-acides dans leur partie cytosolique qui seront reconnus par les COPII (Figure 18) (Nishimura and Balch, 1997). Les protéines qui sont résidentes du RE, comme les protéines chaperonnes impliquées dans le remodelage et le contrôle de qualité des glycoprotéines, doivent être retenues au RE pour exercer leur fonction. Ces chaperonnes s'associent entre elles et avec des enzymes de repliement, ce qui leur assure une certaine rétention, mais si elles s'échappent du RE, elles y seront réacheminées grâce à leur signaux de rétention et/ou relocalisation. Par exemple, les protéines luminales du RE ont une séquence KDEL ou un tétrapeptide similaire dans leur domaine C-terminal qui agit comme signal de rétention (Munro and Pelham, 1987). Lorsque ces protéines s'échappent du RE, elles rencontrent rapidement un récepteur KDEL dans le réseau *cis*-Golgi (Scheel and Pelham, 1996; Scheel and Pelham, 1998). Le domaine cytosolique du récepteur KDEL lie les COPI « *Coat Complex I* » qui vont médier le transport vésiculaire rétrograde des protéines vers le RE. Dans le RE, le récepteur KDEL va relarguer son substrat à cause du pH plus élevé dans le RE comparativement au Golgi (Wilson *et al.*, 1993). Ainsi, toute protéine ayant un signal KDEL sera automatiquement ré-acheminée au RE si elle s'en échappe.

Il existe un signal de rétention spécifique pour chacune des différentes topologies de protéines. Les protéines transmembranaires de type I (Chapitre 1 : Figure 14) comme la Calnexine contiennent un motif di-lysines (KKXX ou K(X)KXX) dans leur domaine

cytoplasmique qui agit comme signal de rétention/résidence au RE (Nilsson *et al.*, 1989). Les protéines transmembranaires de type II sont retenues de façon similaire grâce à un motif di-arginines (Schutze *et al.*, 1994). La rétention et la récupération de ces protéines impliquent une interaction directe du motif chargé positivement avec les COPI (Figure 18) (Letourneur *et al.*, 1994).



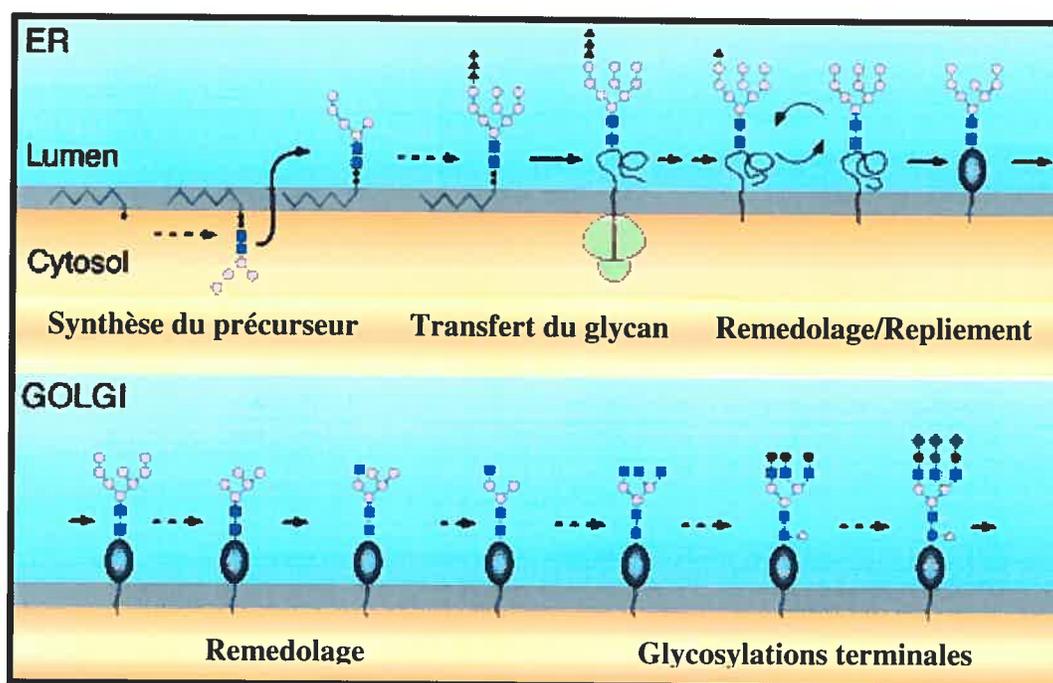
**Figure 18 : La voie sécrétoire et ses organelles**

a. Le RE est le site de synthèse et maturation des protéines qui entrent dans la voie sécrétoire. Les protéines mal repliées seront soumises à l'ERAD. b. Une fois correctement repliées, les protéines se retrouvent aux sites de sortie du RE. c. Les protéines se retrouvent dans les vésicules COPII qui font le trafic RE-Golgi en passant par le compartiment intermédiaire ERGIC situé en *cis*-Golgi. Les protéines mal repliées ou résidentes du RE reviennent via les vésicules COPI. d. Le réseau Golgien ne contient pas de système de contrôle. Les protéines passent donc du *cis*-Golgi au réseau *trans*-Golgi (TGN) jusqu'à la membrane plasmique ou vers les lysosomes/vacuoles. Adapté de (Ellgaard and Helenius, 2003)

### 5.3.7 Remodelage des sucres dans le Golgi

Le RE contient une concentration élevée de chaperonnes moléculaires et d'enzymes de repliement résidentes mais solubles. Dans le Golgi, les protéines résidentes (glycosidases,

glycosyltransférases, enzymes protéolytiques, perméases, lectines et récepteurs de transport) sont liées à la membrane (Balch *et al.*, 1994). Contrairement au RE, le Golgi n'a pas de système de contrôle de qualité et de fidélité de ses processus biosynthétiques. Les défauts de glycosylation sont tolérés par le Golgi. Ceci s'explique en partie par l'architecture multicompartimentale de l'appareil de Golgi. Les molécules qui y entrent sont modifiées progressivement au fur et à mesure qu'elles passent du site d'entrée en *cis*-Golgi au site de sortie en *trans*-Golgi. Les glycoprotéines doivent donc traverser toutes les saccules afin d'être exportées et sont alors exposées à tout un éventail d'enzymes de modification dont des mannosidases (Figure 19).



**Figure 19 : Biosynthèse des N-oligosaccharides**

La synthèse débute à la surface membranaire du RE dans le cytosol. Une fois dans le RE il y a transfert du glycan et la glycoprotéine est soumise au contrôle de qualité du RE. Il y aura remodelage des sucres et une fois bien repliées, les protéines peuvent passer au Golgi où elles subiront remodelage et glycosylations terminales. Adapté de (Helenius and Aebi, 2001)

Le transport vésiculaire *cis-trans* assure un niveau élevé de fidélité dans le processus de biosynthèse sans y imposer un système de contrôle de qualité ce qui permet au Golgi de produire une diversité de structures de protéines (Helenius and Aebi, 2001).

### 5.3.8 Les N-glycans et les lysosomes

L'acheminement des hydrolases lysosomales du réseau *trans*-Golgi (TGN) aux lysosomes implique aussi l'utilisation de lectines (Kornfeld, 1990). Les événements clés ont lieu dans le *cis*-Golgi lorsqu'une enzyme résidente, la UDP-GlcNAc « *Lysosomal Enzyme N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase* » modifie les N-Glycans des hydrolases lysosomales en leur ajoutant un GlcNAc-phosphate sur leur mannose terminal. Après la perte du GlcNAc, le mannose-6-phosphate restant est reconnu par un récepteur mannose-6-phosphate (récepteur M-6-P) dans le TGN. Ces récepteurs séquestrent les enzymes lysosomales, les escortent dans des vésicules de clathrine vers les endosomes et reviennent vides. L'identification des enzymes lysosomales se fait de façon conformation-dépendante et débute par la reconnaissance de résidus lysines critiqueusement espacés à la surface de la protéine (Nishikawa *et al.*, 1999). Les récepteurs M-6-P sont des protéines transmembranaires de type I (Chapitre 1 : Figure 14) dépendants du pH. Cette dépendance est critique car le transport dépend de plus grande affinité du ligand au pH du *cis*-Golgi (pH 6.3 à 6.5) qu'au pH du compartiment de relargage dans les endosomes tardifs (pH 5) (Roberts *et al.*, 1998).

Les protéines résidentes du RE, Golgi, endosomes et lysosomes sont souvent des glycoprotéines. Leur composition en sucres déterminera leur localisation. Au début du cycle, elles possèdent des glycans riches en mannose tandis que dans le Golgi et les organelles *post*-Golgi, les sucres sont plus complexes. Au total, ces glycoprotéines sont plus « économiquement » glycosylées que les protéines de la surface membranaire et de l'espace extracellulaire. Les lysosomes et les organelles reliées sont une exception à cette règle. Leur membrane limitée contient une collection de protéines membranaires fortement glycosylées dont les plus abondantes sont les homologues LAMP1 et LAMP2 (Cha *et al.*, 1990; Fambrough *et al.*, 1988). Ces protéines ont jusqu'à vingt glycosylations chacune et sont en concentration suffisante pour former une enveloppe de carbohydrates continue qui enveloppe la surface luminale de la membrane des lysosomes. Les glycans ont comme fonction de protéger les LAMPs de la dégradation lysosomale (Kundra and Kornfeld, 1999). Les LAMPs contiennent un motif Gly-Tyr cytoplasmique qui sert de signal de ciblage aux lysosomes (Honing *et al.*, 1996; Honing and Hunziker, 1995; Hunziker and Geuze, 1996). LAMP2 est requise pour une dégradation lysosomale efficace après autophagie (Tanaka *et*

*al.*, 2000). Il existe aussi une LAMP3 qui diffère un peu des deux autres par sa structure à quatre domaines transmembranaire et sa localisation dans les endosomes tardifs (Kobayashi *et al.*, 2000). Sa fonction n'est pas encore bien définie.

Environ 1% du génome eucaryote est impliqué dans le maintien et la régulation de la glycosylation des cellules. Le catabolisme lysosomal est une partie importante de ce processus d'homéostasie cellulaire de glycosylation (Winchester, 2005). Ceci est mis en évidence par les nombreuses maladies associées aux défauts de glycoprotéinoses (Michalski and Klein, 1999). Dans le noyau et le cytosol, les protéines à durée de vie courte sont ubiquitinylées et envoyées au protéasome pour leur dégradation tout comme pour celle des glycoprotéines mal repliées (Hilt and Wolf, 2004). Il devient de plus en plus claire que le lysosome et protéasome travaille conjointement dans la dégradation de ces glycoprotéines mal repliées (Suzuki and Lennarz, 2003).

## 6. Gène et protéine Gl

La souris grey-lethal (*gl*), est un modèle de souris ostéopérotique spontané qui est idéal pour l'étude de l'ostéopérose infantile maligne récessive puisque son phénotype est très semblable à celui de la maladie infantile humaine (Chapitre 1 : Section 4.4).

Cette souris a été décrite pour la première fois en 1935 par Grüneberg (Grüneberg H. 1935, Grüneberg H. 1936, Grüneberg H. 1938). Le mutant est apparu de façon spontanée dans les colonies de souris et a pu être identifié facilement par son pelage gris dépourvu de pigment jaune comparativement aux souris sauvages au pelage agouti (Vacher and Bernard, 1999). Déjà à cette époque, le phénotype osseux et la non éruption des dents avaient été observés chez ces mutants. Comme la mutation *gl* est létale à l'état homozygote, la lignée mutante doit être maintenue à l'état hétérozygote et c'est pour ces mêmes raisons, que la mutation récessive viable downless (*dl*) a été introduite pour générer la lignée GL/Le *dl*<sup>l</sup>/+ *gl* afin de suivre la transmission du locus *gl*. Cette lignée a été maintenue à l'état hétérozygote par croisement frère/sœur (intercross) (Vacher and Bernard, 1999).

### 6.1 Phénotypes de la souris grey-lethal (*gl*)

Deux phénotypes principaux caractérisent la souris *gl* : le phénotype ostéopérotique et le phénotype de la coloration du pelage (Figure 20).

#### 6.1.1 Phénotype squelettique

La souris *gl* va développer une ostéopérose autosomale récessive maligne qui se caractérise principalement par un retard de croissance, une forte réduction de la cavité médullaire des os longs et une absence de l'éruption des dents. Le phénotype des souris ressemble énormément à celui de la maladie humaine. L'analyse de la métaphyse des fémurs révèle une cavité médullaire sévèrement réduite et occupée par de l'os trabéculaire calcifié. L'os cortical est peu développé et la plaque de croissance est épaisse comparativement aux souris contrôles. Des analyses histomorphométriques démontrent une augmentation d'environ trois fois de la densité osseuse des souris homozygotes *gl*/*gl* comparativement aux contrôles (Rajapurohitam

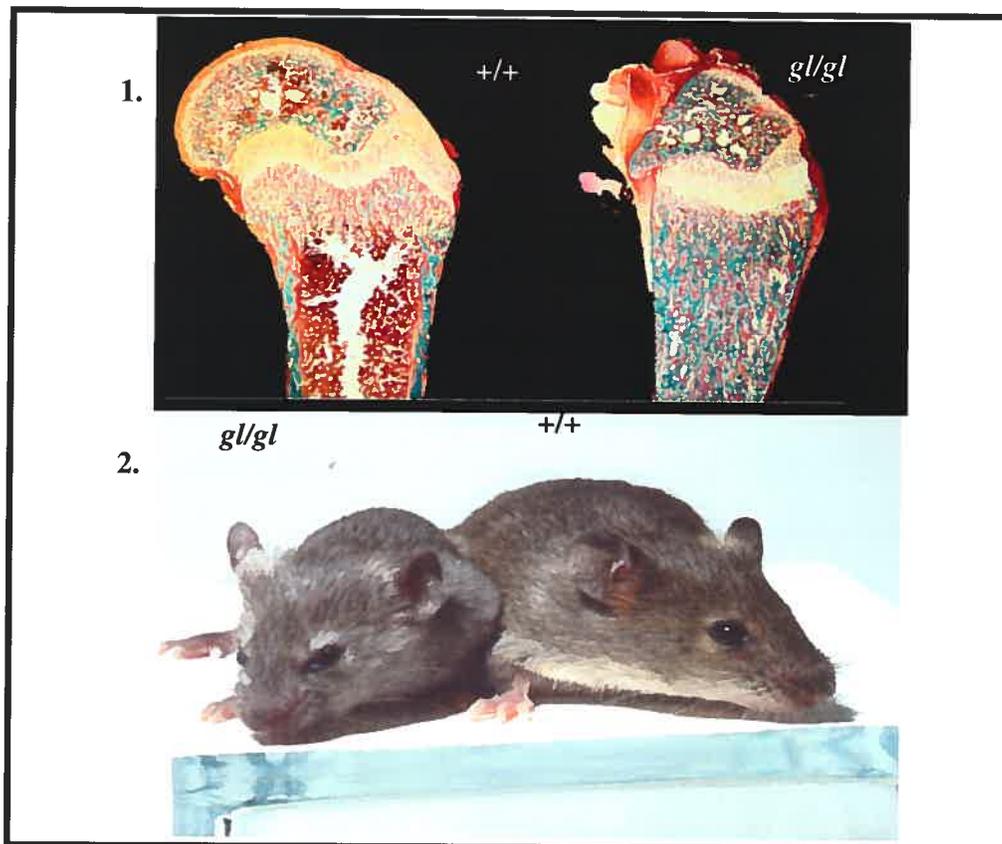
*et al.*, 2001). L'absence de moelle osseuse chez la souris *gl/gl* affecte plusieurs populations hématopoïétiques comme par exemple, une diminution des cellules B (Vacher J., non publié). La souris homozygote pour la mutation meurt à environ trois semaines après la naissance (Grüneberg H. 1938, (Hollinshead *et al.*, 1975). La cause exacte de la mort n'est pas encore complètement élucidée mais plusieurs hypothèses sont émises à ce sujet. Par exemple, les souris mutantes sont plus susceptibles aux infections, elles ont une compression de leurs organes internes et ont de la difficulté à se nourrir vue l'absence d'éruption de dents. Toutefois, malgré une diète riche et liquide et un maintien dans un environnement dépourvu de pathogènes, les souris *gl/gl* meurent toujours au même âge, ce qui implique que d'autres phénotypes sont responsables de la mort prématurée de ces souris. Pour mieux comprendre si le phénotype ostéopétrotique en tant que tel était responsable à lui seul de la mort des souris, une lignée transgénique complémentée pour l'ostéopétrose a été générée. Un phénotype neuronale sévère entraînant la mort des souris à environ 5-7 semaines a été observé chez ces souris transgéniques *gl/gl* complémentées pour le phénotype ostéopétrotique, ce qui impliquerait une fonction essentielle pour Gl au niveau du cerveau (Vacher J., non publié).

### 6.1.2 Phénotype du pelage

L'autre phénotype majeur de la souris *grey-lethal* est celui de la couleur de son pelage. Les souris homozygotes ont un pelage gris dépourvu de pigment jaune (phéomélanine) comparativement aux souris contrôles sauvages ou hétérozygotes qui ont un pelage agouti. Ce phénotype implique donc un défaut de synthèse et/ou de transport et/ou sécrétion du pigment jaune. Il n'est visible que sur fond génétique agouti. La souris *gl/gl* serait noire si maintenue sur fond génétique C57BL/6J (aa, noir).

### 6.2 Caractérisation cellulaire et moléculaire de la souris *gl*

Diverses études autant au niveau moléculaire que cellulaire ont été faites afin de mieux comprendre les divers phénotypes de la souris *gl*. Plus particulièrement, ces études ont permis de caractériser les ostéoclastes et mieux comprendre le phénotype osseux de la souris et de caractériser les mélanocytes et mieux comprendre le phénotype de coloration du pelage.



**Figure 20 : Phénotypes de la souris (*gl*)**

1. Phénotype squelettique de la souris (*gl*). L'histologie des os longs démontre le phénotype ostéopérotique ainsi que l'absence de cavité médullaire et déformation de l'épiphyse de l'os *gl/gl* en comparaison à l'os *+/+*
2. Phénotype de la coloration du poil. La souris *gl/gl* a un pelage gris et la souris sauvage *+/+* a un pelage agouti

### 6.2.1 Les ostéoclastes *gl/gl*

Les premières études effectuées chez la souris *gl* au niveau osseux ont été des essais de complémentation par transplantation de moelle osseuse (Walker, 1975a; Walker, 1975b). Ces essais ont pu démontrer qu'une transplantation de cellules de moelle osseuse ou de la rate provenant de souris sauvages dans des souris *gl* irradiées pouvait corriger l'ostéopérose. De façon inverse, il a été démontré que le transfert de cellules de rate de souris *gl/gl* chez une souris sauvage irradiée induisait le phénotype ostéopérotique (Walker, 1975c). L'ostéopérose des souris *gl* à donc pu être associée à un défaut intrinsèque des cellules

hématopoïétiques et donc des précurseurs des ostéoclastes, excluant l'hypothèse d'un défaut de l'environnement cellulaire au niveau du tissu osseux.

Des études d'analyse des ostéoclastes des souris *gl* ont été entreprises dans le laboratoire afin d'évaluer les défauts cellulaires et moléculaires des ostéoclastes *gl*. Les résultats de ces études associent l'ostéopétrose des souris *gl* à un défaut de résorption et/ou d'activation des ostéoclastes et non un défaut de différenciation. Une coloration à l'acide phosphatase tartrate-résistante (TRAP), un enzyme et marqueur spécifique des ostéoclastes *in vivo* a révélée la présence de l'activité phosphatase des ostéoclastes *gl* sur des coupes d'os longs. Ceci suggère que les cellules sont potentiellement des précurseurs postmitotiques ou des ostéoclastes multinucléés et différenciés. De plus, des quantifications de populations d'ostéoclastes *in vivo* indiquent qu'il y a une augmentation d'environ 20% d'ostéoclastes *gl* comparé aux populations retrouvées dans la souris sauvage. Pourtant, la résorption des cellules *gl/gl* TRAP+ est pratiquement indétectable, ce qui suggère un défaut au niveau de l'activité de résorption des ostéoclastes *gl/gl*. Le défaut de résorption expliquerait le mécanisme compensatoire induisant la différenciation des ostéoclastes et augmentant leur nombre dans l'os (Rajapurohitam *et al.*, 2001).

Les analyses histologiques ont pu détecter des cellules avec des caractéristiques morphologiques et enzymatiques d'ostéoclastes, ce qui implique un défaut fonctionnel et non de différenciation de ces cellules. Les cellules multinucléées observées par microscopie électronique révèlent un bon attachement à la matrice osseuse et une zone claire bien développée et dépourvue d'organelles (Chapitre 1 : Section 1.2.4). Toutefois, les ostéoclastes *gl/gl* ont une bordure plissée peu développée (Figure 21). De plus, en comparant les ostéoclastes *gl/gl* aux cellules sauvages, il a été constaté que ceux-ci ont beaucoup moins de mitochondries, une organelle responsable de maintenir le flux d'ions Ca et H<sup>+</sup> intracellulaire durant la résorption osseuse (Rajapurohitam *et al.*, 2001).

L'activité de résorption des ostéoclastes implique l'attachement de l'ostéoclaste à la matrice osseuse par la zone d'attachement ainsi que la formation de la bordure plissée (Chapitre 1 : Section 1.2.4). Ce processus nécessite la réorganisation des protéines du cytosquelette pour la formation des podosomes et les protéines majeures des podosomes sont l'actine et la vinculine. Des analyses de microscopie confocale d'ostéoclastes sauvages et *gl/gl* sur substrat

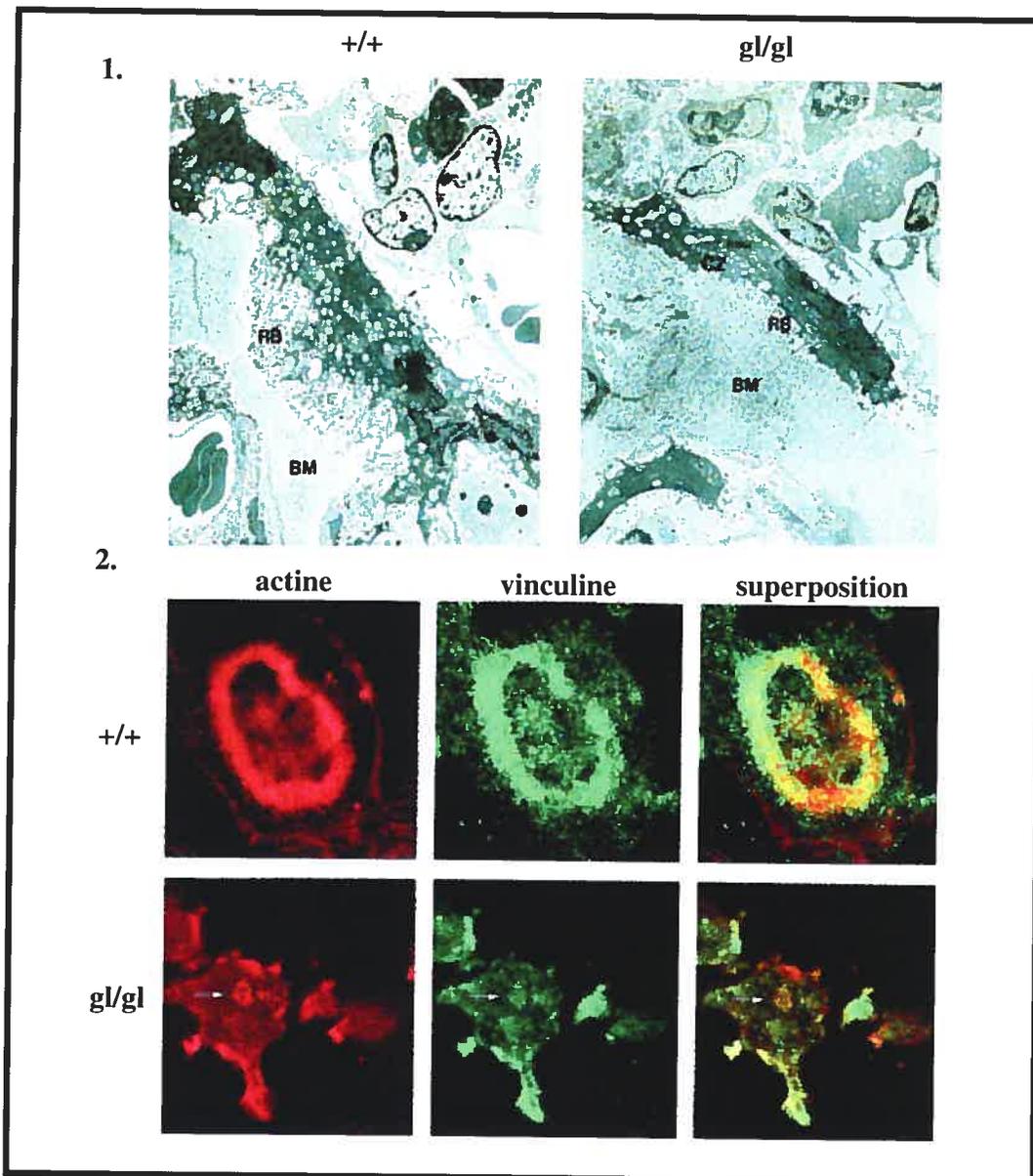
de dentine ont été effectuées afin d'évaluer la réorganisation morphologique et la polarisation de ces cellules. Les ostéoclastes sauvages ont démontré une redistribution des protéines du cytosquelette et conduisant à la formation de l'anneau d'actine tandis que les ostéoclastes *gl/gl* avaient un anneau d'actine sévèrement sous-développé, ce qui est en accord avec le défaut de formation de la bordure plissée (Figure 21) (Rajapurohitam *et al.*, 2001).

### 6.2.2 Les mélanocytes

Il y a peu d'informations sur les mécanismes de synthèse et de sécrétion des mélanines par les mélanocytes chez les souris *gl/gl*. En 1935, Grüneberg a fait des analyses en microscopie sur les follicules de souris *gl* démontrant que le pigment jaune (phéomélanine) et le pigment noir (eumélanine) étaient bien synthétisés mais que la distribution du pigment jaune semblait altérée (Grüneberg H., 1935). Le pigment jaune forme des agrégats au niveau de la base des poils et n'est pas incorporé dans ceux-ci. Ceci veut dire que les mélanocytes *gl/gl* peuvent synthétiser les deux pigments mais qu'il y a un défaut au niveau du transport du pigment jaune seulement. Ce défaut entraîne une coloration grise du pelage sur fond agouti. Des études de complémentation fonctionnelle ont été effectuées dans le laboratoire afin de mieux comprendre les mécanismes de synthèse et sécrétion des mélanines chez la souris *gl/gl* (Vacher J., non publié).

### 6.3 Le gène *gl*

C'est par une approche de clonage positionnel que le laboratoire a pu identifier et caractériser le gène responsable de la mutation *grey-lethal* (Chalhoub *et al.*, 2001; Chalhoub *et al.*, 2003; Vacher and Bernard, 1999). La nomenclature officielle du gène *gl* « *grey-lethal* » identifié par le laboratoire a depuis été modifiée par *Ostm1* « *Osteopetrosis Associated Transmembrane Protein 1* ».



**Figure 21 : Caractérisation des ostéoclastes *gl***

1. Microscopie électronique d'ostéoclastes *in vivo*. La présence de la bordure plissée (RB) et de la zone d'attachement (CZ) de l'ostéoclaste sauvage (+/+) en résorption de la matrice osseuse (BM) sont détectées. Les ostéoclastes *gl/gl* sont bien présents mais ont une RB sous développée.
2. Immunofluorescence d'ostéoclastes cultivés sur dentine. Le cytosquelette de l'ostéoclaste *gl/gl* est désorganisé et il y a absence de formation d'anneau d'actine. Adapté de (Rajapurohitam *et al.*, 2001)

### 6.3.1 Identification de la mutation *gl*

La structure génomique du locus *gl* montre un gène composé de six exons et cinq introns qui couvrent une région d'environ 25 Kb (Chalhoub *et al.*, 2003). Des analyses poussées chez la souris mutante ont permis d'identifier un réarrangement génomique majeur du locus *gl*. Ce réarrangement comprend une délétion d'environ 7.5 Kb éliminant la région promotrice, le premier exon et une partie de l'intron 1. En plus, la caractérisation de l'allèle *gl* a permis de mettre en évidence, à la jonction de la région de délétion, la présence d'un fragment qui correspond à une portion d'un élément répétitif de type LINE-1 (Figure 22) (Chalhoub *et al.*, 2003).

### 6.3.2 L'expression du gène *gl*

Le locus *gl* encode pour un transcrit ubiquiste de 3 Kb dont l'expression est détectée dans le cerveau, le rein, la rate, les ostéoclastes en culture (OCLs), les ostéoblastes primaires (OBs) et les mélanocytes (Figure 22) (Chalhoub *et al.*, 2003). La délétion décrite au niveau de l'allèle *gl* abolit complètement l'expression du gène *gl*. Des analyses d'hybridation *in situ* ont pu confirmer l'expression du gène *in vivo* (Figure 22). L'expression du gène est détectée au jour embryonnaire E12.5 au niveau du placenta, du foie fœtal et du cerveau. Au jour E15.5, l'expression se localise au niveau des vertèbres en développement et dans l'épiderme. Au jour 10 après la naissance (P10), l'expression est bien définie au niveau du cerveau, de l'hippocampe, du cervelet, de la peau, des reins, de la rate, des vertèbres, de l'intestin et du thymus (Figure 22) (Chalhoub *et al.*, 2003).

## 6.4 Grey-lethal chez l'humain

En utilisant la séquence protéique complète de Gl chez la souris dans les bases de données, plusieurs protéines homologues ont été identifiées chez différentes espèces dont *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, les vertébrés (Rat, poulet,...) et *Homo Sapiens*.

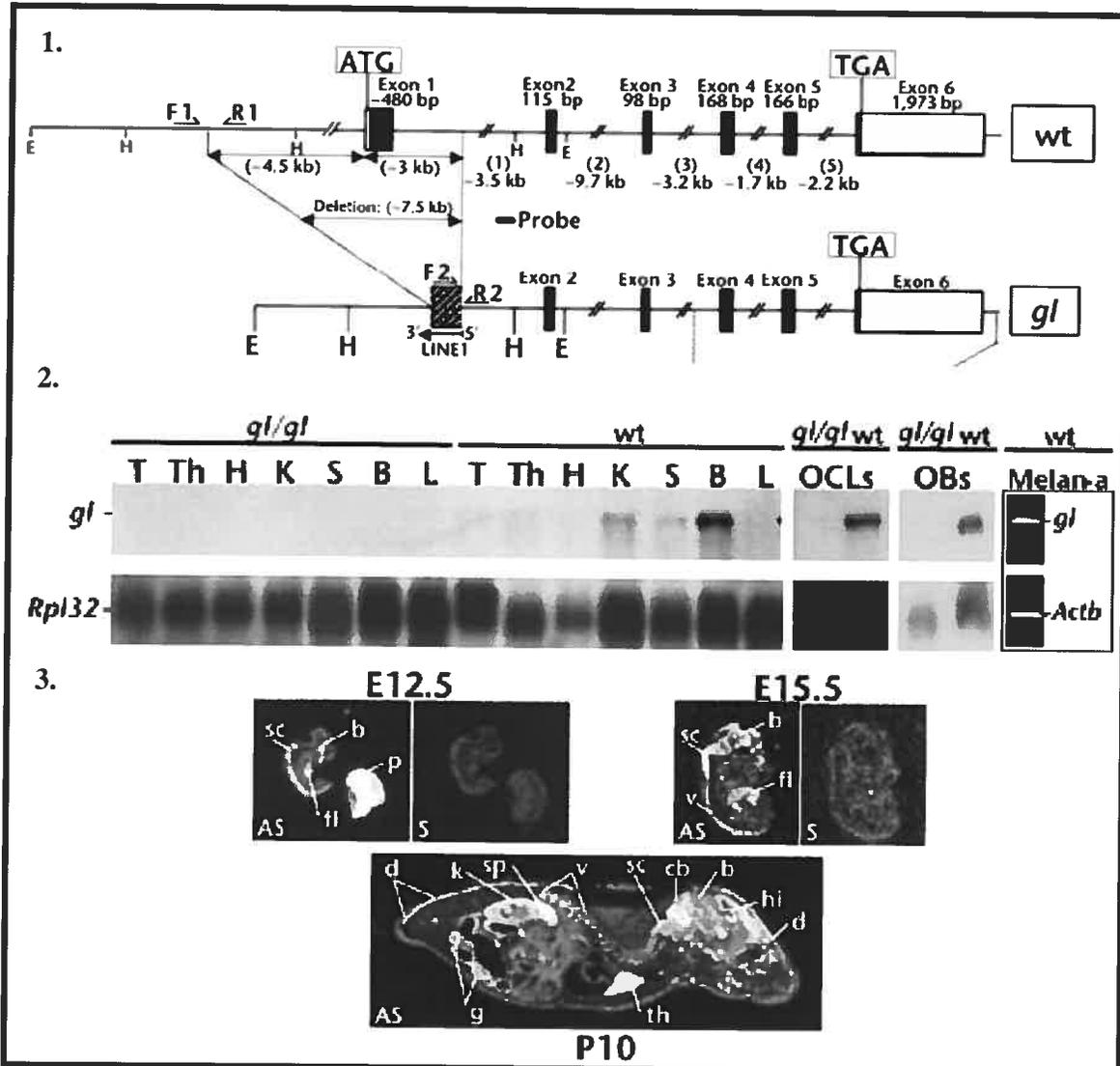


Figure 22 : Caractérisation du gène *gl*

1. Structure génomique du gène *gl* : allèle sauvage (WT), allèle muté (*gl*), exons codants (■), exon non codant (□), séquence LINE-1 (▨).
  2. Northern d'ARN total du patron tissulaire d'expression du gène *gl* : testicules (T), thymus (Th), cœur (H), rein (K), rate (S), cerveau (B), foie (L), ostéoclastes en culture (OCLs), ostéoblastes primaires (OBs) et mélanocytes (Melan-a).
  3. Analyse *in situ* de l'expression du gène *gl* pendant le développement : placenta (p), foie foetal (fl), cerveau (b), peau (sc), vertèbres (v), hippocampe (hi), cervelet (cb), reins (k), rate (sp), intestins (g), thymus (th).
- Adapté de (Chalhoub *et al.*, 2003)

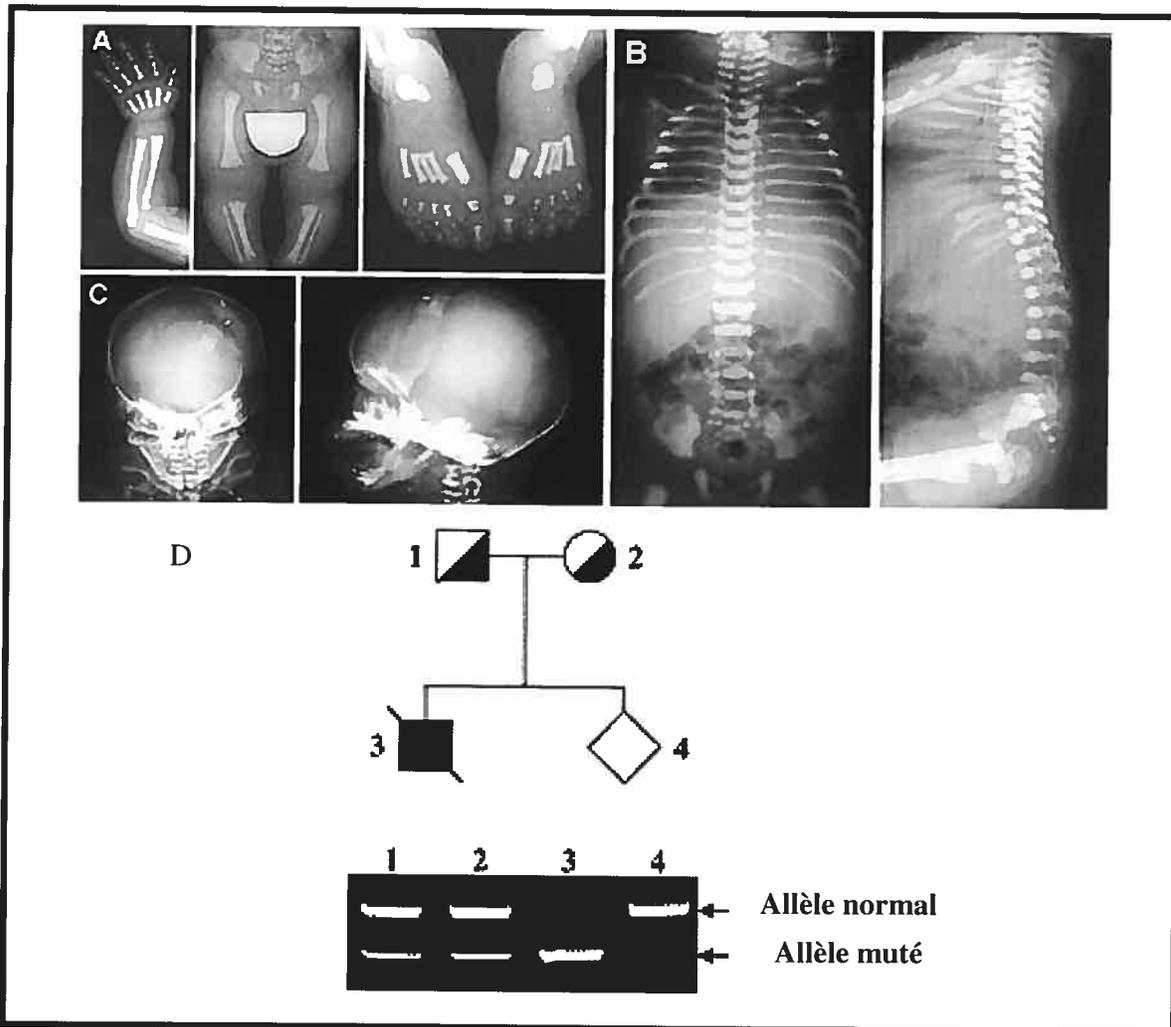
#### 6.4.1 Mutation ostéopétrotique du gène *GL* humain

Bien qu'il existe de nombreux mutants ostéopétrotiques spontanés et induits chez la souris, seulement trois gènes ont été associés à l'ostéopétrose récessive humaine : *CLCN7* qui code pour le canal chlore 7 ou *CLC-7*, *TCIRG1* qui code pour la sous-unité  $\alpha 3$  de la pompe  $H^+$ -ATPase et *GL* (Chapitre 1 : Section 4.1.3). C'est dans le laboratoire du Dr. Vacher que la première mutation humaine a été caractérisée. Cette mutation a été associée au développement de la forme sévère d'ostéopétrose infantile maligne humaine. La mutation est une substitution G→A en position +5 du site d'épissage de l'intron 5. La mutation induit un épissage aberrant qui produit un transcrite tronqué où l'exon 5 est absent (Figure 23) (Chalhoub *et al.*, 2003;Quarello *et al.*, 2004). On peut constater sur la Figure 23 que les deux parents (1 et 2) sont hétérozygotes pour la mutation. Un premier enfant (3) du couple a été diagnostiqué homozygote pour la mutation grâce à une analyse de PCR et de digestion effectuée par le laboratoire. Il est mort à l'âge de 31 jours. Heureusement, le diagnostic du deuxième enfant du couple au stade foetal (4) a permis de déterminer que celui-ci n'était pas porteur de la mutation (Quarello *et al.*, 2004).

Depuis, d'autres mutations dans le gène *GL* humain ont été identifiées, révélant ainsi l'importance de *GL* dans l'étude de l'ostéopétrose infantile maligne récessive. Une étude récente de ces patients a de plus confirmé le rôle de *GL* dans le système nerveux central qui est fortement affecté chez ces patients comme chez le modèle murin (Pangrazio *et al.*, 2006;Ramirez *et al.*, 2004).

#### 6.5 La protéine *Gl*

Lorsque le gène grey-lethal a été identifié, on a noté qu'il codait pour une nouvelle protéine (*Gl* ou *OSTM1*) dont la séquence ne semblait pas avoir d'homologie avec d'autres protéines connues. La protéine *Gl* est composée de 338 acides aminés, ce qui confère une taille d'environ 38 KDa. La séquence comprend un peptide signal potentiel en région N-terminale, un domaine transmembranaire potentiel en région C-terminale et une dizaine de sites potentiels de N-Glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) situés dans la partie centrale de la protéine (Figure 24).



**Figure 23 : Mutation ostéopérotique du gène *GL* humain**

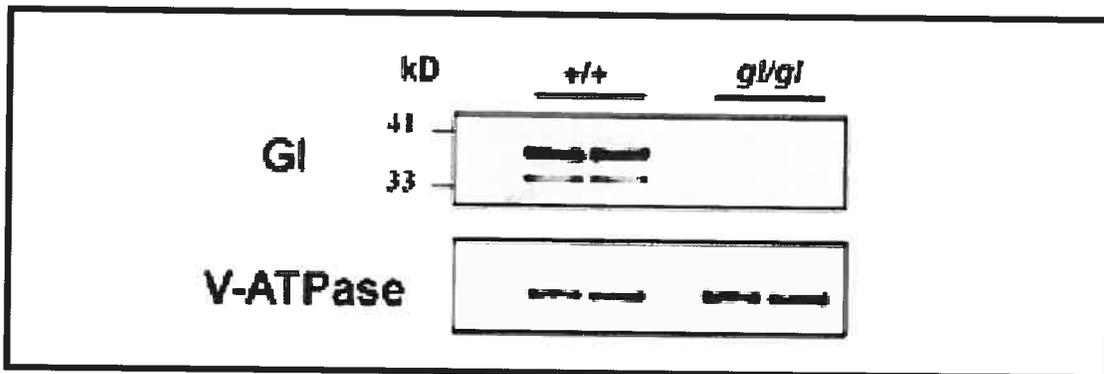
Patient ostéopérotique pour la mutation *GL*. A. Changements dans la métaphyse des os longs et des membres B. Les côtes sont uniformément sclérotiques C. Apparence du « masque arlequin » du crâne. La base du crâne est sclérotique et il y a un développement dentaire anormal. D. Diagnostic prénatal : les parents (1,2) sont hétérozygotes, l'enfant décédé (3) était homozygote pour la mutation mais le fœtus (4) est homozygote pour l'allèle normal (Quarello *et al.*, 2004).

Souris	MARD <sup>▼</sup> ELARSSGWPWRWLPALILLQLLWRCALCALPFTSSRHEGFADLLSEQQLLEVCD	60
Homme	MEPGPTAAQRRCSLPPWLPILGILLWS--GLALGALPFGSSPHRVFHDLLSEQQLLEVED	57
	*	
Souris	LTL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> LQGGGLGPLS-LPPDL <sup>*</sup> PDLEPECRELLMDFANSSAELTACM <sup>*</sup> VRSARPVRLQQT <sup>*</sup> CY	120
Homme	LSL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> LQGGGLGPLS-LPPDL <sup>*</sup> PDLDPECRELLMDFANSSAELTGCL <sup>*</sup> VRSARPVRLQQT <sup>*</sup> CY	116
	* * *	
Souris	PLFQQVAIKM <sup>*</sup> NI <sup>*</sup> SRNIGNTSEGPRCGSILLTADRMQIVLMVSEFFNS <sup>*</sup> TWQEANCANCLT	180
Homme	PLFQQV <sup>*</sup> VS <sup>*</sup> KM <sup>*</sup> NI <sup>*</sup> SRAAGNTSESQSCAR <sup>*</sup> SLLM <sup>*</sup> ADRMQIVWILSEFFNT <sup>*</sup> TWQEANCANCLT	176
	* * *	
Souris	NNGEELSN <sup>*</sup> NTED <sup>*</sup> E <sup>*</sup> LSLFNKTLACFEHNLQGHY <sup>*</sup> SLLPPKNYSEVCRNCKEAYKNLSL <sup>*</sup> LYS	240
Homme	NNSEELSN <sup>*</sup> STVY <sup>*</sup> FLNLFNHTLT <sup>*</sup> CFEHN <sup>*</sup> LQGN <sup>*</sup> AH <sup>*</sup> SLLQT <sup>*</sup> KNYSEVCKNCREAYKTLSS <sup>*</sup> LYS	236
	* *	
Souris	QM <sup>*</sup> KLNGLENKAEPETHLCIDVEDAMNITRKLWSRTFNCSV <sup>*</sup> TCSDT <sup>*</sup> VS <sup>*</sup> VWAVSVFILFLP	300
Homme	EM <sup>*</sup> QK <sup>*</sup> NELENKAEPETHLCIDVEDAMNITRKLWSRTFNCSV <sup>*</sup> FCSDT <sup>*</sup> V <sup>*</sup> PVIAVSVFILFLP	296
	* *	
Souris	VVFYLSSFLHSEQK <sup>*</sup> KRKLI <sup>*</sup> L <sup>*</sup> PKRLKSSTSFANIQENAT	338
Homme	VVFYLSSFLHSEQK <sup>*</sup> KRKLI <sup>*</sup> L <sup>*</sup> PKRLKSSTSFANIQENSN	334

**Figure 24 : La protéine Grey-Lethal**

La protéine murine Gl contient 338 a.a. et a une homologie de 83% avec la protéine humaine de 334 a.a. Elle contient un peptide signal potentiel (▼), 10 sites potentiels de N-glycosylation (\*) et un domaine transmembranaire potentiel (souligné). Adapté (Chalhoub *et al.*, 2003)

Il a été démontré par Chalhoub *et al* que le locus *gl* code pour un transcrit unique de 3Kb dont l'expression est complètement abolie chez les souris *gl/gl*. Des analyses de type Western effectuées dans le laboratoire avaient identifié deux protéines d'environ 34 kDa et 38 kDa avec des extraits protéiques d'OCLs sauvages. Comme contrôle, des extraits d'OCLs *gl/gl* ont été utilisés et comme prévu, les deux protéines ne se retrouvent pas dans ces extraits (Figure 25) (Chalhoub *et al.*, 2003).



**Figure 25 : Analyse de la protéine Gl**

Analyse Western d'extraits protéiques d'OCLs avec un anticorps polyclonal contre la protéine Gl. Les deux protéines de 34 KDa et 38 KDa sont absentes dans les extraits *gl/gl*. (Chalhoub *et al.*, 2003)

### 6.5.1 Homologie humaine de la protéine Gl

La protéine humaine est composée de 334 acides aminés, comparativement à la protéine de souris qui en contient 338 (Figure 24). La protéine humaine a donc environ 83% d'homologie avec la protéine de souris. La région de la protéine humaine qui diffère le plus de celle de la souris est la région en N-terminal qui coderait pour une séquence potentielle de peptide signal tandis que la région C-terminale de la protéine est très conservée entre l'homme et la souris (Chapitre 1 : Section 6.5) (Chalhoub *et al.*, 2003).

## 7. Objectif

L'étude de la protéine Gl « *Grey-Lethal* » constitue l'intérêt principal de ce mémoire. L'objectif de mes travaux était de caractériser la protéine Gl dans le but de mieux définir son rôle cellulaire. Mes objectifs spécifiques visaient (1) la caractérisation structurale de la protéine, (2) la localisation intracellulaire de la protéine et (3) l'identification de partenaires potentiels de la protéine. La fonction de la protéine Gl sera donc mieux définie en combinant les résultats obtenus par ces diverses approches.

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. Caractérisation de la protéine

### 1.1 Constructions

Les constructions utilisées pour caractériser la protéine GL ont été générées par réaction PCR. Les constructions ont été intégrées dans le vecteur pHA.CE (PKCLab) qui est un vecteur dérivé du pcDNA3 contenant une séquence Kozak (séquence qui précède le codon d'initiation de transcription et qui amplifie celle-ci) suivie d'un site de clonage EcoRI et de l'épitope tag HA en C-terminal (Kozak, 1984;Kozak, 1987). Les deux constructions sont GL-FL-pHA.CE et GL $\Delta$ (TM+CT)pHA.CE. La construction GL-FL-pHA.CE contient la séquence complète de *gl* tandis que GL $\Delta$ (TM+CT)pHA.CE contient la séquence tronquée de *gl* allant de l'ATG jusqu'au début du domaine transmembranaire potentiel situé dans le 5<sup>ème</sup> exon, c'est-à-dire incluant la séquence ...VTCSDT, donc dépourvue du domaine transmembranaire et C-terminal. Les amorces utilisées pour générer ces fragments sont GL-ATG\_EcoRI\_FOR pHA.CE et GL-TGA\_EcoRI\_REV pour la construction GL-FL-pHA.CE et les amorces GL-ATG\_EcoRI\_FOR et GL-TM\_EcoRI\_FOR pour la construction GL-TM-pHA.CE (Tableau I) (Figure S1 en Annexe).

La PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl PH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 $\mu$ M de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO, 0,5 unité de Taq polymérase et 0,6 $\mu$ M de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à 94° suivi d'une série de 30 cycles de 30 sec à 94°, 30 sec à 65° et 1 min à 72° puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°. Les fragments générés ont ensuite été digérés par l'enzyme EcoRI avant d'être insérés dans le vecteur pHA.CE préalablement digéré EcoRI. La ligation a été effectuée à 16° pendant environ 16 hres dans un volume final de 10 $\mu$ l en présence de tampon de ligation 1X final (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM dithiothreitol, 25 $\mu$ g/ml BSA), 1mM ATP et 0,2 U de T4 DNA ligase. Les bactéries électro-compétentes *E.coli* (XL-1) ont été transformées avec ce produit de ligation puis étalées sur pétris de sélection LB-Agar (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1,5% (w/v) agar, 1% (w/v) NaCl) contenant 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline (Amp) pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans un milieu LB (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1%

(w/v) NaCl) contenant 100µg/ml Amp. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré EcoRI afin de vérifier la présence de l'insert. Un clone pour chacune des constructions a été sélectionné pour être séquencé. L'ADN plasmidique des clones ainsi que le vecteur pHA.CE ont été purifiés par ultracentrifugation sur gradient de césium.

## 1.2 Peptide signal

L'ADN plasmidique du clone GL-FL-pHA.CE a été dilué à concentration finale de 0,25µg/µl dans du TE (10 mM Tris pH8.0, 1mM EDTA pH 8.0) pour la transfection. Ce clone a été transfecté par la méthode Effectene (QIAGEN : Effectene Transfection Reagent Handbook) à raison de 1µg d'ADN dans un pètri de 6cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 25) dans des cellules HEK-293 en culture dans le milieu  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium Eagle de Sigma), 2 mM L-glutamine, 10% Sérum Bovin Foetal (FBS de Invitrogen) inactivé, Streptomycine 100µg/ml, Pénicilline 60µg/ml, incubées à 37° à 0,5% CO<sub>2</sub>. Après 48 hres, les cellules ont été pré-incubées pendant 1 hre dans un milieu dépourvu de leucine (Leu) avant d'être incubées pour une biosynthèse de 3 hres en présence de 2 ml de milieu contenant de la leucine triciée (Leu<sup>3</sup>H de Amersham) à raison de 500µCi/ml. Les cellules ont ensuite été lysées dans 1 ml de tampon RIPA 1X (50 mM Tris-HCl pH7,5, 1% NP-40, 0,5% désoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 0,1mM PMSF (Boehringer Mannheim), 1 pastille/4ml d'inhibiteurs de protéases Inhibitor Complete (ROCHE). L'extrait protéique a été centrifugé à 12 000 rpm à 4° pour une période de 10 min après une lyse de 30 min sur glace. Les fractions du culot et surnageant ont été séparées et seul le surnageant a été utilisé pour faire une immunoprécipitation. L'extrait a été incubé avec agitation environ 16 hres à 4° avec 25µl de billes enrobées de l'anticorps anti HA-agarose (Santa-Cruz). L'extrait a ensuite été centrifugé 2 min à 8000 rpm et le surnageant a été prélevé à la seringue. Les billes ont été lavées 2 fois dans 0,5ml de tampon RIPA 1X, une fois dans le tampon de lavage RIPA 2 (50mM Tris-HCl pH7,5, 500mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,05% désoxycholate) et une fois dans le tampon de lavage RIPA 3 (10mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% NP-40, 0,05% désxycholate) avant d'être bouillies 8 min dans du tampon 3X Sample Buffer (0,1875M Tris-HCl pH6,8, 6%SDS, 30% Glycérol, 0.006% Bleu de Bromophénol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). Les extraits ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel dénaturant de 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Le gel a été migré à 20V environ 16 hres et a été transféré sur

membrane Immobilon (Amersham) pendant 90 min à 100V. Avant le transfert, la membrane a été rincée à l'éthanol puis à l'eau et ensuite la membrane et le gel ont été équilibrés 2 fois 10 min dans le Tampon de Transfert 1X (0.234% CAPS, 10% méthanol, pH11,0). Après le transfert, la membrane a été bien séchée avant d'être exposée sur une membrane Tricium\* avec un film BioMax<sup>MR</sup> (Kodak) pendant quelques heures. La bande a été découpée et la protéine séquencée.

### 1.3 Charge et chasse (Pulse-Chase)

La construction GL-FL-pHA.CE a été transfectée dans des cellules HEK (comme décrit en Chapitre 2 : Section 1.2) à raison de 0.5µg d'ADN par pétri de 3.5cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 25). Après 48 hres, les cellules ont été pré-incubées pendant 1 hre dans un milieu dépourvu de Méthionine et de Cystéine (-Mét/-Cys) afin de diminuer le pool d'a.a. dans les cellules avant d'être incubées pour une biosynthèse de 15 min (la charge ou le pulse) en présence de 1ml milieu contenant de la Méthionine\*/Cystéine\* (Mét<sup>35S</sup> ou EasyTag et Cys<sup>35S</sup> de Amersham) à raison de 250µCi/ml (125µCi/ml de Méthionine\* et 125µCi/ml de Cystéine\*). Après une charge de 15 min, le milieu a été changé par un milieu enrichi en acides aminés (50X) pour faire la chasse. L'un des trois pétris a été arrêté tout de suite après 15 min de charge en y ajoutant 0,5 ml de RIPA 1X tandis que le milieu radioactif a été retiré. Dans les deux autres pétris le milieu a été remplacé par un milieu non-radioactif enrichi en a.a. pour une période de 45 min et 90 min (la chasse) avant d'être arrêtés par 0,5ml de tampon RIPA 1X. Après une lyse de 30 min sur glace, les cellules ont été centrifugées et les surnageants ont été incubés avec 25µl de billes enrobées de l'anticorps anti HA-agarose (Santa-Cruz) comme décrit plus haut. Le lendemain, les billes ont été centrifugées et lavées avant d'être bouillies et déposées sur gel dénaturant de 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Le gel a été migré à 20V environ 16 hres, fixé 45 min dans un Tampon de Fixation (40% éthanol, 10% acide acétique) avant d'être fixé un autre 45 min dans le Tampon Amplify (Amplify Fluorographic Reagent de Amersham Biosciences). Le gel a ensuite été séché à 80° environ 1 hre et exposé sur films Biomax (KODAK).

## 1.4 Domaine Transmembranaire et Sécrétion

Les constructions GL-FL-pHA.CE, GL $\Delta$ (TM+CT)-pHA.CE ainsi que le vecteur pHA.CE seul ont été transfectées dans des cellules HEK (comme décrit en Chapitre 2 : Section 1.2) à raison de 0,5 $\mu$ g d'ADN par pétri de 3 cm (ratio ADN/Effectene de 1:25). Après 48 hres, les cellules ont été pré-incubées pendant 1 hre dans un milieu dépourvu de Méthione et Cystéine (-Mét/-Cys) avant d'être incubées pour une biosynthèse de 3 hres en présence de 1ml milieu contenant de la Méthionine\*/Cystéine\* (Mét<sup>35S</sup> ou EasyTag et Cys<sup>35S</sup> de Amersham) à raison de 250 $\mu$ Ci/ml (125 $\mu$ Ci/ml de Méthionine\* et 125 $\mu$ Ci/ml de Cystéine\*). Le milieu a été récupéré et centrifugé à 3800 rpm pendant 8 min pour être décanté et ainsi récupérer un milieu dépourvu de cellules. Les cellules ont été lysées dans 0.5ml de tampon RIPA 1X et centrifugées (comme décrit en Chapitre 2 : Section 1.2). Les extraits cellulaires et les milieux ont été incubés avec rotation environ 16 hres à 4° avec 25 $\mu$ l de billes enrobées de l'anticorps anti HA-agarose (Santa-Cruz). Les billes ont été centrifugées, lavées et bouillies avant d'être déposées sur gel dénaturant de 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Le gel a été migré à 20V environ 16 hres, fixé 45 min dans le Tampon de Fixation et fixé un autre 45 min dans le Tampon Amplify. Le gel a ensuite été séché à 80° environ 1 hre et exposé sur films Biomax (KODAK).

## 1.5 Études de glycosylation

Plusieurs études de glycosylation ont été faites à l'aide de nos constructions qui ont été transfectées dans les cellules HEKs. Les différents traitements subis sont décrits dans les sections qui suivent.

### 1.5.1 Tunicamycine et Brefeldine A

Pour les traitements à la Tunicamycine et à la Brefeldine A (BFA) (Sigma), la construction GL-FL-pHA.CE a été transfectée dans des cellules HEK comme décrit plus haut à raison de 0,5 $\mu$ g d'ADN par pétri de 3.5cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 25) avec le vecteur pHA.CE seul comme contrôle. Après 48 hres, les cellules ont été pré-incubées pendant 1 hre dans un milieu dépourvu de Méthionine et Cystéine (-Mét/-Cys) avant d'être incubées pour une

biosynthèse de 3 hres présence de 1ml milieu contenant de la Méthionine\*/Cystéine\* à raison de 250 $\mu$ Ci/ml (125 $\mu$ Ci/ml de Méthionine\* et 125 $\mu$ Ci/ml de Cystéine\*). Les pétris qui ont subi les traitements à la Tunicamycine et la BFA ont été traités pendant la pré-incubation et la biosynthèse à raison de 5 $\mu$ g/ml de Tunicamycine et 2,5 $\mu$ g/ml de BFA. Les cellules de chacun des pétris ont été lysées avec 0,5 ml de tampon RIPA 1X et les extraits protéiques ont été incubés avec 25  $\mu$ l de billes enrobées de l'anticorps HA-agarose. Les billes ont été lavées, bouillies et puis déposées sur gel 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Après migration, le gel a été migré, fixé, séché et exposé sur films Biomax (Chapitre 2 : Section 1.4).

### 1.5.2 KIF, CST, DMJ, MDNJ

Pour les traitements à la Kifunensine (KIF), à la Castanospermine (CST), à la 1-Déoxymannojirimycine (DMJ) et au N-Methyl-Déoxynojirimycine (MDNJ) (Calbiochem), des pétris 3,5cm de cellules HEK ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de la construction GL-FL-pHA.CE comme mentionné plus haut. Les traitements ont débuté après 48 hres à concentration de 10 $\mu$ g/ml pendant la pré-incubation et la biosynthèse (3 hres) en Méthionine\*/Cystéine\* à raison de 250 $\mu$ Ci/ml (125 $\mu$ Ci/ml de Méthionine et 125 $\mu$ Ci/ml de Cystéine). La biosynthèse a été stoppée par 0,5 ml de tampon RIPA 1X par pétri et l'extrait cellulaire a été incubé avec des billes HA-agarose. Les billes ont été lavées, bouillies et puis déposées sur gel d'électrophorèse de 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Après migration, le gel a été migré, fixé, séché et exposé sur films Biomax (Chapitre 2 : Section 1.4).

### 1.5.3 EndoH et pGNaseF

Pour les traitements EndoH et pGNaseF, les cellules HEK d'un pétri de 6cm ont été transfectées avec 1,0 $\mu$ g de la construction GL-FL-pHA.CE (ratio ADN-Effectene 1 :25). Après 48 hres, les cellules ont été pré-incubées dans un milieu dépourvu de Méthionine/Cystéine suivi d'une biosynthèse (3 hres) en Méthionine\*/Cystéine\* à raison de 250 $\mu$ Ci/ml (125 $\mu$ Ci/ml de Méthionine et 125 $\mu$ Ci/ml de Cystéine). La biosynthèse a été arrêtée par 1 ml de tampon RIPA 1X. L'extrait cellulaire a été divisé en trois fractions égales

et chacune a été incubée avec 20 $\mu$ l de l'anticorps HA-agarose. Après le lavage des billes, les 3 fractions ont été incubées environ 16 hres à 37° dans leur milieu respectif : le tube contrôle (20 $\mu$ l d'échantillon) avec 2 $\mu$ l de tampon 10X G5 Buffer (1X : 50 mM sodium citrate à pH 5,5) , le tube EndoH avec 2 $\mu$ l de tampon 10X G5 Buffer et 5 $\mu$ l d'EndoH et le tube pGNaseF avec 2 $\mu$ l de 10X G7 Buffer (1X : 0,5 M sodium phosphate à pH 7,5) , 2,2 $\mu$ l de NP-40 10% et 5 $\mu$ l de pGNaseF (Kits et protocoles EndoH et pGNaseF chez NEB). Les extraits ont été bouillis et puis déposés sur gel 8% polyacrylamide (Tricine-SDS-Polyacrylamide). Après migration, le gel a été fixé, séché et exposé sur films Biomax (Chapitre 2 : Section 1.4).

## 2. Localisation de la protéine

Trois constructions ont été générées pour l'étude de localisation de la protéine. Les constructions ont été insérées dans le vecteur pEGFP.N1 (BD Biosciences Clontech) dont le gène EGFP « Green Fluorescent Protein » est située en fusion en aval du site de clonage du vecteur.

### 2.1 Constructions

La première construction, GL-FL-pEGFP.N1, comprend la séquence complète ou « Full-Length » de *gl* (GL-FL). La deuxième construction est la GL $\Delta$ (CT)-pEGFP.N1 qui contient la séquence de *gl* de la Méthionine à l'a.a 312 (...FLHSE). Cette construction comprend le domaine transmembranaire potentiel (+TM) de *gl* mais le domaine C-Terminal situé en aval du domaine transmembranaire potentiel a été éliminé (-CT). La troisième construction est la GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 qui comprend la séquence de *gl* allant de la Méthionine jusqu'au site de digestion HindIII (...NITKRL) situé dans l'exon 5 de *gl*. Cette construction est donc dépourvue du domaine transmembranaire potentiel et de la région C-Terminale de *gl* (Figure S1 en Annexe).

La construction GL-FL comprenant la séquence complète de GL allant de la Méthionine à l'a.a. 338 (...QENAT) a été générée par PCR à l'aide des amorces GL+ATG\_EcoRI\_FOR et GL-TGA\_EcoRI\_REV. La PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl) avec 250 $\mu$ M de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO (Fisher), 0,5 unité de Taq polymérase et 0,6 $\mu$ M de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à 94° suivie d'une série de 30 cycles de 30 sec à 94°, 30 sec à 65° et 1 min à 72°, puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°. Le fragment généré a ensuite été digéré par l'enzyme EcoRI avant d'être inséré au vecteur pEGFP.N1 préalablement digéré EcoRI. La ligation a été effectuée à 16° pendant environ 16 hres dans un volume final de 10 $\mu$ l en présence de tampon de ligation 1X final (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM dithiothreitol, 25 $\mu$ g/ml BSA), 1mM ATP et 0,2 U de T4 DNA ligase. Les bactéries électro-compétentes *E.coli* (XL-1) ont été transformées par

électroporation avec ce produit de ligation puis étalées sur pétris de sélection LB-Agar (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1,5% (w/v) agar, 1% (w/v) NaCl) contenant 50µg/ml de Kan pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl contenant 50µg/ml de kanamycine (Kan). L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré EcoRI afin de vérifier la présence de l'insert. L'intégrité de l'insert et du vecteur a ensuite été vérifiée par séquençage. Cette construction est la GL-FL-KOZAC-pEGFP.N1 (donc *gl* sans Kozac).

À partir de ce clone, nos trois constructions ont été générées en utilisant la construction GL-FL-pHA.CE (Chapitre 2 : Section 1.1) comme matrice pour inclure la séquence Kozac à la construction dans le vecteur pEGFP.N1. Pour la construction GL-FL-pEGFP.N1, les constructions GL-FL-pHA.CE et GL-FL-KOZAC-pEGFP.N1 ont été digérées par l'enzyme HindIII. La séquence GL-TM-CT digérée HindIII provenant de GL-FL-pHA.CE (donc qui contient le Kozac) a été liguée comme décrit plus haut dans le vecteur pEGFP.N1 contenant la séquence TM+CT de GL (NITKRL ... QENAT) provenant de GL-FL-KOZAC-pEGFP.N1 aussi digéré HindIII. On se retrouve donc avec la séquence complète de GL précédée d'une séquence Kozac mais dans le vecteur pEGFP.N1.

Pour la construction GLΔ(TM+CT)-pEGFP.N1, le clone GL-FL-pHA.CE a été digéré HindIII et le fragment GLΔ(TM+CT) a été inséré au vecteur pEGFP.N1 aussi digéré HindIII. Pour ce qui est du clone GLΔ(CT)-pEGFP.N1, le fragment de *gl* a été généré par PCR comme décrit plus haut à l'aide des amorces GL+TM-CT EcoRI\_FOR et GL+TM-CT EcoRI\_REV. Ce fragment a été digéré par l'enzyme EcoRI et a été inséré par ligation au vecteur pEGFP.N1+Kozac provenant de la digestion EcoRI du clone GL-FL-pEGFP.N1. Toutes ces ligations ont été transformées par électroporation dans des bactéries électro-compétentes *E.coli* (XL-1) puis étalées sur pétri de sélection LB-Agar contenant 50µg/ml Kan pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB contenant 50µg/ml de Kan. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré EcoRI afin de vérifier la présence d'inserts. L'intégrité des inserts dans le vecteur a ensuite été vérifiée par séquençage.

## 2.2 Mutagenèse de la région C-Terminale de *Gl*

Une méthode de mutagenèse dirigée a été utilisée afin de muter les lysines (K) situées dans la région C-Terminale (après le domaine transmembranaire) de *gl* en leucines (L). La séquence C-Terminale de *gl* (FLHSEQKKRKLILPKRLKSSTSFANIQENAT) contient 5 K. La matrice utilisée pour muter ces lysines est le clone GL-FL-pEGFP.N1 décrit plus haut. La première paire d'amorces utilisée a muté le site KKRK en LLRL. Ces amorces sont GL-FL-GFP\_LLRL\_FOR et GL-FL-GFP\_LLRL\_REV (Tableau I). Le mutant a été généré par réaction PCR à l'aide de la Taq polymérase pFu Turbo (Stratagene). La PCR a été faite avec 50 ng de matrice (ADN) dans un tampon PCR 1X final (10X Cloned pFu Buffer de Stratagene) avec 300µM de dNTPs, 1µl de Taq polymérase pFu par réaction PCR de 50µl et 0.6µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées sont une dénaturation initiale de 5min à 94° suivi d'une série de 18 cycles de 30 sec à 94°, 1 min à 55° et 6 min à 72°, puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°. La PCR a été faite en double avec un tube sans Taq pFu. Une fois la PCR terminée, les deux réactions (avec et sans pFu) sont digérées avec l'enzyme DpnI pour environ 1 hre et sont ensuite précipitées au N-Butanol. Le précipité est resuspendu dans 10µl d'H<sub>2</sub>O et le tiers est électroporé dans des bactéries électro-compétentes et étalées sur pétris de sélection LB-Agar contenant 50µg/ml de Kan pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Les bactéries électroporées avec le PCR sans pFu n'ont pas poussées (contrôle de digestion) tandis que les quelques clones qui provenaient du PCR avec pFu qui ont poussés ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB contenant 50µg/ml de Kan. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré par l'enzyme MfeI afin de vérifier la présence de la mutation dans les clones puisque la mutation du site KKRK en site LLRL fait apparaître un site de digestion MfeI. L'intégrité de l'insert muté et du vecteur a ensuite été vérifiée par séquençage.

Pour muter les deux dernières lysines de la région C-Terminale (séquence KRLK) en leucines (donc LRL), c'est le clone déjà muté pour les trois premières lysines qui a été utilisé comme matrice d'ADN (FLHSEQLLRLILPKRLKSSTSFANIQENAT). Les amorces qui ont été utilisées sur ce clone pour la deuxième mutation sont GL-FL-GFP\_LRL\_FOR et GL-FL-GFP\_LLRL\_REV (Tableau I). Les étapes suivantes sont les

mêmes que pour la première mutagenèse à l'exception que la présence de la deuxième mutation dans les clones n'a pu être vérifiée par digestion avant le séquençage car cette mutation n'ajoute pas un nouveau site de digestion. La séquence finale de la région C-Terminale de GL vérifiée par séquençage est maintenant dépourvue de lysines (FLHSEQLLRLLILPLRLLSSTSFANIQENAT) et le clone est nommé GL-FL-pEGFP.N1\_LLRL-LRLL (Figure S1 en Annexe).

### 2.3 Immunofluorescence

Pour l'analyse par immunofluorescence, les clones en fusion GFP ont été purifiés sur gradient de césium puis ont été transfectés dans les cellules COS-1 en croissance sur des lamelles de verre. L'ADN plasmidique des clones GL-GFP a été dilué à concentration finale de 0,25µg/µl dans du TE (10 mM Tris pH8,0, 1mM EDTA pH 8,0) pour la transfection. Ces clones ont été transfectés par méthode Effectene (QIAGEN : Effectene Transfection Reagent Handbook) à raison de 0,5µg d'ADN par pétri de 3,5cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 10) dans des cellules COS-1 incubées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium de Gibco), 2 mM L-glutamine, 10% FBS inactivé, Streptomycine 100µg/ml, Pénicilline 60µg/ml, 0,5% CO<sub>2</sub>, à 37°. Après 48 hres, les cellules sur lamelles ont été fixées 15 min à température pièce dans une solution 3,7% Formaldéhyde (Fisher) dans du PBS 1X stérile (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,1). Après 3 lavages au PBS 1X, les lamelles ont été incubées 1 hre à température ambiante avec la solution de blocage PBS 1X + 0,1% BSA (Sigma) + 5% NGS (Invitrogen) + 0,01% Saponine (Sigma). L'anticorps primaire est ensuite ajouté pendant 1 hre dans la solution de blocage. L'anticorps primaire qui a été utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin Anti-Calnexine (Sigma) utilisé à dilution 1/250. Après l'incubation dans l'anticorps primaire, les lamelles ont été lavées 4 fois au PBS 1X + 0,1% BSA avant d'être incubés avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution PBS 1X + 0,1% BSA + 5% NGS. Les anticorps secondaires fluorescents qui ont été utilisés sont : Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (H+L) et Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes) à une dilution 1/200. Les lamelles ont été incubées 1 hre dans le noir avec les anticorps secondaires avant d'être lavées 4 fois au PBS 1X. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames avec du FluorSave™ Reagent (Calbiochem) et ont été conservées à 4° à l'abri de la lumière avant l'analyse microscopique.

### 3. Les anticorps

Différents anticorps dirigés contre la protéine GL ont été générés dans le laboratoire. Deux anticorps ont déjà été produits contre les régions C-terminale et N-terminale de *gl* (Chaloub N., Nature Medecine 2003). Ces anticorps seront nommés VL1&VL2 (peptide en C-terminal LHSEQKRRKLILPKR) et VL3&VL4 (peptide en N-Terminal LNGLENKAEPETHLC) qui sont de part et d'autre du domaine transmembranaire.

#### 3.1 Constructions

Deux nouvelles constructions ont été générées pour générer des anticorps chez le lapin. La première est la construction GL-His-Tag qui comprend la séquence de *gl* allant de l'a.a. 93 (séquence MDFANSS...) à l'a.a. 272 (séquence ...MNITRKL). La deuxième construction d'antigène est le peptide GL-CT-GST qui comprend la séquence C-terminale de GL allant de l'a.a. 308 (séquence FLHSEQ...) au dernier a.a. avant le codon Stop TGA, donc l'a.a. 338 (séquence ...IQENAT) (Figure S2 en Annexe).

##### 3.1.1 GL-His-Tag

Le fragment GL-His-Tag a été généré par PCR à l'aide des amorces GL\_NdeI\_FOR\_pET24b et GL\_HindIII\_REV\_pET24b (Tableau I). La réaction PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl PH 8.3, 50 mM KCl) avec 250µM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à 94° suivi d'une série de 30 cycles de 30 sec à 94°, 30 sec à 65° et 30 sec à 72° puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°. Le fragment généré a ensuite été digéré par les enzymes NdeI/HindIII avant d'être inséré dans le vecteur pET24b (Novagen : His-Tag en C-terminal) préalablement digéré NdeI/HindIII. La ligation a été effectuée à 16° pendant environ 16 hres dans un volume final de 10µl en présence de tampon de ligation 1X final (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM dithiothreitol, 25µg/ml BSA), 1mM ATP et 0.2 U de T4 DNA ligase. Les bactéries électro-compétentes *E. coli* (XL-1) ont été transformées par

électroporation avec ce produit de ligation puit étalées sur pétris de sélection LB-Agar (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1,5% (w/v) agar, 1% (w/v) NaCl) contenant 50µg/ml de Kan pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl) contenant 50µg/ml de Kan. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré NdeI/HindIII afin de vérifier la présence de l'insert. L'intégrité de l'insert a ensuite été vérifiée par séquençage.

### 3.1.2 GL-CT-GST

Le fragment GL-CT-GST a été généré par PCR à l'aide des amorces GL-CT-GST\_EcoRI\_FOR et GL-CT-GST\_XhoI\_REV (Tableau I) (Figure S2 en Annexe). La PCR a été faite dans les mêmes conditions que pour le fragment GL-His-Tag. Le fragment généré a ensuite été digéré par les enzymes EcoRI/XhoI avant d'être inséré au vecteur pGEX-4T-2 (Amersham Biosciences : Tag GST en N-terminal) préalablement digéré EcoRI/XhoI. La ligation a été effectuée comme décrit plus haut. Les bactéries électro-compétentes *E.coli* (XL-1) ont été transformées par électroporation avec ce produit de ligation puit étalées sur pétris de sélection LB-Agar contenant 100µg/ml d'Amp pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres en milieu LB à 100µg/ml Amp. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré EcoRI/XhoI afin de vérifier la présence de l'insert. L'intégrité de l'insert a ensuite été vérifiée par séquençage.

### 3.2 Production des antigènes

Les deux constructions antigéniques ont été transformées dans les bactéries compétentes *E.coli* (souche BL-21) par méthode Heat-Shock et ont été étalées sur pétri LB-Agar à 50µg/ml de Kan et 34µg/ml de Chloramphénicol pour la construction GL-His-Tag et sur pétri LB-Agar à 100µg/ml d'Amp et 34µg/ml de Chloramphenicol pour la construction GL-CT-GST.

### 3.2.1 Production de GL-His-Tag

La production d'antigène de la construction GL-His-Tag s'est faite en utilisant le Kit de Novagen et en suivant le protocole His•Bind® Kits. En bref, une culture de 500ml de GL-His-Tag a été faite en milieu LB à concentration de 30µg/ml de Kan et 34µg/ml de Chloramphenicol. En phase exponentielle ( $DO_{600}$  entre 0,6 et 0,8), la culture a été induite 3 hres à l'IPTG (Isopropylthio-B-D-galactoside) (1mM final). Les cellules ont été centrifugées à 9000 rpm pendant 10 min à 4°, le surnageant a été éliminé et les culots ont été mis sur glace. Le culot a été resuspendu dans 40ml de Binding Buffer 1X (Solution 8X de Novagen : 40mM imidazole, 4M NaCl, 106mM Tris-HCl, pH7.9) par 100ml de culture. Ensuite, du NP-40 a été ajouté pour une concentration finale de 0.1%. Quelques passages de -80° à 37° ont été réalisés afin de rompre les cellules. À cette étape, l'extrait visqueux a été soniqué à basse vitesse afin de complètement briser les cellules et l'ADN, jusqu'à obtention d'une solution fluide. L'extrait a ensuite été centrifugé à 5000 rpm à 4° pendant 15 min afin de collecter les débris cellulaires et les corps d'inclusion. Un extrait de surnageant et du culot (environ 10µl) a été déposé sur gel dénaturant de polyacrylamide de 12,5% et migré 1 hre à 150V. Le gel a ensuite été coloré au Bleu de Comassie (Sigma) pour vérifier la bonne production de la construction d'antigène après induction et vérifier la localisation (culot/surnageant) de la protéine attendue.

Comme notre protéine s'est retrouvée majoritairement dans les corps d'inclusion, le culot a été resuspendu dans 20ml de Binding Buffer 1X par 100ml de culture. Le culot a été recentrifugé et resuspendu plusieurs fois dans du Binding Buffer 1X (3 à 5 fois) et une légère sonication a été faite à chaque étape. Après la dernière centrifugation, le culot a été resuspendu dans 5ml de Binding Buffer 1X contenant 6M de Guanidine-HCl par 100ml de culture. Cette solution a été incubée pendant 1 hre à 4° avec agitation afin de dissoudre notre protéine. L'extrait a été centrifugé 30 min à 16 500 rpm à 4° et le surnageant a été gardé. Le culot de débris a été resuspendu une fois de plus dans la solution Binding Buffer 1X – Guanidine-HCl 6M et les mêmes étapes ont été effectuées. Les surnageants récupérés ont été filtrés (de 0,5µm) avant de faire la purification His•Bind. La Colonne His•Bind (1ml) a été équilibrée avec 10ml de Binding Buffer 1X/Guanidine-HCl 6M. Ensuite, l'extrait protéique a été chargé sur la colonne. La colonne a été lavée une fois de plus avec 10ml de Binding

Buffer 1X – Guanidine-HCl 6M puis avec 10ml de Wash Buffer 1X (Solution 8X de Novagen : 480mM imidazole, 4M NaCl, 160mM Tris-HCl, pH7,9) contenant du Guanidine-HCl 6M. En condition dénaturante, la concentration d'imidazole dans le Wash Buffer doit être à 20mM final pour ne pas élué la protéine. La protéine a été éluée avec 5ml de Elute Buffer 1X (Solution 4X de Novagen : 4M imidazole, 2M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH7,9) en présence de Guanidine-HCl 6M. Cinq fractions successives de 1ml contenant l'antigène GL-His-Tag ont été dialysées deux fois dans du PBS 1X stérile (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,1) et la concentration de la protéine a été calculée par spectrophotométrie. Une fraction de l'antigène (environ 10µl) a ensuite été déposée sur gel dénaturant de 12,5% polyacrylamide et migrée 1 hre à 150V. La production de la protéine attendue a été vérifiée après coloration au Bleu de Comassie.

### 3.2.2 Production de GL-CT-GST

Pour la production de l'antigène de GL-CT-GST, le protocole et le Kit Bulk and RediPack GST Purification Modules (Amersham Biosciences) ont été suivis et utilisés. Premièrement, une culture de 500ml de GL-CT-GST a été faite en milieu LB à concentration de 100µg/ml d'Amp et 34µg/ml de Chloramphenicol. En phase exponentielle (DO<sub>600</sub> entre 0,6 et 0,8), la culture a été induite 3 hres avec l'IPTG (1mM final). La culture a ensuite été centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min à 4° et le culot cellulaire a été resuspendu dans 22.5 ml de Tampon 1X (100mM Tris-HCl pH7,5, 2mM EDTA, 1X PBS) contenant des inhibiteurs de protéases PMSF 0,1mM et PIC (Sigma) 1/1000. Une fois resuspendu, du Triton (Sigma) a été ajouté (1% final) et l'extrait de bactérie a été congelé à -80°. L'extrait a été décongelé à 37° et du N-Sarcosyl (Sigma) a été ajouté à 1% final. Ensuite, trois autres passages de -80° à 37° ont été fait avant de soniquer l'extrait 3-4 fois pendant 30 secondes pour briser l'ADN chromosomique. L'extrait a été centrifugé à 3000 rpm à 4° et la fraction soluble a été incubée environ 2 hres avec agitation à 4° avec 800µl de billes de Glutathion Sepharose™ 4B fournies dans le Kit Amersham. Les billes ont été lavées 2 fois avec du Tampon 1X + Triton 1% avant l'incubation. Après l'incubation, l'extrait a été centrifugé à 3000 rpm à 4°, le surnageant a été jeté et les billes ont été lavées 4 fois avec 30ml de Tampon Bactérie 1X +Triton 1%. La production de protéine a été évaluée en mettant 10µl de lysat et 10µl de billes sur gel dénaturant de 12,5 % polyacrylamide. Après migration de 1 hre à 150V, le gel a été

coloré au Bleu de Comassie. Pour éluer l'antigène des billes, celles-ci ont été incubées 5 fois pendant 15 min à température ambiante dans 0,5ml de tampon d'élution Elution Buffer (100mM Tris pH8,8, 50mM Glutathion (Sigma), 1% Triton). Chacune des fractions d'antigène a été dialysée dans du PBS 1X et dosée par spectrophotométrie. Elles ont aussi été analysées sur gel de 12,5% polyacrylamide puis colorées au Bleu de Comassie. 10 $\mu$ l de chacune des fractions en plus des billes finales (après éluions) ont été déposés sur gel.

### 3.3 Immunisation des lapins

Chacun des antigènes (GL-His-Tag et GL-CT-GST) a été injecté dans deux lapins femelles provenant de chez Charles River. À leur arrivée, les lapins pèsent entre 2 et 2,5 kg et sont acclimatés environ une semaine à l'animalerie avant toute manipulation. Avant la première injection d'antigène, deux tubes de 10ml de sang ont été prélevés par l'artère médiane de l'oreille après que les lapins aient été tranquilisés à l'Atravet (0,2ml pour 3,5kg). Ce prélèvement correspond au sérum préimmun. Le tranquilisant est injecté dans le muscle de la cuisse et le prélèvement se fait de 5 à 30 min plus tard. Le sang a été récupéré dans des tubes de 10ml de types « vacutainer » et laissé reposer environ 1 hre à température ambiante avant d'être mis à 4° toute la nuit. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés à 4° pendant 20 min à 2500 rpm. Le sérum a été prélevé et aliquoté dans des tubes stériles de 1.5 ml et gardé à -80°.

Lors des premières injections, les antigènes ont été mélangés à de l'adjuvant complet de Freund. L'antigène a été dialysé dans du PBS 1X stérile et a été mélangé en rapport 2 :1 avec l'adjuvant (0,4ml antigène + 0,8ml adjuvant). Les sites d'injection étaient un site sous-cutané dans le cou (0,5ml) et un site d'injection intramusculaire dans la cuisse ou muscle lombaire (0,5ml). La quantité d'antigène injecté à chacun des lapins étaient de 500 $\mu$ g. Comme les lapins n'ont pas développé d'infections, les deuxièmes injections ont été faites 3 semaines après les premières et cette fois-ci, l'antigène a été mélangé à de l'adjuvant incomplet de Freund. Les sites d'injections étaient toujours sous-cutanés et intramusculaire avec un total de 500 $\mu$ g d'antigène par lapin par injection. Une semaine après la deuxième injection, un prélèvement sanguin (2 X 10ml par lapin) a été fait, toujours par l'artère médiane de l'oreille après avoir tranquilisé le lapin. Par la suite, les lapins ont été injectés toutes les trois semaines

avec 500µg d'antigène mélangé à de l'adjuvant incomplet suivi de prélèvements sanguin une semaine après l'injection pour suivre l'évolution de la réponse immunitaire des lapins.

Pour ce faire, l'antigène (quelques nanogrammes seulement) a été analysé sur gel dénaturant de 12,5% polyacrylamide (150V, 1h) et transféré sur membrane de nitrocellulose pendant 1 hre à 300mA. La membrane a été incubée pendant 1 hre dans une solution de lait 5% à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée environ 16 hres dans l'anticorps primaire, c'est-à-dire les différentes fractions de sérum récupérées au cours de l'immunisation, allant du pré-immun au sérum final. L'anticorps primaire a été dilué 1/500 dans une solution BSA 3% dans du TTNS 1X (25mM Tris-HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Tween). Après trois lavage de 10 min dans du TTNS 1X, la membrane a été incubée 1 hre dans l'anticorps secondaire HRP-GAR (BioRad) dilué 1 /10 000. L'anticorps secondaire a été dilué dans du lait 5%. Après trois lavages de 10 min au TTNS 1X, la membrane a été incubée avec les solutions de détection (Amersham Biosciences :ECL™ Western Blotting Detection Reagents) pendant 1 min avant d'être exposée sur film Biomax. Il fallait donc vérifier que le sérum pré-immun ne reconnaissait pas l'antigène tandis que les sérums le reconnaissent avec un titre qui augmentait avec les injections d'antigène, ce qui confirmait la bonne réponse immunitaire des lapins et qui permettait de pouvoir faire la saignée finale.

Après la 5<sup>ième</sup> injection d'antigène, les lapins ont été sacrifiés par une saignée finale qui s'est fait par prélèvement au niveau de l'artère médiane des deux oreilles suivi d'une ponction intracardiaque. Avant la ponction, les lapins ont été anesthésiés avec une surdose de kétamine (Ketaset : 0,75mg/kg) et d'acéprozamine (Atravet : 5mg/kg). Le sang récolté a été traité comme précédemment.

### **3.4 Purification des sérums**

Les sérums ont été purifiés soit sur colonnes HiTrap NHS-activated HP de 1ml (Amersham Biosciences) et/ou sur colonnes HiTrap Protéine-G HP de 1ml (Amersham Biosciences). Environ 8ml de sérum provenant de la saignée finale ont été utilisés par colonne et pour chacune des purifications, 10 fractions de 500µl d'élution + 100µl de Tris 1M pH8,0 ont été récupérées. Pour les purifications sur colonnes HiTrap NHS-activated HP de 1ml, les ligands

utilisés pour la fixation aux colonnes étaient les mêmes que les antigènes utilisés pour l'injection aux lapins. Environ 1mg de ligand a été fixé par colonne et les colonnes ont été réutilisées pour les deux lapins injectés avec le même antigène. Comme 2 lapins ont été injectés pour chacun des antigènes, les sérums et/ou anticorps purifiés pour l'antigène GL-His-Tag seront nommés GL-His 1 et GL-His 2 et pour l'antigène GL-CT-GST seront nommés GL-GST 1 et GL-GST 2. Les sérums des anticorps VL1&VL2 et VL3&VL4 ont aussi été purifiés sur colonnes Hi-Trap. Comme les anticorps VL1&VL2 sont en région C-terminale de la protéine, ils ont été purifiés sur une colonne portant l'antigène GL-CT-GST. Comme les anticorps VL3&VL4 sont en région N-terminale de la protéine, ils ont été purifiés avec une colonne portant le peptide GL-His-Tag. Les différentes fractions d'antigène purifiées ont été dosées par spectrophotométrie pour déterminer les fractions concentrées en anticorps.

### **3.5 Tests des anticorps**

Les anticorps ont été vérifiés en immunoprécipitation et en immunofluorescence. Ce sont les sérums finaux des différents anticorps qui ont été testés. C'est avec des transfections les constructions GL-FL-pEGFP.N1 et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 que les anticorps ont été testés. Les transfections ont été faites en cellules COS-1 pour l'immunofluorescence car ce sont de grosses cellules facilement transfectables dont on voit bien les structures en immunofluorescence. Les cellules HEK 293 ont été utilisées pour les immunoprécipitations pour être consistant avec les études de caractérisation de la protéine.

#### **3.5.1 Immunofluorescences**

Pour l'immunofluorescence, les cellules COS-1 ont été transfectées avec la construction GL-FL-pEGFP.N1 (comme décrit au Chapitre 2 : Section 2.3). Les lamelles fixées ont aussi été traitées comme décrit dans cette section à exception que les anticorps primaires utilisés pour l'incubation étaient des dilutions 1/100 de sérum final des différents anticorps produits.

### 3.5.2 Immunoprécipitations

Pour les immunoprécipitations, des cellules HEK 293 en milieu  $\alpha$ -MEM (Minimal Essential Medium Eagle de Sigma) avec 10% de Sérum de Bovin Fœtal (FBS) inactivé, Streptomycine 100 $\mu$ g/ml, Pénicilline 60 $\mu$ g/ml, 0,5% CO<sub>2</sub>, à 37° ont été transfectées à 75% de confluence avec la construction GL-FL-pEGFP.N1 par méthode Effectene à raison de 0,5 $\mu$ g d'ADN par pétri de 3,5 cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 10). Après 48 hres, les cellules ont été lysées dans 0,5 ml de tampon de lyse RIPA 1X (50 mM Tris-HCl pH7,5, 1% NP-40, 0,5% désoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 0,1mM PMSF, 1/1000 PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)). L'extrait protéique a été centrifugé à 12 000 rpm à 4° ,10 min, après une lyse de 30 min sur glace. Les fractions du culot et surnageant ont été séparées et 0,45 ml du surnageant a été gardé pour faire une immunoprécipitation. L'extrait a été incubé avec agitation quelques heures avec 25 $\mu$ l de sérum final des différents anticorps produits puis 25 $\mu$ l de billes Protéine-G agarose (Santa-Cruz) ont été ajoutées pour une incubation d'environ 16 hres avec agitation à 4°. Les extraits contenant les billes ont été centrifugés 2 min à 8000 rpm et le surnageant a été prélevé à la seringue. Les billes ont été lavées 2 fois dans 0,5ml de tampon RIPA 1X, une fois dans le tampon de lavage RIPA 2 (50mM Tris-HCl pH7,5, 500mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,05% désoxycholate) et une fois dans le tampon de lavage RIPA 3 (10mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% NP-40, 0,05% désoxycholate) avant d'être bouillies 10 min dans du tampon 3X Sample Buffer (0,1875M Tris-HCl pH6,8, 6%SDS, 30% Glycérol, 0,006% Bleu de Bromophénol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol) et les extraits déposés sur gel dénaturant de 7,5% polyacrylamide.

Après migration, le gel a été transféré comme décrit en 3.3. La membrane a été incubée pendant 1 hre dans une solution de lait 5% et environ 16 hres avec l'anticorps primaire (sérum final dilué 1/100 et/ou anti-GFP de Santa Cruz à 1 $\mu$ g/ml). Le lendemain, la membrane a été lavée puis incubée 1 hre dans l'anticorps secondaire HRP-GAM (Biorad) à dilution une 1/10 000 avant d'être exposée. Après révélation du film, les membranes ont été déshybridées 15 min à 55° dans un tampon Erase Buffer (62,5 mM Tris-HCl pH6.7, 2% SDS, 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol) puis incubées avec un anticorps différent.

Les anticorps ont aussi été testés avec un tampon de lyse pour co-immunoprécipitation (tampon CO-IP 1X). Après 48 hres, les cellules transfectées ont été lysées dans 0,5 ml de tampon CO-IP 1X (250mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 0,5% NP-40, 0,1mM PMSF, 1/1000 PIC). Après 30 min sur glace, les extraits ont été centrifugés 10 min à 12 000 rpm à 4° et les culots et surnageants ont été séparés. Les surnageants ont été incubés avec 25µl de sérum final des anticorps avec 25µl de Protéine-G agarose. Avant d'être déposée sur gel dénaturant de 7,5% polyacrylamide, les billes ont été lavées 4 fois avec 1ml de tampon CO-IP 1X. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites plus haut.

## 4. Crible Double-hybrides

Une librairie d'ADNc (BD Biosciences : Matchmaker Clontech) de cerveau de souris (BALB/c, mâles, 9-12 semaines) pré-transformée dans la souche de levure Y187 a été utilisée pour le criblage deux-hybrides. La librairie a été intégrée dans le vecteur d'expression pACT2 qui contient le domaine d'activation à l'ADN (AD : Activating Domain), un marqueur leucine (levure) et un marqueur Ampicilline (*E coli*). Le fragment correspondant à la partie C-terminale cytosolique de *gl* (GL-CT) a été utilisé comme domaine de liaison à l'ADN (BD : Binding Domain) (Figure S2 en Annexe). Le vecteur d'expression pGBKT7 contenant le BD a comme marqueurs le tryptophane (levure) et la Kanamycine (*E coli*).

### 4.1 Construction

Le fragment GL-CT a été généré par réaction PCR à l'aide des amorces GL-CT\_EcoRI FOR\_2HYB et GL\_BamHI\_REV\_2HYB (Tableau I). La réaction PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250µM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unité de Taq polymérase et 0.6µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à 94° suivie d'une série de 30 cycles de 30 sec à 94°, 30 sec à 65° et 30 sec à 72° puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°. Le fragment généré a ensuite été digéré par les enzymes EcoRI/BamHI avant d'être inséré au vecteur pGBKT7 préalablement digéré EcoRI/BamHI. La ligation a été effectuée à 16° pendant environ 16 hres dans un volume final de 10µl en présence de tampon de ligation 1X final (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM dithiothreitol, 25µg/ml BSA), 1mM ATP et 0,2 U de T4 DNA ligase. Les bactéries compétentes *E.coli* (souche XL-1) ont été transformées avec ce produit de ligation puis étalées sur pétri de sélection LB-Agar (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1,5% (w/v) agar, 1% (w/v) NaCl) contenant 50µg/ml de Kanamycine pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Quelques clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB (1% (w/v) Bacto-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl contenant 50µg/ml de Kanamycine. L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et digéré EcoRI/BamHI afin de vérifier la présence de l'insert.

## 4.2 Contrôles

Un clone GL-CT pGBKT7 a été isolé pour être séquencé et transformé dans la souche de levure AH109 (CLONTECH Yeast Protocols Handbook, Chapitre V : Yeast Transformation Procedures). Les souches AH109 et Y187 sans plasmide poussent en milieu YPDA, 2% Difco peptone, 1% Yeast extract, 2% Agar pour les milieux solides, 0,003% adénine hemisulfate, 2% glucose, pH 6,5). Une fois le plasmide GL-CT pGBKT7 intégré dans la souche de levure AH109, celle-ci peut être cultivée dans un milieu YPDA (Kanamycine 10-15 mg/ml final) ou dans un milieu SD (0,67% Yeast nitrogen base without amino acids, 2% Agar pour les milieux solides, 2% glucose, 1X Solution Dropout) mais avec le tryptophane en moins (SD/-Trp). La solution Dropout (DO) contient tous les a.a. essentiels à la levure pour une bonne croissance et est ajoutée au milieu de croissance SD (Appendice C. Yeast Protocol Handbook). Puisque le plasmide pGBKT7 peut produire le tryptophane, le milieu de sélection pour notre clone GL-CT pGBKT7 transformé dans la souche AH109 est un milieu SD-tryptophane+Kanamycine.

Une série de contrôles ont été effectués avec notre clone GL-CT pGBKT7. Premièrement, quelques clones fraîchement transformés de GL-CT pGBKT7 dans la souche AH109 ont été inoculés 48 hres dans le milieu sélectif SD-tryptophane+Kanamycine et l'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline pour vérifier la présence et l'intégrité de l'insert par une digestion enzymatique EcoRI/BamHI. Ensuite, un clone isolé a été analysé pour vérifier l'expression protéique du fragment de GL-CT cloné. Les extraits protéiques de levures (Chapitre IV/Preparation of Yeast Protein Extracts : Urea/SDS Method) ont été isolés et analysés sur gel dénaturant de 12,5% polyacrylamide. Après migration (150V, 1h), le gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose de 0,45 micron pendant 1 hre à 300mA. La membrane a été pré-incubée pendant 1 hre dans une solution de lait 5% à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée environ 16 hres avec l'anticorps primaire (MYC : 1µg/ml). L'anticorps primaire a été dilué dans une solution BSA 3% dans du TTNS 1X (25mM Tris-HCl pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Tween). Après trois lavages de 10 min dans du TTNS 1X, la membrane a été incubée 1 hre avec l'anticorps secondaire HRP-GAM à 1/10 000. L'anticorps secondaire a été dilué dans du lait 5%. Après trois lavages de 10 min au

TTNS 1X, la membrane a été exposée aux solutions de détection (Amersham Biosciences :ECL™ Western Blotting Detection Reagents) pendant 1 min avant d'être exposée sur film. Une bande à environ 21 kDa a confirmé l'expression de la protéine attendue (GL-CT environ 3,5 kDa et BD environ 18 kDa).

Avant de procéder au criblage double-hybrides avec notre construction, un test avec des contrôles positifs d'interaction et notre construction a été faite. Les vecteurs pGBKT7-53 (tryptophane+) et pGADT7T (ou pTD1-T) (leucine+) contiennent respectivement les domaines BD et AD qui encodent des contrôles positifs de double-hybrides. Le pGBKT7-53 encode pour le domaine BD de GAL4 fusionné au gène p53 murin et est dans la souche AH109 tandis que le pGADT7-T (pTD1-T) encode pour le domaine AD de GAL4 fusionnée à l'antigène T-large du SV40 est dans la souche Y187. Le « mating » de ces deux souches résulte en des souches diploïdes donc qui expriment la leucine et le tryptophane mais aussi l'adénine, l'histidine et LacZ (gène qui encode pour la  $\beta$ -galactosidase). Une fois le « mating » fait (section V Control Strains and Selection media : BD Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual), des aliquots dilués ont été étalés sur des milieux sélectifs contenant du X- $\alpha$ -gal (20 mg/L) pour vérifier l'efficacité du « mating » (les clones diploïdes pousseront sur milieu sélectif et seront bleus car ils seront positifs pour l'activité  $\beta$ -galactosidase). Les aliquots ont été étalés sur du milieu sélectif et l'efficacité du mating a été évaluée (section VII Screening pretransformed libraries, c. Calculating mating efficiency & number of clones screened : BD Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual).

La toxicité potentielle de la protéine produite par la construction GL-CT pGBKT7 a aussi été testée en comparant la croissance du clone Gl en milieu liquide avec un contrôle contenant le vecteur pGBKT7 seul. Comme notre clone poussait au même rythme (augmentation de la DO<sub>600</sub>) que le contrôle, on pouvait en conclure qu'il n'était pas toxique. La prochaine étape a consisté à vérifier si notre clone avait une activité transcriptionnelle intrinsèque (sans avoir à interagir avec un partenaire qui lie l'ADN). Pour ce faire, on a étalé notre clone et le contrôle pGBKT7 seul, qui sont tous deux transformés dans la souche de levure AH109 sur milieux sélectifs SD/-Trp/ X- $\alpha$ -gal, SD/-His/-Trp/X- $\alpha$ -gal et SD/-Ade/-Trp/X- $\alpha$ -gal. Nous avons pu conclure que notre clone ne contenait pas d'activité transcriptionnelle puisqu'il était blanc et ne poussait pas sur milieu SD/-His/-Trp et SD/-Ade/-Trp, donc qu'il pouvait être utilisé pour

un crible double-hybrides. Le clone a ensuite été testé pour son effet sur le « mating » en faisant un « mating » de notre clone GL-CT pGBKT7 (AH109) avec le clone pTD1-1 (Y187). Des aliquots du « mating » ont été étalés sur milieux SD/-Leu/X- $\alpha$ -gal, SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal et SD/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -gal. L'efficacité de « mating » a été calculée et comparée à celle de pGBKT7-53 et pTD1-1. L'efficacité des deux mating était comparable, nous avons conclu que notre clone ne compromettrait pas l'efficacité du « mating » (Tableau I).

#### 4.3 Crible double-hybrides

Pour le crible double-hybrides, une colonie isolée (2-3mm) et fraîche! (<2 mois) de notre clone GL-CT pGBKT7 (AH109) a été inoculée dans 50 ml de milieu SD/-Trp environ 20 hres avec agitation (250 rpm). La culture ayant atteint une  $DO_{600}$ , elle a été centrifugée à 1000 x g pendant 5 min, et le culot a été resuspendu dans 5 ml de milieu résiduel en vortexant. La librairie (1 ml) a été décongelée, vortexée et 10 $\mu$ l ont été gardés pour titrer la librairie (Appendix A : Library Titering : BD Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual). La totalité de la culture du clone GL-CT pGBKT7 et de la librairie ont été combinées dans une flasque stérile de 2 L et 45 ml de milieu YPDA2X/Kan ont été ajoutés. Cette culture a été incubée à 30° environ 24hres (30-50 rpm). Le lendemain, des aliquots de 100 $\mu$ l de dilutions 1 :10000, 1 :1000, 1 :100 et 1 :10 ont été étalés comme contrôles en milieux SD/-Leu, SD/-Trp, et SD/-Leu/-Trp pour évaluer l'efficacité du « mating » (Tableau II).

Le reste du « mating » a été étalé sur pétri de 150mm à raison de 200 $\mu$ l/pétri. Le milieu de sélection choisi a été le SD/-His/-Leu/-Trp (Triple Droupot Medium), qui est un milieu moins stringent que SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (Quadruple Droupot Medium). Les pétris ont été incubés à 30° pendant environ une semaine. Les colonies ont ensuite été repiquées sur pétris SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (Quadruple Droupot Medium) contenant du X- $\alpha$ -gal et seules les colonies poussant sur ce milieu sélectif ont été considérées pour les futures étapes (Tableau III).

#### 4.4 Analyse des clones et séquençage

Au total, 735 clones ont été isolés et congelés à  $-80^{\circ}$  dans un milieu SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/25% glycérol. Parmi ces clones, 90 ont été analysés par PCR et digestion. Ces clones ont été sélectionnés au hasard selon leur croissance rapide et leur expression de  $\beta$ -galactosidase. Les clones diploïdes de levure ont été cultivés environ 48 hres en milieu SD et l'ADN plasmidique a été isolé par lyse à la lyticase (Yeast Protocols Handbook : VII Working With Yeast Plasmids B. Plasmid Isolation from Yeast). Une fois l'ADN plasmidique isolé, une PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl PH 8,3, 50 mM KCl) avec  $250\mu\text{M}$  de dNTPs, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 unité de Taq polymérase et  $0,6\mu\text{M}$  de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à  $94^{\circ}$  suivie d'une série de 30 cycles de 1 min à  $94^{\circ}$ , 1 min à  $60^{\circ}$  et 2 min à  $72^{\circ}$  puis un cycle d'élongation finale de 10 min à  $72^{\circ}$ . Les amorces utilisées (pACT<sub>2</sub>\_FOR et pACT<sub>2</sub>\_REV : Tableau I) sont situées dans le vecteur pACT<sub>2</sub> dans lequel la librairie a été clonée. Seuls les clones donnant un produit d'amplification par PCR ont été électroporés en bactérie (*E.coli*). Pour ce faire, on a utilisé 1 $\mu\text{l}$  d'ADN plasmidique pour être transformé par électroporation dans des bactéries compétentes *E.coli* (XL1) et être étalées sur pétris LB-Agar (Ampicilline 100 $\mu\text{g/ml}$ ). Le plasmide pACT<sub>2</sub> est résistant à l'Ampicilline. Les clones ont été cultivés environ 16 hres dans du milieu LB (Ampicilline 100 $\mu\text{g/ml}$ ) et l'ADN plasmidique a été récupéré par lyse alcaline. La présence des plasmides a été vérifiée par réaction PCR en utilisant les mêmes conditions que pour les clones en levure. La taille du fragment amplifié en bactérie pour un clone donné a été comparée à celle du fragment amplifié en levure pour s'assurer qu'ils étaient identiques. Les fragments de PCR ont ensuite été digérés par un enzyme de restriction qui coupe fréquemment l'ADN (HaeIII) afin de vérifier si certains clones étaient identiques selon leur patron de digestion. Sur les 90 clones analysés, 55 ont été séquencés à l'aide des amorces pACT<sub>2</sub>\_FOR et pACT<sub>2</sub>\_REV (Tableau I). Les séquences amplifiées ont été analysées sur la base de données NCBI (Blast N, Blast X, ORF finder) afin d'identifier les clones et de vérifier qu'ils correspondaient bien à une séquence codante. Sur les 55 clones séquencés, une dizaine de clones ont été choisis pour les prochaines étapes. Les clones sélectionnés correspondent à des gènes connus et dont la fonction pourrait corrélée aux caractéristiques de la protéine Gl.

#### 4.5 Clonage dans un vecteur d'expression de mammifère

Afin de vérifier l'interaction de notre protéine GL avec les différents clones analysés, ces clones ont dû être passés en vecteur d'expression mammifère. La librairie double-hybrides (Matchmaker Clontech) est exprimée dans le vecteur d'expression pour levure et bactérie pACT<sub>2</sub>. Les deux vecteurs d'expression mammifère ainsi que leurs anticorps respectifs qui sont fournis avec la librairie (BD Biosciences : Matchmaker Clontech) pour la compatibilité de leurs sites de clonages avec celui de pACT<sub>2</sub> sont les vecteurs pCMV-MYC (tag c-MYC en région N-terminale et anticorps c-MYC monoclonal) et pCMV-HA (tag HA en région N-terminale et anticorps HA polyclonal). L'ADN plasmidique des différents clones bactériens a été digéré par les enzymes SfiI et XhoI afin d'être intégré au vecteur pCMV-MYC préalablement digéré SfiI et XhoI (Figure S2 en Annexe). Les ligations ont été effectuées comme décrites plus haut et les bactéries compétentes *E.coli* (XL-1) ont été transformées par électroporation avec ces produits de ligation et étalées sur pétris de sélection LB-Agar (100µg/ml Ampicilline) pour une croissance d'environ 16 hres à 37°. Les clones ont été inoculés et cultivés à 37° environ 16 hres dans le milieu LB (100µg/ml Ampicilline). L'ADN plasmidique a été isolé par lyse alcaline et la présence des plasmides contenant les inserts attendus a été vérifié par digestion enzymatique SfiI/XhoI et par réaction PCR à l'aide des amorces pCMV-MYC-HA\_FOR et pCMV-MYC-HA\_REV (Tableau I). La PCR a été faite dans un tampon PCR 1X final (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl) avec 250µM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification utilisées : dénaturation initiale de 5min à 94° suivie d'une série de 30 cycles de 1 min à 94°, 1 min à 60° et 2 min à 72° puis un cycle d'élongation finale de 10 min à 72°.

#### 4.6 Transfection et immunoprécipitation

L'ADN plasmidique des clones insérés dans le vecteur pCMV-MYC a été purifié par ultracentrifugation sur gradient de césium et dilué à concentration finale de 0,25µg/µl dans du TE (10 mM Tris HCl, pH8,0, 1mM EDTA pH 8,0) pour la transfection. Chacun des

clones a été transfecté dans des cellules HEK-293 à 75% confluence par méthode Effectene à raison de 0,5µg d'ADN par pétri de 3,5 cm (ratio ADN/Effectene de 1 : 10). Ces cellules sont cultivées en milieu  $\alpha$ -MEM (Minimal Essential Medium Eagle de Sigma) avec 10% de Sérum de Bovin Foetal (FBS) inactivé, Streptomycine 100µg/ml, Pénicilline 60µg/ml, à 37° et 0,5% CO<sub>2</sub>. Après 48 hres, les cellules ont été lysées dans 0,5 ml de tampon de lyse RIPA 1X (50 mM Tris-HCl pH7,5, 1% NP-40, 0,5% désoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 0,1mM PMSF, 1/1000 PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)). L'extrait protéique a été centrifugé à 12 000 rpm à 4° 10 min, après une lyse de 30 min sur glace. Les fractions correspondant au culot et au surnageant ont été séparées et 0,45 ml du surnageant a été gardé pour faire une immunoprécipitation. L'extrait a été incubé avec agitation quelques heures à 4° avec 1µg de l'anticorps c-MYC puis 25µl de billes Protéine-G agarose (Santa-Cruz) ont été ajoutées pour une incubation d'environ 16 hres avec agitation à 4°. Les extraits contenant les billes ont été centrifugés 2 min à 8000rpm et le surnageant a été prélevé à la seringue. Les billes ont été lavées 2 fois dans 0,5ml de tampon RIPA 1X, une fois dans le tampon de lavage RIPA 2 (50mM Tris-HCl pH7,5, 500mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,05% désoxycholate) et une fois dans le tampon de lavage RIPA 3 (10mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% NP-40, 0,05% désoxycholate) avant d'être bouillies 10 min dans du tampon 3X Sample Buffer (0,1875M Tris-HCl pH6,8, 6%SDS, 30% Glycérol, 0,006% Bleu de Bromophénol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol) et déposés sur gel dénaturant de 12,5 % et 7,5 % polyacrylamide. Les étapes suivantes sont les mêmes que décrites au Chapitre 2 : Section 4.2 avec l'anticorps c-MYC.

Seuls les clones dont une protéine a été détectée par analyse Western ont été transfectés avec la construction GL-FL-pEGFP.N1 afin de faire des co-immunoprécipitations entre les clones et ceux exprimant la protéine GL. Les constructions ont été transfectées comme décrit ci haut à raison de 1µg d'ADN de chacune des constructions (clone GL-FL-GFP + clone 2HYB-MYC) par pétri de 10 cm. Après 48 hres, les cellules ont été lysées dans 2 ml de tampon CO-IP 1X (250mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 0,5% NP-40, 0,1mM PMSF, 1/1000 PIC). Après 30 min sur glace, les extraits ont été centrifugés 10 min à 12 000 rpm à 4° et les culots et surnageants ont été séparés. Les surnageants ont été séparés en trois fractions égales et chacune des fractions a été incubée quelques heures avec soit 1µg d'anticorps c-Myc, 1µg d'anticorps GFP (Santa Cruz) ou 25µl de sérum final de l'anticorps

VL1 puis environ 16 hres avec 25 $\mu$ l de Protéine-G agarose (Santa Cruz). Avant d'être déposées sur gel dénaturant de 12,5% et 7,5% polyacrylamide, les billes ont été lavées 4 fois avec 1ml de tampon CO-IP 1X puis bouillies 10 min dans le tampon 3X Sample Buffer. Les étapes suivantes sont les mêmes que décrites au Chapitre 2 : Section 4.2 avec l'anticorps c-MYC. Après révélation, les membranes ont été déshybridées 15 min à 55° dans un tampon Erase Buffer (62,5 mM Tris-HCl pH6,7, 2% SDS, 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol) puis incubées avec l'anticorps GFP puis de nouveau les mêmes étapes ont été effectuées afin d'incuber les membranes avec l'anticorps VL1.

**Tableau I : Séquences des amorces PCR**

Nom	Séquence
GL-ATG_EcoRI_FOR	5' CCCGGAATTCGCTCGGGAACGCGGAGCTG 3'
GL-TGA_EcoRI_REV	5' GCAGGAATTCGGTGGCATT TTTCTTGAA 3'
GL-TM_EcoRI_FOR	5' CCACGAATTCCTGTGCTGCAGGTGAC 3'
GL+ATG_EcoRI_FOR	5' CCCGGAATTCATGGCTCGGGAACGCGGAG 3'
GL+TM-CT_EcoRI_FOR	5' ACCATGGAATTCGCTCGGGACGCGGAG 3'
GL+TM-CT_EcoRI_REV	5' AGGTCCGAATTCGCTCTGAGTGAAGGA 3'
GL-FL-GFP_LLRL_FOR	5' CAGAGCAATTGTTACGCTTACTCATTCT 3'
GL-FL-GFP_LLRL_REV	5' AGAATGAGTAAGCGTAACAATTGCTCTG 3'
GL-FL-GFP_LRLL_FOR	5' ATTCTACCCTTACGTCTCTTGTCGAGCACC 3'
GL-FL-GFP_LRLL_REV	5' GGTGCTCGACAAGAGACGTAAGGGTAGAAT 3'
GL_NdeI_FOR_pET24b	5' AGACCATATGGACTTCGCCAATAGCAGC 3'
GL_HindIII_REV_PET24b	5' CCGCAAGCTTCCGAGTAATGAACATT 3'
GL-CT-GST_EcoRI_FOR	5' GCGCGAATTCTTCCTTCACTCAGAGCAAAA 3'
GL-CT-GST_XhoI_REV	5' GTTGCTCGAGCGTGGCATT TTTCTTGAATGTT 3'
GL-CT_EcoRI_FOR_2HYB	5' GCGGAATTCTTCCTTCACTCAGAGCAAAAAG 3'
GL_BamHI_REV_2HYB	5' CGCGGATCCTCAGGTGGCATT TTTCTTGAAT 3'
pACT <sub>2</sub> _FOR	5' CTATTCGATGATGAAGATACCCAC 3'
pACT <sub>2</sub> _REV	5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTAC 3'
pCMV-MYC-HA_FOR	5' TAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGC 3'
pCMV-MYC-HA_REV	5' CCAAACATCAATGTATCTTATC 3'
GL-CT_XhoI_FOR_pMZI	5' CCGCCTCGAGATGTTCTTCACTCAGAGCAAAA 3'
GL-CT_XbaI_REV_pMZI	5' GGCTCTAGACGTGGCATT TTTCTTGAATGTTGGC 3'
GL-CT_XhoI_FOR_NTAP	5' ATGGCTCGAGGGTTCCTTCACTCAGAGCAAAA 3'
GL-CT_XbaI_REV_NTAP	5' GGCTCTAGATCACGTGGCATT TTTCTTGAATG 3'

	pTDI-1 + GL-CT pGBKT7	pTDI-1 + pGBKT7-53 (Contrôle positif)
SD/-Leu +x- $\alpha$ -gal	<u>Dilution 1:10</u> : Beaucoup de colonies (< 0.5mm) de levure et une tache bleue*	<u>Dilution 1:10</u> : Beaucoup de colonies (< 0.5mm) et plusieurs taches bleues
	<u>Dilution 1:100</u> : Beaucoup de colonies (< 0.5mm)	<u>Dilution 1:100</u> : Quelques colonies (< 0.5mm) et deux taches bleues
SD/-Trp+x- $\alpha$ -gal	<u>Dilution 1:10</u> : Beaucoup de colonies (< 0.5mm) de levure et pas de bleu	<u>Dilution 1:10</u> : Beaucoup de colonies (< 0.5mm) de levure et quelques taches bleues
	<u>Dilution 1:100</u> : Centaine de colonies isolées dont quelques colonies *	<u>Dilution 1:100</u> : Centaine de colonies isolées dont quelques bleues (< 0.5mm)
SD/-Leu/-Trp+x- $\alpha$ -gal [DDO]	<u>Dilution 1:10</u> : Plusieurs colonies (< 0.5mm)	<u>Dilution 1:10</u> : Plusieurs colonies (< 0.5mm) bleues
	<u>Dilution 1:100</u> : Quelques colonies (< 0.5mm) résiduelles blanches	<u>Dilution 1:100</u> : Quelques colonies bleues (1mm)
SD/-Leu/-Trp/-His+x- $\alpha$ -gal [TDO]	<u>Dilution 1:10</u> : Quelques colonies (< 0.5mm) résiduelles blanches	<u>Dilution 1:10</u> : Plusieurs colonies (1mm) toutes bleues
	<u>Dilution 1:100</u> : Quelques colonies (< 0.5mm) résiduelles blanches	<u>Dilution 1:100</u> : +/- 50 colonies (2mm) bien isolées et bleues
SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade+x- $\alpha$ -gal [QDO]	<u>Dilution 1:10</u> : Pas de croissance	<u>Dilution 1:10</u> : Certaines de colonies (1mm) bien isolées et bleues
	<u>Dilution 1:100</u> : Pas de croissance	<u>Dilution 1:100</u> : 21 colonies (2mm)

**Tableau II : Contrôles de « mating »**

Croissance des souches contrôles AH109 (GL-CT pGBKT7) x Y187 (pTDI-1) et du contrôle positif AH109 (pGBKT7-murine53) x Y187 (pTDI-1), étalées sur des milieux SD sélectifs avec X- $\alpha$ -gal à dilution 1:10 et 1:100.

En milieu SD/-Leu, on observe beaucoup de colonies de Y187 qui sont toutes Leu+ dû à pTDI-1. Il en est de même sur SD/-Trp pour AH109 qui sont Trp+ dû à pGBKT7. Sur SD/-Leu/-Trp, seulement les diploïdes avec les deux plasmides poussent. Il y a donc efficacité du « mating ». Sur SD/-Leu/-Trp/-His + X- $\alpha$ -gal et SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade + X- $\alpha$ -gal, seuls les diploïdes où il y aura une interaction comme dans le contrôle positif peuvent pousser: il n'y a donc pas d'interaction entre AH109 (GL-CT pGBKT7) et Y187 (pTDI-1). La présence de l'expression de LacZ par une coloration bleue chez le contrôle positif assure une interaction entre pGBKT7-53 et pTDI-1 qui provoque l'activation de LacZ (gène rapporteur) tandis que les clones blancs (pas d'expression de LacZ) chez pTDI-1 x GL-CT pGBKT7 assure qu'il n'y a aucune interaction entre le gène *gl* (BD:AH109) et pTDI-1 (AD:Y187).

	Dilution 1:10	Dilution 1:100	Dilution 1:1000	Dilution 1:10000
<b>SD/-Leu</b> (Selectionne Librairie et les cellules ayant fait le mating)	Croissance très importante	Croissance très importante	Croissance importante	Croissance
<b>SD/-Trp</b> (Selectionne GL et les cellules ayant fait le mating)	Croissance très importante	Croissance très importante	Croissance très importante	Croissance
<b>SD/-Leu/-Trp</b> (Selectionne les cellules du mating uniquement)	Croissance importante	Croissance importante	Croissance	Peu de croissance

**Tableau III : Contrôles de « mating » de la librairie de levure**

Résultats et observations des contrôles du mating entre AH109 (GL-CT pGBKT7) et Y187 (Librairie) sur milieux SD sélectifs à dilution 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

La croissance très importante sur SD/-Leu démontre que AH109 contient GL-CT pGBKT7 qui est Leu+. Il est de même sur SD/-Trp pour Y187 qui contient la librairie qui est Trp+. La croissance en SD/-Leu/-Trp démontre qu'il y a mating entre les souches AH109 et Y187 qui donnent des diploïdes Leu+/Trp+ et donc contenant GL-CT- pGBKT7 et les clones de la librairie dans pACT2. On peut conclure qu'il y a eu un mating efficace entre ces souches.

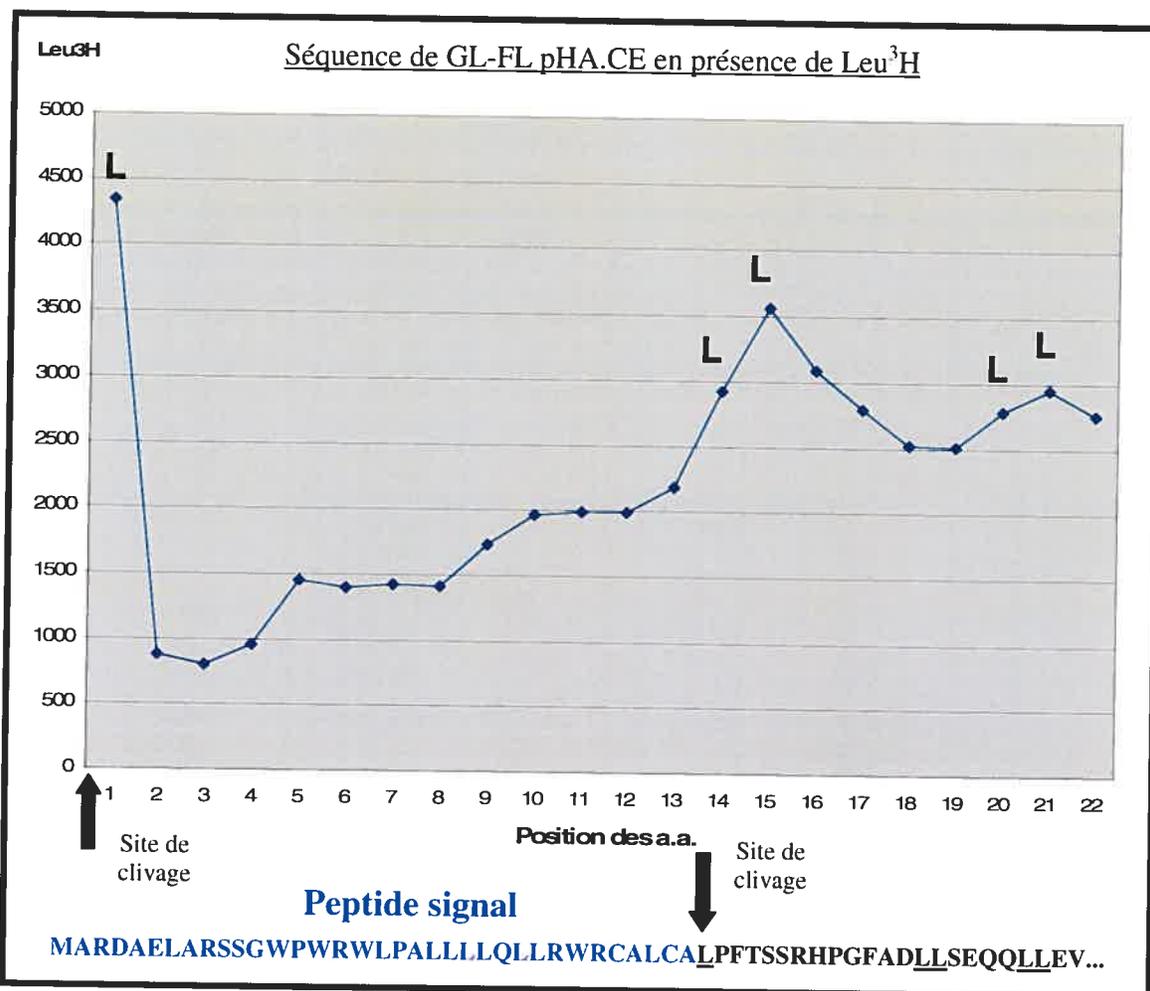
## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS**

## 1. Caractérisation structurale de la protéine Gl

Le premier but de mon projet a été de faire la caractérisation structurale de la protéine Gl. Nous savions déjà que Gl était composée de 338 acides aminés, ce qui lui conférerait un poids moléculaire d'environ 38 kDa, et qu'elle possédait potentiellement un peptide signal potentiel, un domaine transmembranaire potentiel et une dizaine de sites potentiels de N-Glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) (Chapitre 1 : Section 6.5.1 et Figure 24-25). Toutefois, aucune de ces caractéristiques structurales de la protéine n'avaient été vérifiées et/ou confirmées expérimentalement.

### 1.1 La protéine Gl possède un peptide signal

Premièrement, la présence du peptide signal chez la protéine Gl a été prédite à partir des données de séquençage. Comme mentionné en Section 5.2 du Chapitre 1, le peptide signal est clivé très rapidement lorsque la protéine en traduction traverse le translocon vers le lumen du Réticulum Endoplasmique (RE). Pour confirmer la présence d'un peptide signal dans la protéine Gl, une construction comprenant la séquence complète du cDNA de *gl* suivie d'un Tag HA (GL-FL-pHA.CE) a été transfectée dans les cellules HEK 293. Ces cellules transfectées ont été marquées à la leucine triciée\* (Leu<sup>3</sup>H) puisque c'est un acide aminé qui se retrouve en abondance à la fois dans la séquence du peptide signal potentiel (**MARDAELARSSGWPWRWLPALLLLQLLRWRCALCA**) et dans la séquence directement en aval du peptide (**LPFTSSRHPGFADLLSEQQLLEV**). Les cellules ont été récupérées après un marquage de 3 hres. Le profil de séquençage en Leu\* de l'extrait protéique\* immunoprécipité avec un anticorps HA a confirmé que la protéine Gl possède une séquence peptide signal et que cette séquence est rapidement clivée dans la cellule (Figure 26). La confirmation de la présence d'un peptide signal chez Gl nous indique aussi que Gl est une protéine qui entre dans le RE et qui transite par la voie sécrétoire.



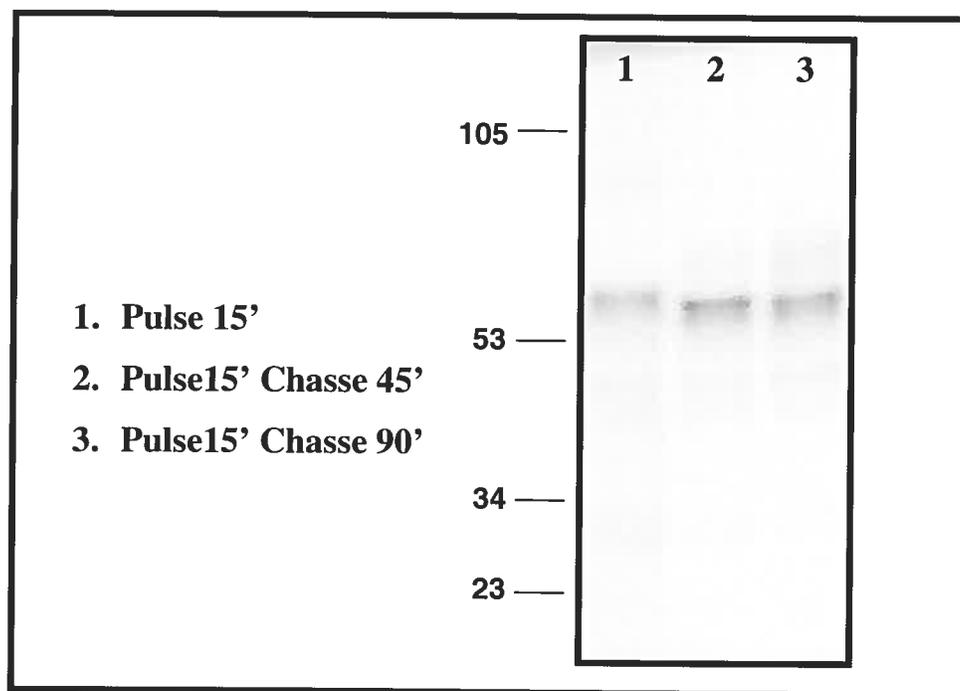
**Figure 26 : Peptide signal**

Transfections transitoires de GI-FL-pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivi d'un marquage métabolique de 3h en présence de Leu<sup>3</sup>H et immunoprécipitation du lysat cellulaire avec des billes HA-agarose.

## 1.2 GI est une protéine stable de 60 kDa

Nous voulions ensuite savoir si la protéine GI était assez stable et si des modifications post-traductionnelles pouvaient faire varier sa masse moléculaire. Pour se faire, une expérience de Charge et Chasse « Pulse-Chase » a été effectuée avec notre construction contenant le cDNA complet de GI (GI-FL-pHA.CE). Des cellules HEK ont été transfectées avec cette construction et les cellules ont été marquées pour une Charge de 15 min en présence de

Méthionine et Cystéine radioactives (Mét<sup>35</sup>S/EasyTag et Cys<sup>35</sup>S) suivi de Chasses de 45 et 90 min (Loening, 1965). Ces acides aminés ont été sélectionnés pour le marquage car ils sont abondants dans la séquence de GI (Figure 24). Ces résultats ont confirmé que la protéine GI ne migre pas à un poids moléculaire de 38 kDa, ce qui correspondrait au poids moléculaire attendu d'après sa séquence de 338 acides aminés, ou à 34 kDa après la perte du peptide signal. Notre protéine semble plutôt se situer à un poids moléculaire d'environ 60 kDa et ce poids moléculaire est atteint au temps 0, ce qui implique que notre protéine subit des modifications post-traductionnelles rapides lors de son entrée dans le RE. La différence de poids de la protéine avant et après modifications post-traductionnelles (environ 26 kDa) pourrait correspondre aux 10 sites potentiels de N-Glycosylation de GI puisque chaque groupement N-Glycosyle a une masse d'environ 3 kDa (Voir Chapitre 3 : Section 1.4). De plus, GI semble être stable et ne subit pas de modifications entre 0 et 90 min de Chasse (Figure 27).



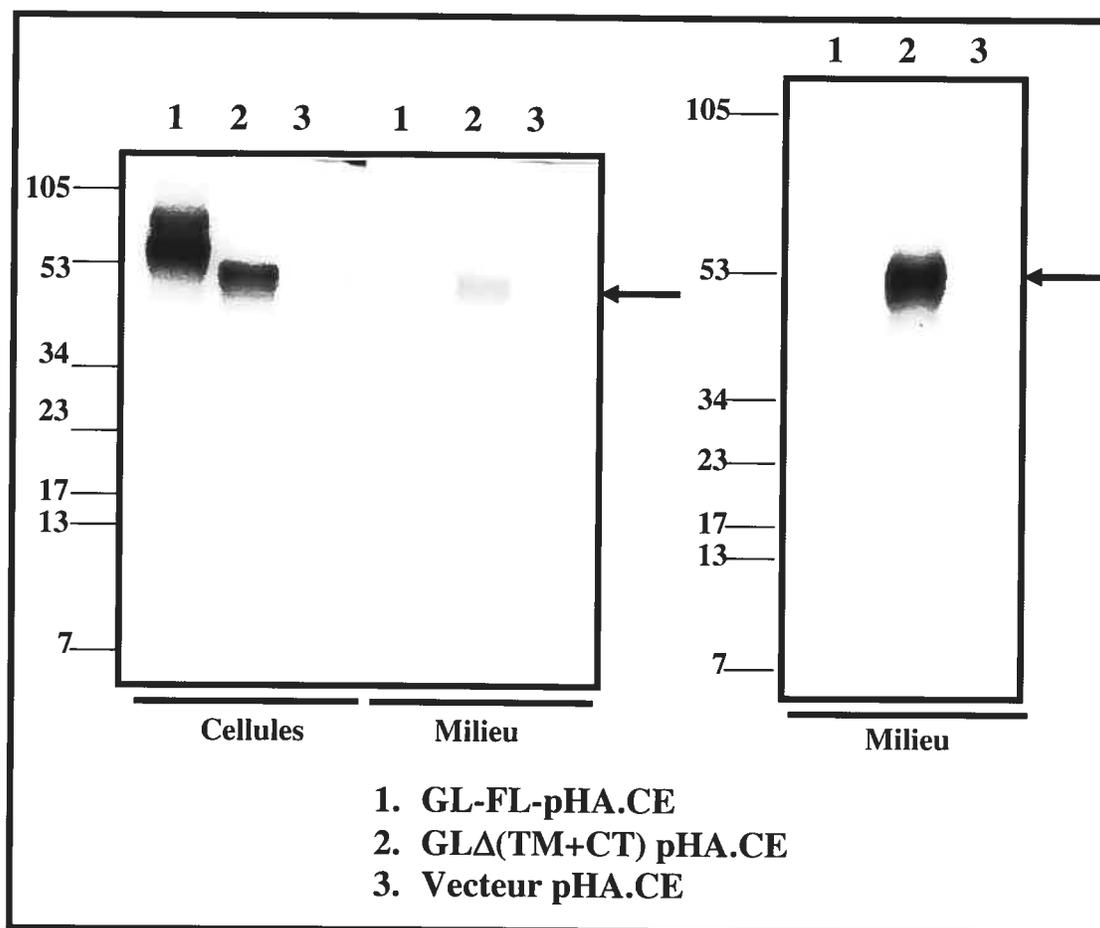
**Figure 27 : Charge et chasse (Pulse-Chase)**

Transfections transitoires de GI-FL pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivi d'un marquage métabolique de 15 minutes en Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S (Charge) et de Chasses de 0, 45 et 90 minutes.

### 1.3 La protéine Gl possède un domaine transmembranaire

La deuxième caractéristique structurale de la protéine Gl à confirmer était la présence d'un domaine transmembranaire en région C-terminale de la protéine. Pour ce faire, trois constructions ont été transfectées dans les cellules HEK 293 : le vecteur pHA.CE seul, une construction comprenant la séquence de Gl allant du peptide signal au domaine transmembranaire potentiel dans le vecteur pHA.CE (donc dépourvue du domaine transmembranaire et de la région C-Terminale GLΔ(TM+CT)-pHA.CE) et la même construction qu'utilisée pour le peptide signal, c'est-à-dire le cDNA complet de *gl* dans pHA.CE (GL-FL-pHA.CE). Les cellules transfectées ont été marquées en présence de Méthionine et Cystéine radioactives\* (Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S). Après un marquage de 3 hres, les milieux de culture ainsi que les cellules ont été récupérées. Les lysats cellulaires et les milieux de culture ont été précipités avec l'anticorps HA-agarose afin de récupérer les protéines radioactives synthétisées. Les immunoprécipitations ont été analysées sur gel et seule la construction GLΔ(TM+CT)-pHA.CE d'environ 53 kDa a été détectée dans le milieu de culture. Ceci confirme la présence du domaine transmembranaire de notre protéine puisqu'en l'absence de cette séquence hydrophobe, notre protéine ne peut plus s'ancrer à la membrane et elle est sécrétée, ce qui n'est pas le cas de la protéine native de 60 kDa (Figure 28).

On se retrouve alors avec une protéine qui est dirigée vers le RE via son peptide signal et celui-ci est rapidement clivé dès que la protéine passe dans le lumen du RE. La traduction de la protéine se poursuit et celle-ci passe à travers le translocon jusqu'à ce que le domaine transmembranaire, soit une séquence d'environ vingt résidus hydrophobes (séquence **TVSVVAVSVFILFLPVVFFYLSSF** chez Gl) qui agit comme un signal stop dans le translocon, ancre la protéine à la membrane laissant le domaine C-Terminal dans le cytoplasme. La protéine Gl est donc une protéine transmembranaire de type I (Chapitre 1 : Section 5.2/Figure 14).

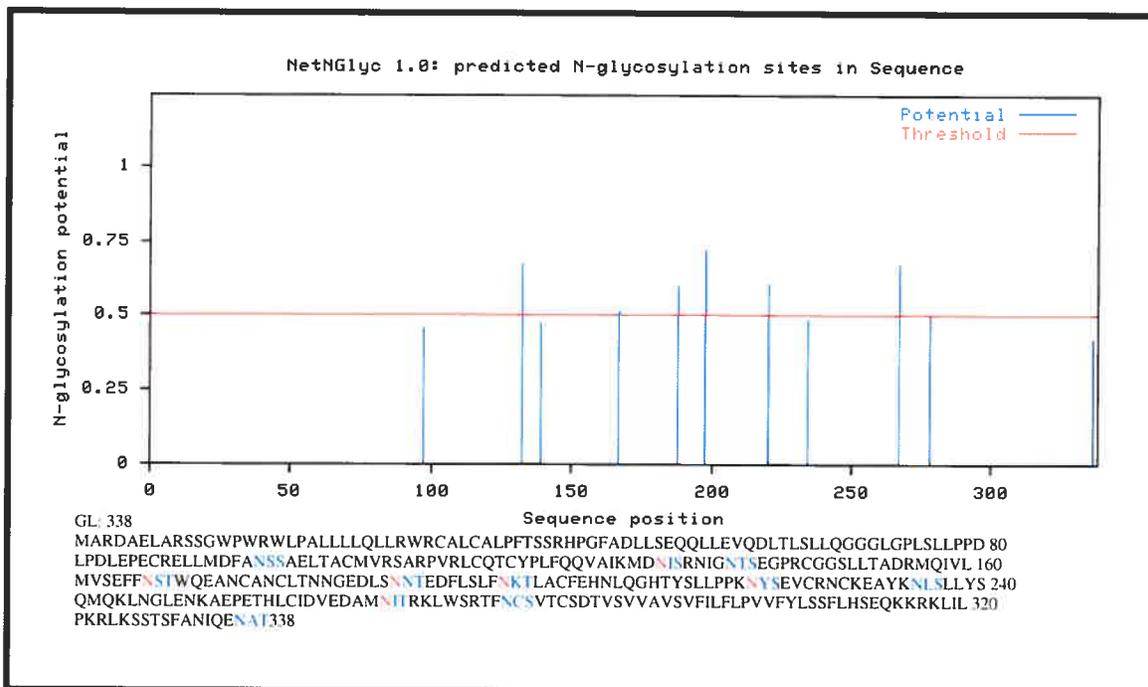


**Figure 28 : Domaine transmembranaire et sécrétion**

Transfections transitoires de GL-FL pHA.CE et GLΔ(TM+CT) pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivi d'un marquage métabolique pour 3h en Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S et d'une immunoprécipitation du lysat cellulaire et du milieu avec les billes HA-agarose. Seule la construction GLΔ(TM+CT) pHA.CE est précipitée dans le milieu comme montré avec deux transfections différentes.

#### 1.4 La protéine Gl est N-Glycosylée

La prochaine étape pour la caractérisation de la protéine Gl était de confirmer que les sites potentiels de N-Glycosylation étaient fonctionnels. Il fallait donc démontrer que Gl est bien N-Glycosylée et si oui, sur combien des sites potentiels. En utilisant un site de modélisation de structure secondaire, la protéine Gl semble contenir 10 sites potentiels de N-Glycosylation (Figure 29).



**Figure 29 : Prédiction des sites de N-Glycosylation de la protéine GI**

La séquence de 338 acides aminés de GI contient 11 sites potentiels de N-Glycosylation selon le site [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk). Les Asparagines sont en rouge et les tripeptides potentiels de N-glycosylatin en bleu.

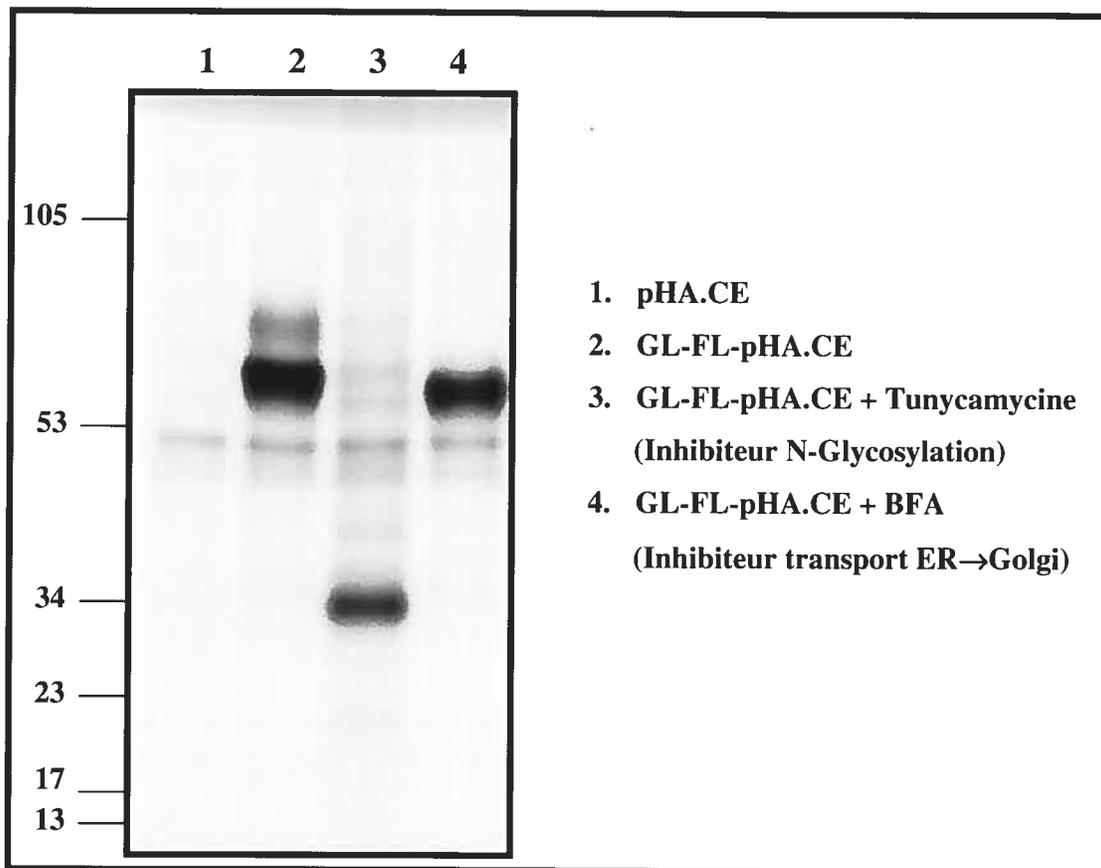
Comme un site potentiel est situé après la domaine transmembranaire, on considère que GI possède 10 sites potentiels de N-Glycosylation.

Comme mentionné auparavant, un groupement N-Glycosyle a un poids moléculaire d'environ 3 kDa. En considérant que GI est une protéine de 338 acides aminés, son poids moléculaire devrait être d'environ 38 kDa avec peptide signal et 34 kDa après maturation. Toute variation additionnelle dans le poids moléculaire sera donc due à des modifications post-traductionnelles comme la N-Glycosylation. La N-Glycosylation des protéines est un processus rapide qui s'effectue dès l'entrée de la protéine dans le RE (Chapitre 1 : Section 5.3). Basée sur notre expérience de Charge et Chasse en Section 1.2/Figure 27, les modifications post-traductionnelles que subit GI sont très rapides puisqu'elles sont déjà présentes à Chasse 0 après une charge de 15 min. Afin de confirmer la présence de ces glycosylations, des cellules HEK 293 ont été transfectées avec la construction GL-FL-pHA.CE et marquées 3h en présence de Méthionine et Cystéine radioactives\* (Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S). Les cellules ont été ou non traitées à la Tunycamycine, un inhibiteur de

la N-Glycosylation, pendant la pré-incubation et le marquage de 3h avant la lyse cellulaire et l'immunoprécipitation les lysats protéiques avec l'anticorps HA-agarose (Kuo and Lampen, 1974; Olden *et al.*, 1979). Le traitement à la Tunycamycine a confirmé que les modifications post-traductionnelles de Gl sont des N-Glycosylations et que les 10 sites potentiels semblent être glycosylés basée sur la migration sur gel de la protéine avec ou sans traitement. Le poids moléculaire de Gl passe de 34 kDa lorsque la protéine est déglycosylée à environ 60 kDa lorsqu'elle est glycosylée (Figure 30). La légère baisse de poids moléculaire observée dans l'expérience de Charge et Chasse est probablement due aux pertes de glucoses par les Glucosidases I et II lors du cycle Calnexine/Calreticuline (Chapitre 1 : Section 5.3/Figure 27).

L'ajout de N-Glycosylation dans le RE est rapide mais les modifications ultérieures des sucres, comme celles se faisant dans l'appareil de Golgi, se font beaucoup plus lentement. Pourtant, après 90 min de Chasse, la protéine Gl ne semble pas avoir subi plus de modifications qu'à Chasse 0. Nous avons donc fait aussi un traitement de nos cellules transfectées et marquées à la Brefeldine A. Les cellules traitées à la BFA voient leur sécrétion complètement inhibée et ce tôt dans la voie de sécrétion. Le blocage se produit au niveau *pré*-Golgi et les protéines membranaires et sécrétoires se retrouvent bloquées/retenues dans le RE. Par contre, il y a aussi une certaine fusion entre le compartiment du RE et du *cis*-Golgi. Le réseau *trans*-Golgi n'est pas fusionné avec le RE. En général, on dira que la BFA inhibe le transport RE vers Golgi en inhibant l'adhésion/la fusion des protéines régulatrices «*clathrin-coat proteins*» à leurs organelles cibles (Klausner *et al.*, 1992). Si Gl subit des modifications post-traductionnelles dans le Golgi, celles-ci seront inhibées par la BFA.

Dans notre cas, la protéine Gl semble avoir été peu affectée par le traitement à la BFA. La protéine est stable et migre plus ou moins à la même taille et seule une bande faiblement exprimée à environ 70 kDa disparaît en comparaison avec le contrôle (voir Chapitre 3 : Section 1.5.2). Ce résultat indique une fois de plus que Gl ne semble pas subir de modifications majeures ultérieurement au RE et *cis*-Golgi. Ces résultats nous ont amené à vérifier si la protéine Gl pouvait être une protéine résidente du RE.



**Figure 30 : Traitements à la Tunicamycine et BFA**

Transfections transitoires de pHA.CE et de GL-FL pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivi de marquage métabolique de 3hrs en Easy Tag/Cys35S. Des cellules transfectées avec la construction GL-FL pHA.CE ont été traitées à la Tunicamycine et la Brefeldine A (BFA) pendant la biosynthèse. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec des billes HA-agarose.

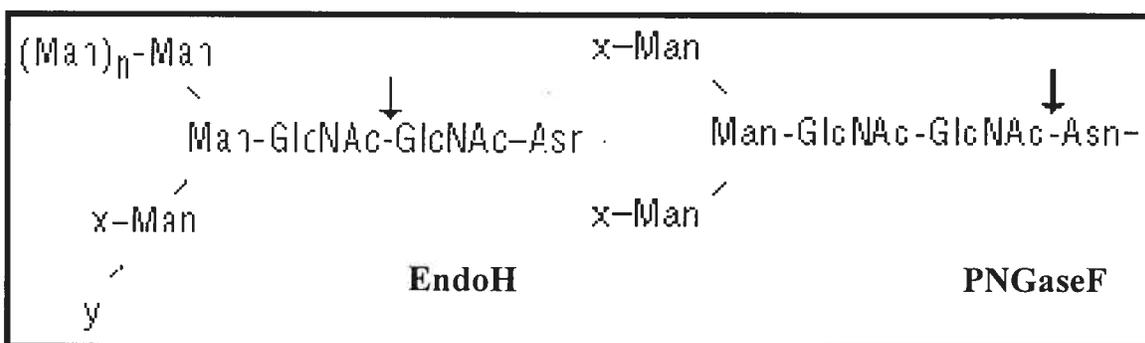
### 1.5 La protéine Gl est dans le réticulum endoplasmique

Afin de vérifier si notre protéine est une protéine résidente du RE, nous avons utilisé des enzymes spécifiques de dé-glycosylation : l'Endoglycosidase H (EndoH) et la N-Glycosidase F (PNGaseF) (Lemp *et al.*, 1990; Tsuchihashi and Nagatomo, 1985). Nous avons aussi utilisé des traitements avec des inhibiteurs des glucosidases I et II, la Castanospermine (CST) et la N-Methyl-Déoxynojirimycine (MDNJ), et des inhibiteurs de la mannosidase I, la Kifunensine (KIF) et des mannosidases I et II, la 1-Déoxymannojirimycine (DMJ) (Chapitre 1 : Section 5.3) (Marcus and Perlmutter, 2000).

### 1.5.1 La protéine Gl est sensible à l'EndoH

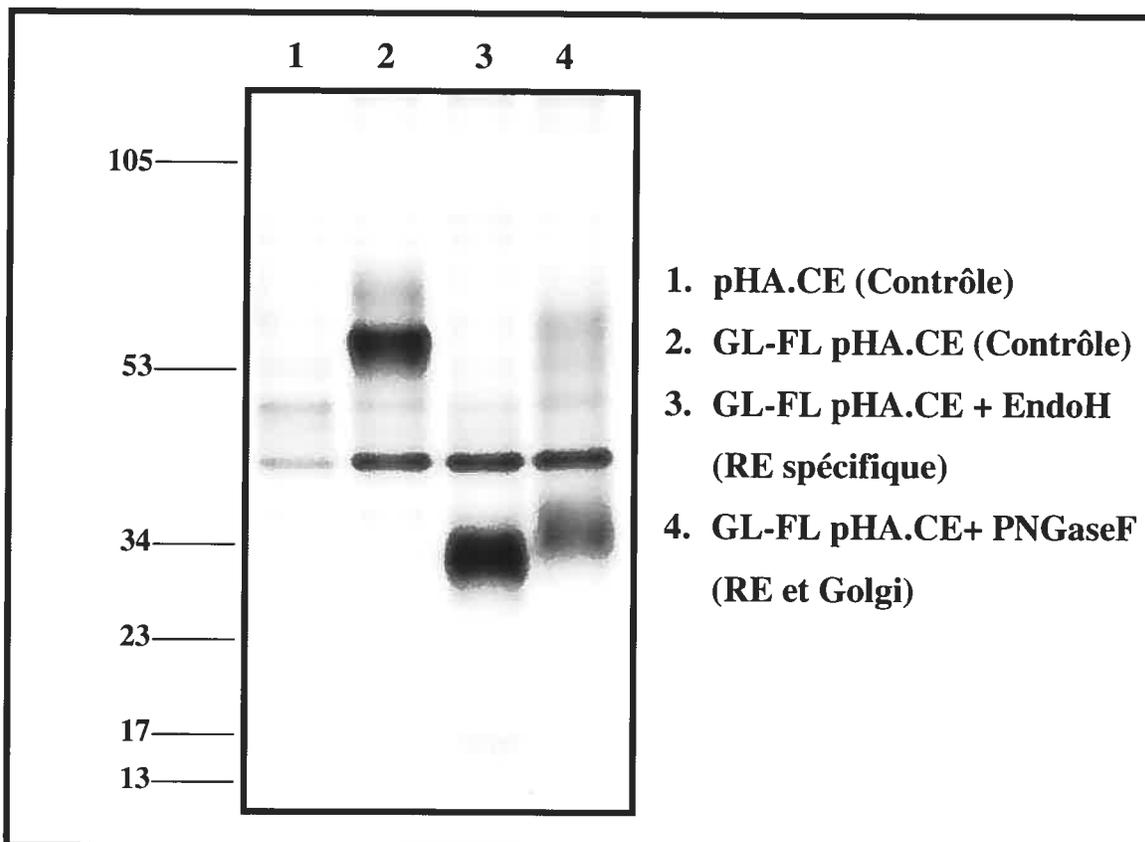
L'Endoglycosidase H est une glycosidase recombinante qui va cliver dans le coeur des oligosaccharides riches en mannoses des N-Glycoprotéines. Cette enzyme ne clive que les oligosaccharides riches en mannose, ce qui veut dire que les oligosaccharides qui ont été modifiés dans l'appareil de Golgi par des ajouts de N-acétylglucosamine, fucose, galactose et/ou acide sialique ne seront plus clivés par l'EndoH (Chapitre 1 : Section 5.3/Figures 15 et 19). Si une protéine est résidente du RE, elle sera donc complètement sensible à l'EndoH tandis que si elle transite plus loin dans la voie sécrétoire, elle ne sera plus sensible à l'EndoH.

Au contraire, la N-Glycosidase F est une amidase qui clive entre les résidus Asparagine et N-acétylglucosamine des oligosaccharides riches en mannose et complexes (modifiés dans le Golgi). La PNGaseF hydrolyse pratiquement tous les types de N-Glycans donc ne fait pas de discrimination entre les sucres modifiés ou non dans le Golgi (Maley *et al.*, 1989) (Figure 31). Des immunoprécipitations des lysats protéiques cellulaires de cellules HEK transfectées avec la construction GL-FL-pHA.CE et marquées en présence de Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S ont donc été traitées aux enzymes EndoH et PNGaseF. Comme notre protéine est complètement sensible à l'EndoH comme à la PNGaseF (masse varie de 60 kDa à 34 kDa), nous pouvons en conclure que Gl a le profil d'une protéine résidente du RE (Figure 32).



**Figure 31 : Sites de clivages de l'EndoH et PNGaseF**

L'EndoH clive les oligosaccharides riche en mannose dans le lien N-acétylglucosamines/ N-acétylglucosamine. La PNGaseF clive le lien entre les résidus Asparagine et N-acétylglucosamine de tous les oligosaccharides des N-Glycans. Adapté de [www.neb.com](http://www.neb.com)



**Figure 32 : Traitements à l'EndoH et PNGaseF**

Transfections transitoires des constructions pHA.CE (vecteur) et GL-FL pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivi d'un marquage métabolique de 3hres en Easy Tag/Cys 35<sup>S</sup>. Les traitements à l'EndoH et à la PNGaseF ont été fait sur les immunoprécipitations HA-agarose des lysats cellulaires.

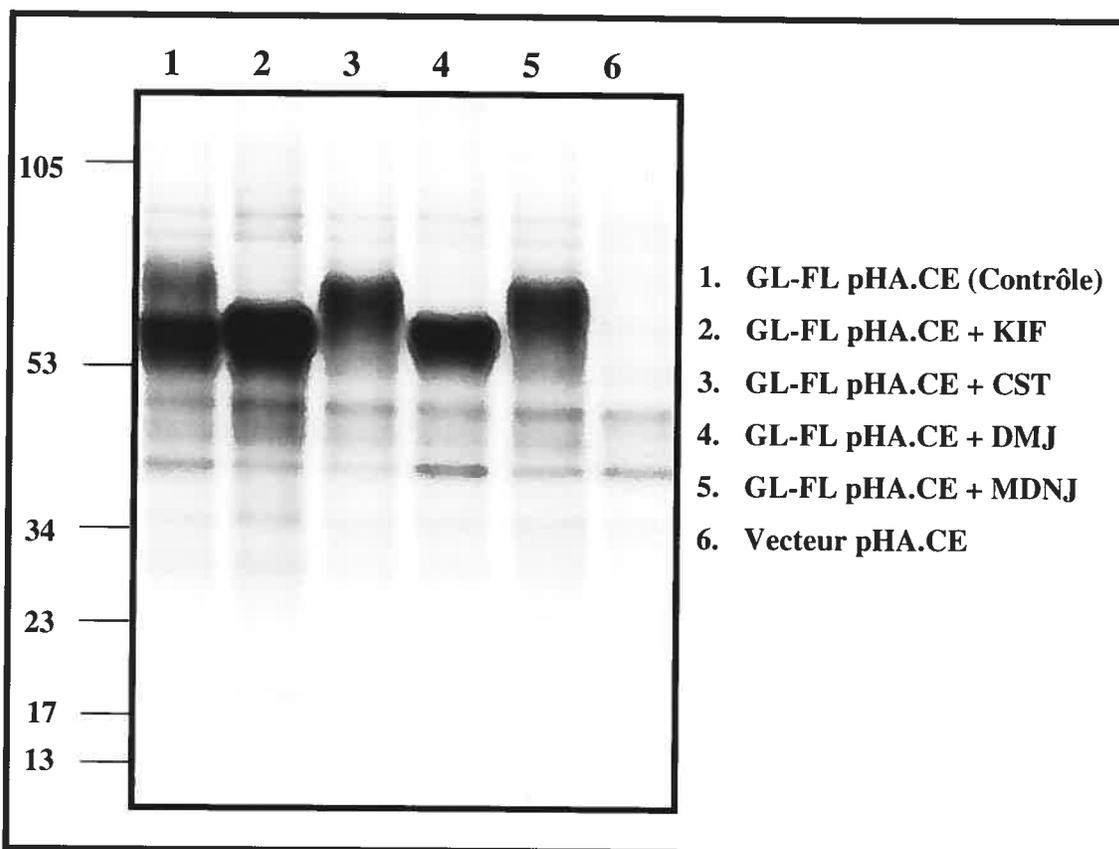
L'inhibition des enzymes impliqués dans le cycle de contrôle des N-Glycoprotéines du RE, le cycle Calnexine/Calreticuline, a des conséquences grave pour la cellule. Comme mentionné en Chapitre 1 : Sections 5.3.4 et 5.3.5, lorsqu'il y a inhibition des glucosidases par CST et MDNJ, il y a accélération et perte d'efficacité du repliement et de la sécrétion des glycoprotéines donc il y a un blocage du système de contrôle de qualité avec comme conséquences une sécrétion de protéines mal repliées, la dégradation prématurée des protéines N-Glycosylées et une induction du UPR « *Unfolded Protein Response* » (Hebert *et al.*, 1996). Au contraire, si les mannosidases sont inhibées, la dégradation des glycoprotéines est beaucoup plus lente puisque le délais dans la dégradation des glycoprotéines par le ERAD

« *ER-Associated Degradation* » (Voir Chapitre 1 : Section 5.3.5 : Figure 17) est lié à la taille des mannoses qui sont lentement clivés par les mannosidases (Herscovics, 2001; Liu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003).

Nous avons donc soumis des cellules HEK transfectées avec la construction GL-FL-pHA.CE et en présence de Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S à ces quatre inhibiteurs avant l'immunoprécipitation des lysats protéiques avec l'anticorps HA-agarose. Comme on peut le constater sur le gel de la Figure 33, notre protéine semble réagir aux inhibiteurs de glucosidases et mannosidases selon ce qui a été décrit dans la littérature.

Dans les puits 3 et 5, on retrouve notre protéine qui a été traitée avec les inhibiteurs de glucosidases CST et MDNJ. Dans ces deux cas, la protéine migre à un poids moléculaire plus élevé car les glucoses sont toujours présents sur les 10 groupements N-Glycosyle contrairement au puits contrôle où ils ont été rapidement clivés dans le cycle Calnexine/Calreticuline (Chapitre 1 : Section 5 : Figures 15 et 16). On peut aussi remarquer qu'il semble y avoir une dégradation prématurée de notre protéine. Comme celle-ci n'arrive pas à bien compléter son cycle Calnexine/Calreticuline, elle est rapidement prise en charge par le système ERAD et dirigée vers le protéasome pour être dégradée.

Au contraire, lorsque les protéines sont traitées avec les inhibiteurs des mannosidases, celles-ci sont stabilisées et moins bien reconnues par l'ERAD. C'est le cas de notre protéine qui est stabilisée (puits 2 et 4) où il y a eu traitement avec les inhibiteurs des mannosidases KIF et DMJ. Même en stabilisant notre protéine, celle-ci migre toujours au même poids moléculaire que le contrôle et ne semble pas acquérir de nouvelles modifications post-traductionnelles. Seule la bande à environ 70 kDa est perdue après ce traitement et il s'agit de la même bande que l'on perd lors du traitement à la Brefeldine A (Chapitre 3 : Section 1.4 : Figure 30). Cette bande pourrait être un intermédiaire de notre protéine, soit une forme encore immature ou destinée à la dégradation par le système ERAD.



**Figure 33 : Traitements au KIF, CST, DMJ, MDNJ**

Transfections transitoires de pHA.CE et GI-FL pHA.CE dans les cellules HEK 293 suivies de marquage métabolique pour 3h en Mét<sup>35</sup>S ou EasyTag et Cys<sup>35</sup>S en présence de KIF, CST, DMJ et MDNJ pour les transfections de GL-FL pHA.CE. Les lysats protéiques ont été immunoprécipités avec des billes HA-agarose.

## 2. Localisation de la protéine GI

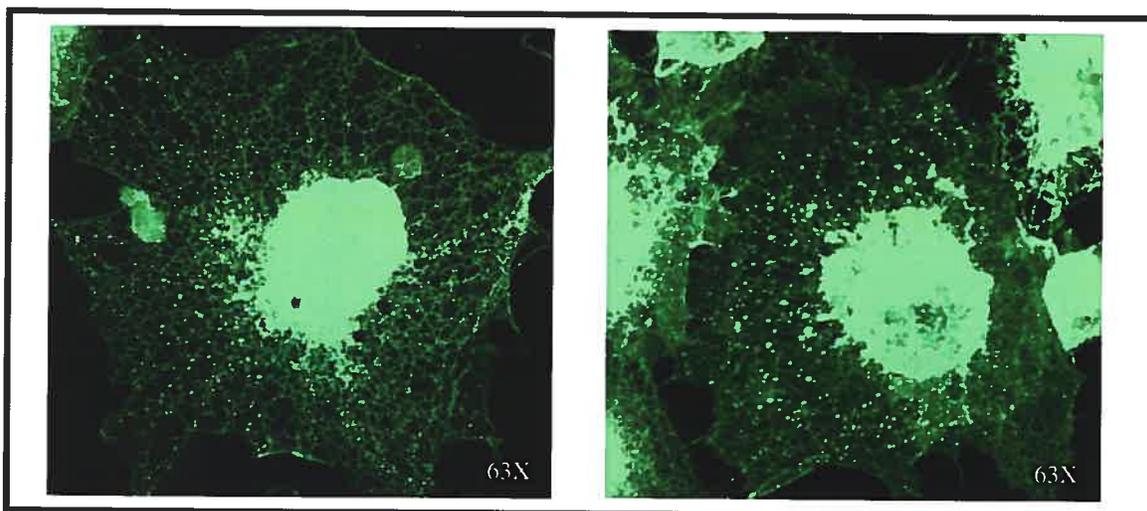
Suite aux expériences de caractérisation de la protéine GI, nous avons voulu faire des études complémentaires de localisation de la protéine. La localisation intracellulaire de la protéine GI permettrait de confirmer les résultats obtenus dans la section précédente sur la possible résidence de GI dans le RE. Pour ces études, des protéines de fusion GFP « *Green Fluorescent Protein* » ont été générées et exprimées dans les cellules COS-1.

## 2.1 La protéine Gl est localisée et retenue au RE

La construction GL-FL-pEGFP.N1 a été utilisée afin de faire la localisation intracellulaire de Gl. Cette protéine de fusion contient la séquence complète du cDNA de Gl suivi de la séquence de l'EGFP en fusion C-terminale de Gl.

### 2.1.1 Transfection de GL-FL-pEGFP.N1

La construction GL-FL-pEGFP.N1 a été transfectée de façon transitoire dans les cellules COS-1 et suivie de l'analyse des cellules par immunofluorescence en microscopie confocale. Toutes les cellules observées en microscopie confocale ont un profil similaire et pour l'expression et la localisation de la EGFP: elle est de forte intensité et localisée au RE. Il y a une forte accumulation d'EGFP près du noyau cellulaire, ce qui semble confirmer la résidence de la protéine au RE. Il semble aussi y avoir de petites vésicules denses en EGFP et celles-ci pourraient être des vésicules de types COPI qui assurent le transport rétrograde vers le RE d'une partie de notre protéine qui se serait échappée du RE (Chapitre 1 : Section 5.3.6 : Figure 18). On peut aussi bien voir le réseau de réticulation qui couvre l'ensemble de la surface cellulaire et qui est typique du réseau du RE (Figure 34).

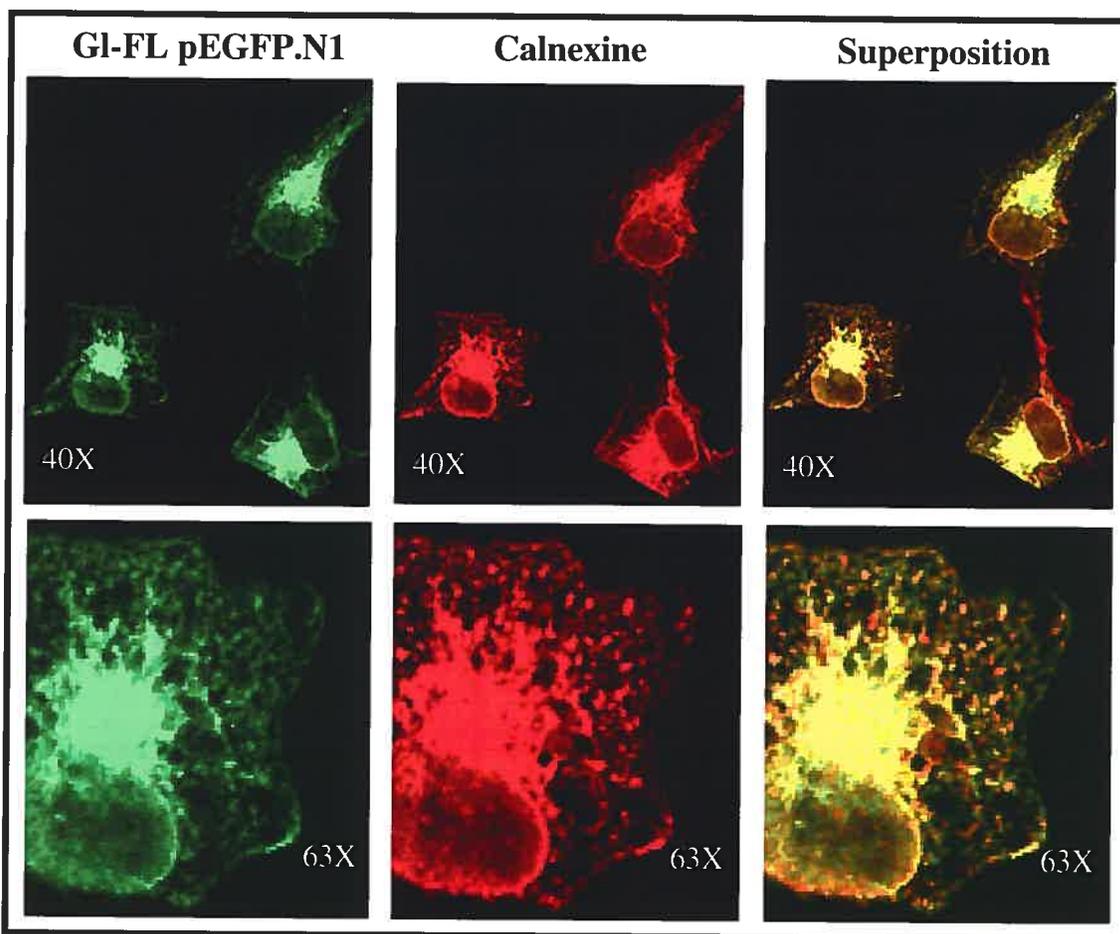


**Figure 34 : Immunofluorescence de transfections transitoires de GL-FL-pEGFP.N1**

Cellules COS-1 transfectées avec GL-FL-pEGFP.N1 : Gl localise au RE.

## 2.1.2 Co-localisation avec la Calnexine

Afin de confirmer la localisation et la rétention de notre protéine de fusion dans le RE, nous avons fait des études de co-localisation avec la Calnexine, une lectine résidante du RE impliquée dans le repliement des N-Glycoprotéines (Chapitre 1 : Section 5.3.4 : figure 16). Les cellules COS-1 ont donc été transfectées de façon transitoire avec la construction GL-FL-pEGFP.N1, fixées puis incubées avec un anticorps contre la Calnexine. Il y a une forte co-localisation entre la EGFP et la Calnexine observée dans toutes cellules où il y eu double marquage EGFP et Calnexine couplée à l'Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (H+L). Un exemple de co-localisation dans les cellules COS-1 est illustré sur la Figure 35.



**Figure 35 : Co-localisation de GL-FL-pEGFP.N1 avec la Calnexine**

Images en microscopie confocale de transfections transitoires de la construction GL-FL-pEGFP.N1 dans les cellules Cos-1 suivi d'un marquage avec l'anticorps Calnexine. Il y a co-localisation de la Calnexine et de GL-FL-pEGFP.N1

## 2.2 Localisation des mutants de Gl en fusion GFP

Comme il a été mentionné dans le Chapitre 1 : Section 5.3.6 : Figure 18, les protéines transmembranaires de type I (Chapitre 1 : Figure 14) comme la Calnexine contiennent un motif di-lysines (KKXX) dans leur domaine cytoplasmique qui agit comme signal de rétention/résidence au RE (Nilsson *et al.*, 1989). Les protéines transmembranaires de type II sont retenues de façon similaire grâce à un motif di-arginines (Schutze *et al.*, 1994). La rétention et la récupération de ces protéines se fait par interaction directe du motif chargé positivement avec les COPI (Figure 18) (Letourneur *et al.*, 1994). Différents mutants de la région transmembranaire et cytoplasmique de Gl ont été générés afin d'évaluer la fonction de ces domaines protéiques dans la localisation et rétention de Gl au RE.

### 2.2.1 Délétion des domaines transmembranaire et C-terminal de la protéine Gl

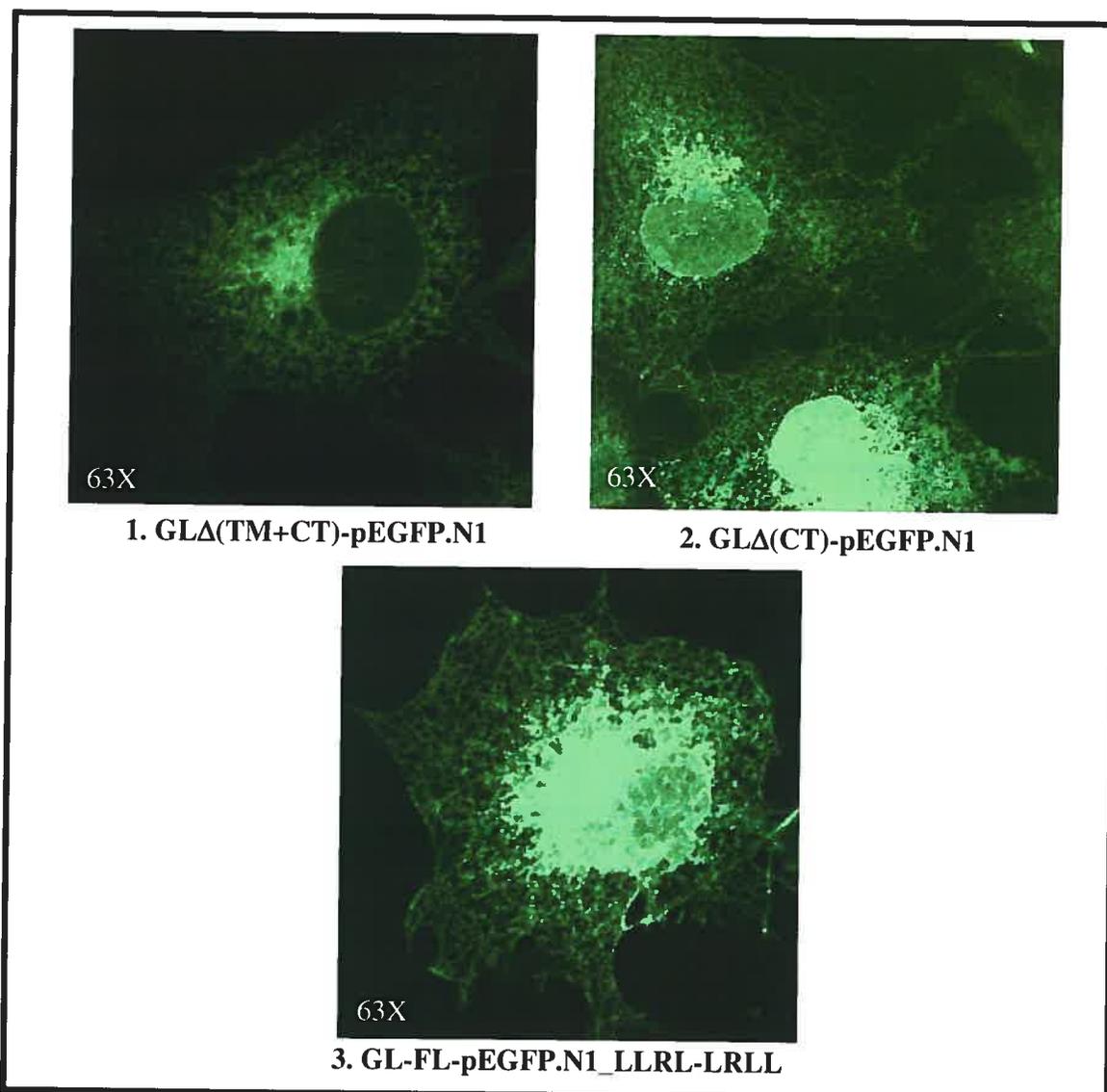
La première construction générée a été une fusion EGFP avec la séquence de Gl allant du peptide signal au domaine transmembranaire (comme en Chapitre 3 : Section 1.3) dans le vecteur pEGFP.N1. Cette construction est donc dépourvue du domaine transmembranaire (TM) et de la région C-terminale (CT) cytosolique de Gl. La construction GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 a été transfectée de façon transitoire dans les cellules COS-1 et l'analyse des images en immunofluorescence par microscopie confocale. Comme cette construction était sécrétée hors des cellules HEK en Chapitre 3 : Section 1.3, on pouvait s'attendre à retrouver un phénotype semblable dans nos études de localisation de cette même construction en fusion EGFP. Effectivement, les images en microscopie confocale démontrent que la proportion de protéine localisée au RE est beaucoup plus faible et la rétention dans la région proche du noyau est absente. On peut donc supposer que la protéine, comme en Section 1.3, est sécrétée hors de la cellule puisqu'elle ne possède plus de domaine transmembranaire pour l'ancrer à la membrane ni de motif de rétention situé dans son domaine C-terminal cytosolique (Figure 36).

### 2.2.2. Délétion de la région C-terminal de la protéine Gl

Le deuxième mutant généré comprend la séquence de Gl allant du peptide signal au domaine transmembranaire inclusivement, donc une construction dont seule la région C-terminale cytosolique de Gl a été délétée. Cette construction en fusion EGFP, la GLΔ(CT)-pEGFP.N1 a été transfectée de façon transitoire dans les cellules COS-1 et des images en immunofluorescence par microscopie confocale ont été prises. Malgré la perte de la région C-terminale, la protéine de fusion EGFP semble toujours localisée et être retenue dans le RE. La rétention semble un peu plus faible qu'en Figures 34 et 35 mais est tout de même significative. De plus, il ne semble pas y avoir de vésicules fortement marquées en EGFP comme dans la Figure 34. La perte de la région C-terminale pourrait empêcher la reconnaissance de la protéine par les vésicules COPI (Figure 36).

### 2.2.3 Mutagenèse des lysines de la région C-terminale cytosolique de Gl

Comme le motif de rétention des protéines transmembranaires de type I est un motif double-lysines (KKXX ou KKKXX) situé dans la région C-terminale cytosolique de ces protéines, les lysines situées dans cette région de la protéine Gl ont été mutées en leucines (Nilsson *et al.*, 1989). La séquence protéique de la région C-terminale cytosolique de Gl a donc été modifiée de FLHSEQKRRKLILPKRLKSSTSFANIQENAT à FLHSEQLLRLILPLRLLSSTS FANIQENAT. Les lysines ont été mutées en leucines plutôt qu'en arginine car les motifs double-arginine sont les motifs de rétention des protéines transmembranaires de type II (Schutze *et al.*, 1994). Malgré les mutations des lysines, la protéine de fusion GL-FL-pEGFP.N1\_LLRL-LRLL est toujours localisée et retenue au RE. La rétention semble aussi forte que la chez la protéine de fusion comprenant la séquence complète de Gl vu l'intensité de la GFP, surtout dans la région près du noyau. Comme dans la section précédente, il semble ni avoir que quelques vésicules denses en EGFP dans la cellule donc que la perte des lysines en région C-terminale pourrait empêcher la reconnaissance de la protéine par les vésicules COPI (Figure 36).



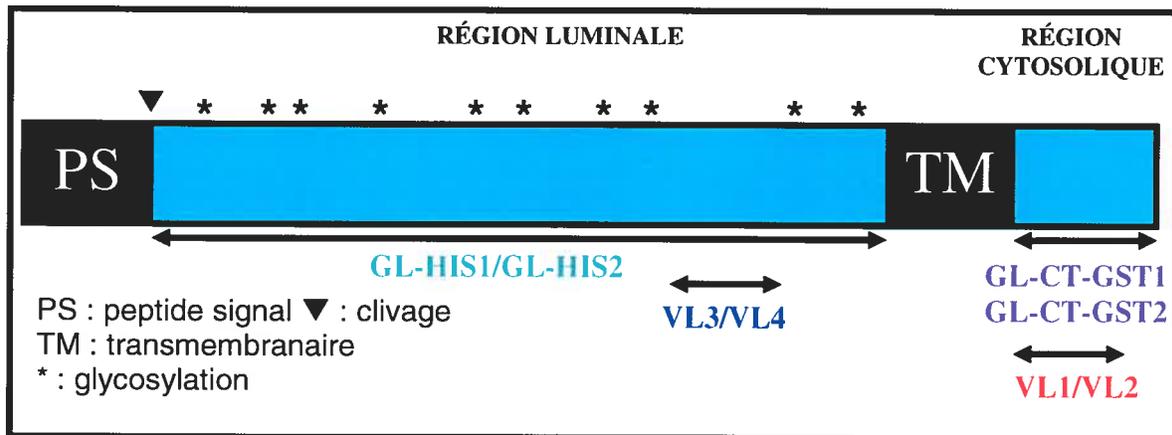
**Figure 36 : Transfections des mutants de GL dans pEGFP.N1**

Images en microscopie confocale de transfections transitoires en cellules COS-1 des différents mutants de GL dans pEGFP.N1 :

1.  $GL\Delta(TM+CT)$ -pEGFP.N1 : GL sans domaine TM et région C-term est localisée au RE mais sécrétée
2. GL avec son domaine TM mais sans la région C-term est localisée et retenue au RE
3. Les mutations des lysines en leucines dans la région C-term de GL ne change pas la localisation de la protéine.

### 3 . Production d'anticorps contre la protéine Gl

Afin de pouvoir pousser un peu plus nos études sur la protéine Gl, plusieurs anticorps ont été générés contre différentes régions de la protéine Gl. Pour chacune des constructions, deux lapins ont été immunisés. Deux anticorps ont été générés contre la partie luminaire de Gl (**GL-HIS1&GL-HIS2** et **VL3&VL4**) et deux autres anticorps ont été produits contre la partie C-terminale cytosolique de Gl (**GL-CT-GST** et **VL1&VL2**) (Figure 37). Les anticorps **VL1&VL2** et **VL3&VL4** qui ont été produits contre des peptides MAP « *Multiple Antigenic Peptide* » et ces anticorps sont référés comme étant **GII** (**VL3&VL4**) et **G12** (**VL1&VL2**) (Chalhoub *et al.*, 2003). La construction GL-HIS-TAG couvre la région N-terminale de Gl allant du site de clivage du peptide jusqu'au domaine transmembranaire suivi d'un Tag Histidine en fusion en C-terminal (**GL-HIS1&GL-HIS2**). La dernière construction couvre le domaine C-terminal cytosolique entier de Gl et est précédé d'un Tag GST suivi d'un site de clivage à la Thrombine (**GL-CT-GST1&GL-CT-GST2**). Un résumé des différents anticorps produits est illustré en Figure 37.



**Figure 37 : Anticorps produits contre la protéine Gl**

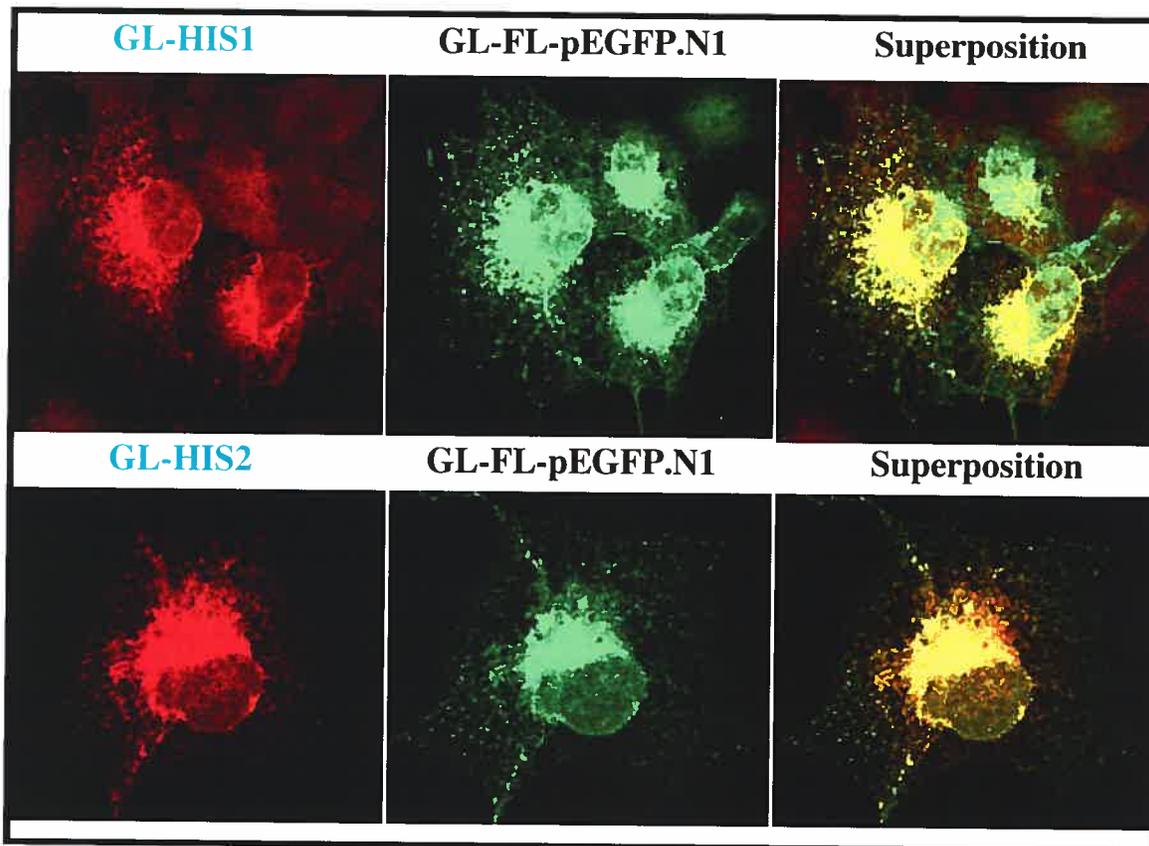
Protéine de fusion avec un Tag histidine en C-Terminal contre la région luminaire de la protéine Gl (**GL-HIS-TAG**)

Protéine de fusion avec un Tag GST en C-Terminal contre la région cytosolique de la protéine Gl (**GL-CT-GST**)

Peptides (15a.a.) dirigés contre les parties luminaire (**VL3&VL4: LNGLNKAEPETHLC-MAP**) et C-terminale cytosolique de Gl (**VL1&VL2: LHSEQKRKRLIPKR-MAP**)

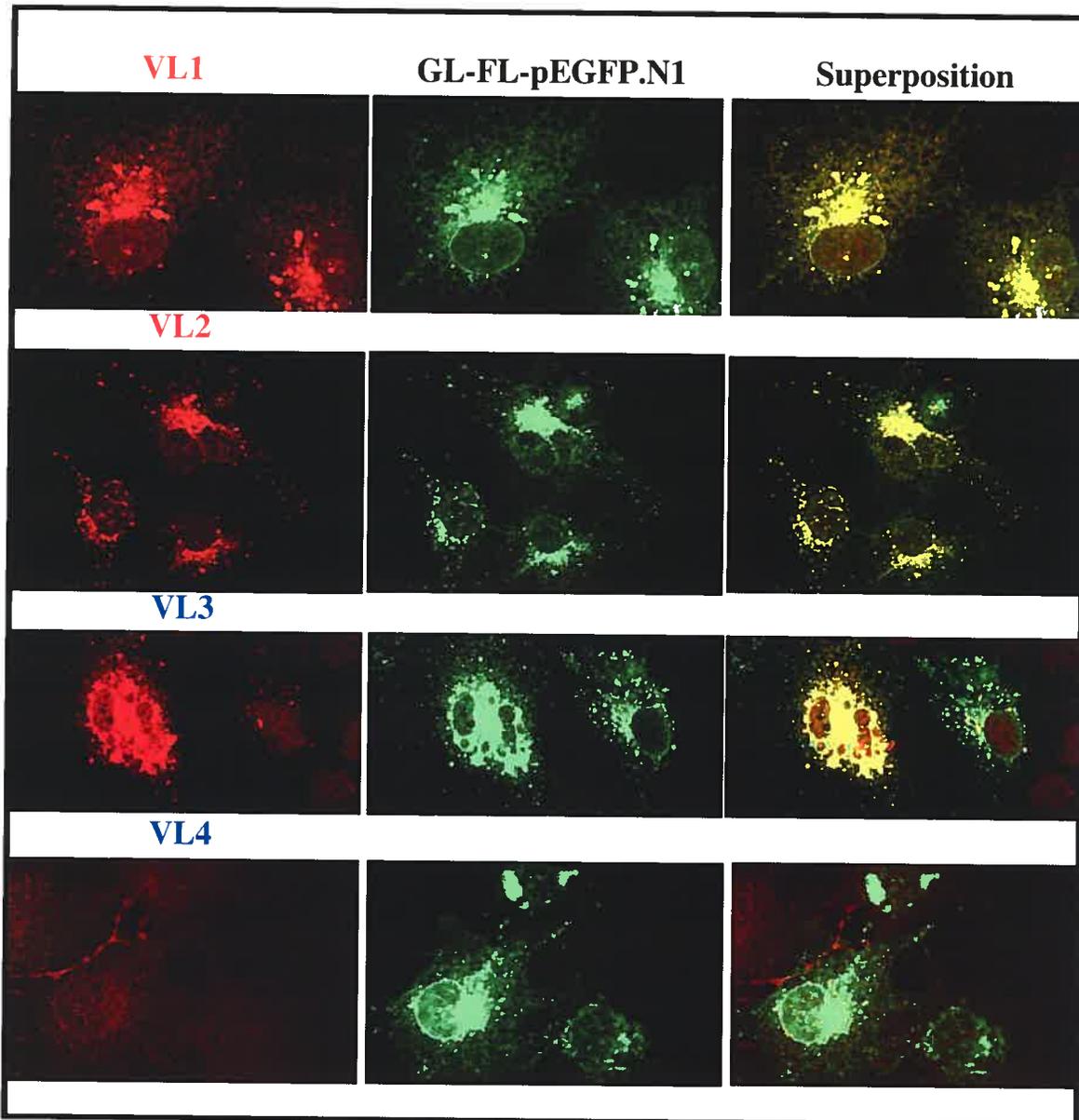
### 3.1 Tests en immunofluorescence des anticorps

Les anticorps ont été testés en immunofluorescence sur des cellules COS-1 transfectées avec la construction GL-FL-pEGFP.N1. Les sérums ont été utilisés à dilution finale de 1/100 et couplés à l'anticorps secondaire Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (H+L). C'est la co-localisation de la EGFP avec les différents anticorps qui nous a permis de déterminer le ou lesquels des anticorps est capable de reconnaître la protéine Gl dans la cellule donc qui peut être utilisé en immunofluorescence. Parmi les anticorps, seuls les sérums **GL-CT-GST1&GL-CT-GST2** n'ont pas été testés en immunofluorescence puisque que les tests préliminaires en immunoprécipitation n'étaient pas concluants. Parmi ceux qui ont été testés, **GL-HIS1&GL-HIS2** ainsi que **VL1&VL2** co-localisent très bien avec la EGFP, **VL3** co-localise peu avec la EGFP et **VL4** ne co-localise pas avec la EGFP (Figures 38 A-B).



**Figure 38-A : Tests des anticorps GL-HIS en immunofluorescence**

Images en microscopie confocale de transfections transitoires de la construction GL-FL-pEGFP.N1 dans les cellules COS-1. Les cellules fixées ont été incubées avec les sérums finaux (1/100) des anticorps **GL-HIS1/GL-HIS2**.



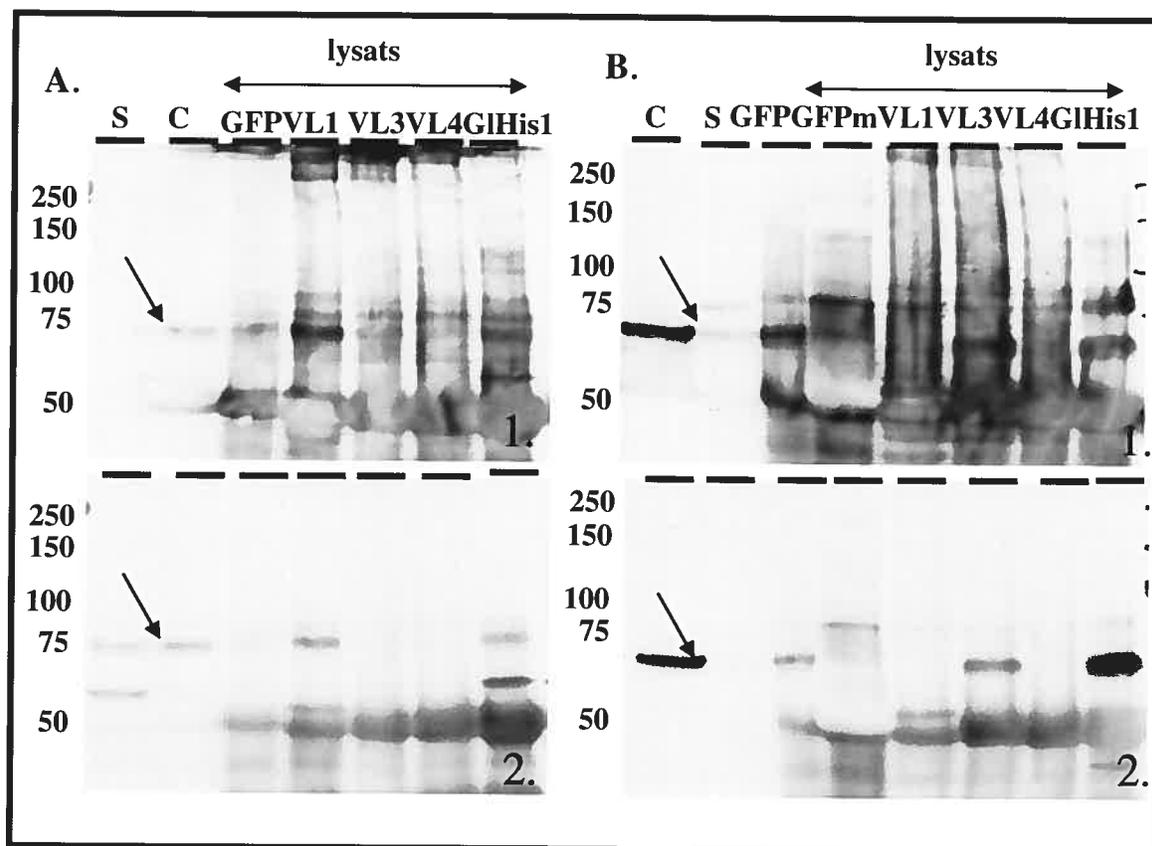
**Figure 38-B : Tests des anticorps VL en immunofluorescence**

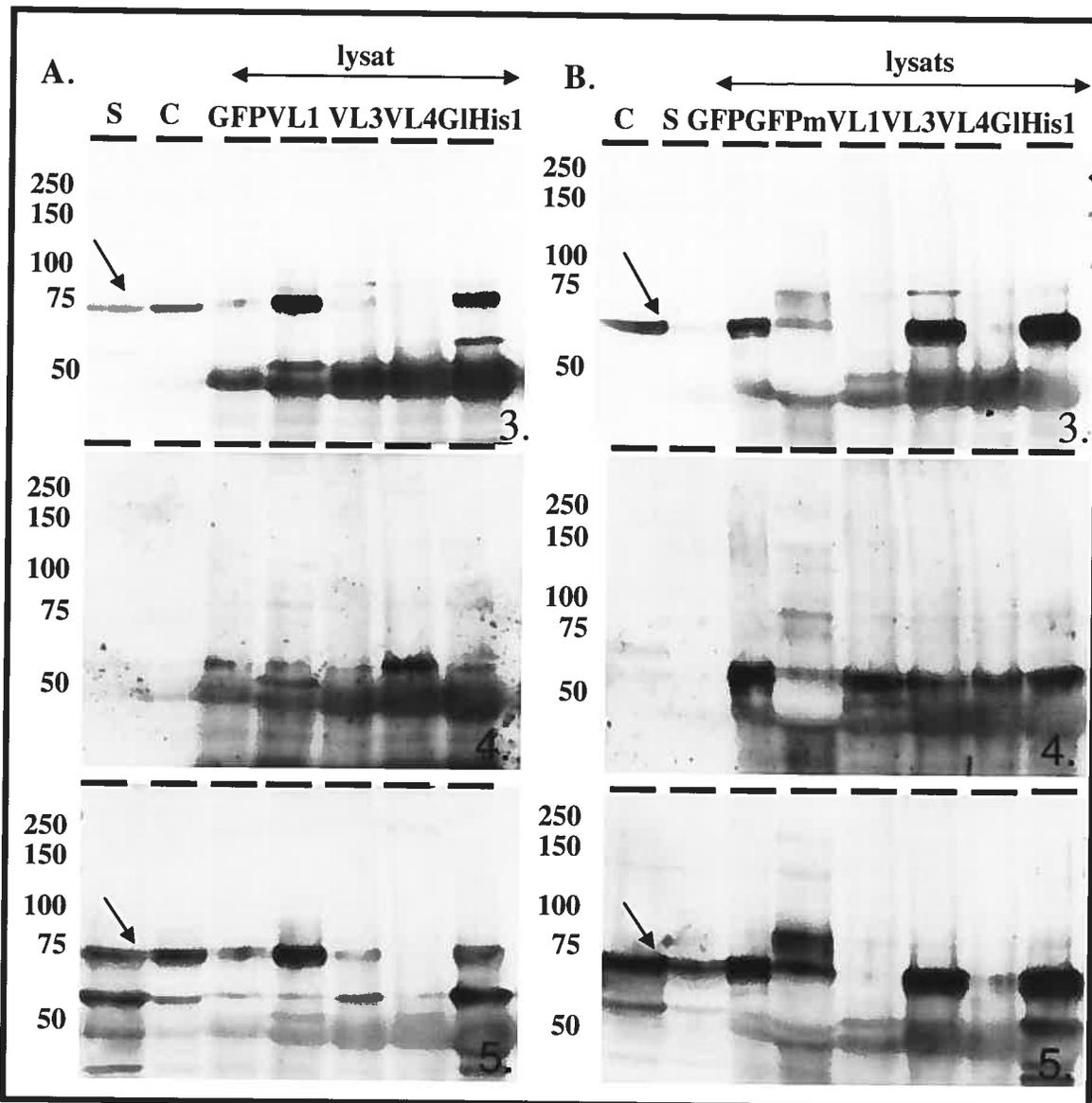
Images en microscopie confocale de transfections transitoires de la construction GL-FL-pEGFP.N1 dans les cellules COS-1. Les cellules fixées ont été incubées avec les sérums finaux (1/100) des anticorps **VL1&VL2**, **VL3&VL4**.

### 3.2 Tests des anticorps en immunoprécipitation

Comme la troisième approche du projet consistait à identifier des partenaires potentiels de la protéine Gl, les anticorps devaient aussi être testés en immunoprécipitation. Les

constructions GL-FL-pEGFP.N1 (75kDa) et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 (68kDa) ont été transfectées dans les cellules HEK 293 et celles-ci ont été lysées dans un tampon RIPA 1X contenant les détergents NP-40 1%, désoxycholate 0,5% et SDS 0,1%. Les extraits ont été immunoprécipités avec un anticorps EGFP comme contrôle et avec les anticorps VL1, VL3, VL4, GL-HIS1. Dans le cas de la construction GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1, le milieu de culture des cellules a aussi été immunoprécipité avec l'anticorps EGFP. Les réactions ont été analysées sur gel 7.5% polyacrylamide et transférés sur membranes qui ont été incubées avec chacun des anticorps utilisés pour les immunoprécipitations. Seul l'anticorps VL4 est incapable d'immunoprécipiter ou détecter la protéine Gl, qu'elle soit native ou tronquée. Comme prévu, les anticorps dirigés contre la région C-terminale de Gl comme VL3 et VL4 ne reconnaissent pas la construction GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1. Les immunoglobulines (IgG) migrent à 50 kDa (Figure 39).





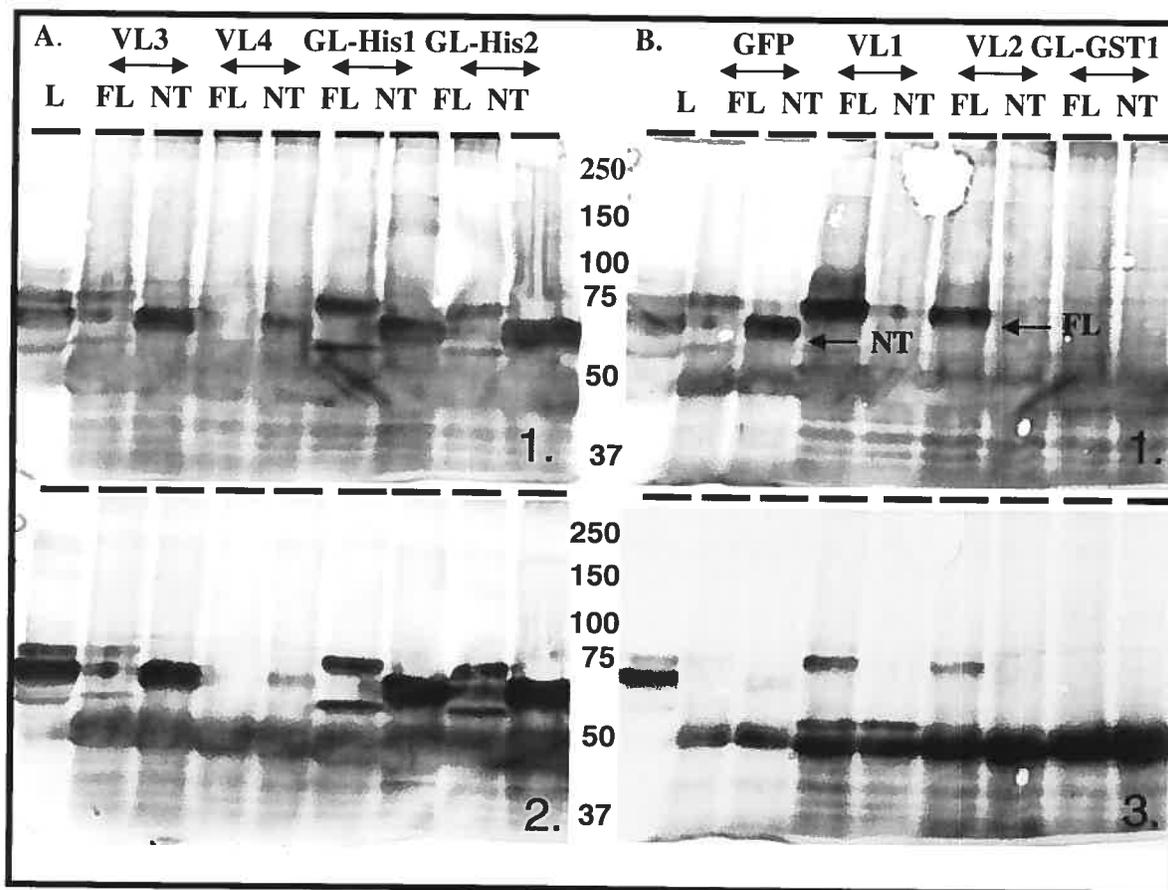
**Figure 39 : Tests des anticorps en immunoprécipitation**

Les cellules HEK-293 transfectées transitoirement avec les constructions GL-FL-pEGFP.N1 (A) et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 (B). Les lysats ont été immunoprécipité ( $\leftrightarrow$ ) avec les sérums finaux des anticorps dirigés contre Gl et avec l'anticorps GFP. Un extrait des lysats cellulaires (L) et culots (C) ont été déposés comme contrôles. Le milieu de GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 a été ( $\leftrightarrow$ ) avec l'anticorps EGFP (GFPm). Les bandes attendues sont indiquées par les flèches ( $\blacktriangledown$ ).

1. Hybridation GFP - 1 $\mu$ g/ml
2. Hybridation VL1 - Sérum final 1/100
3. Hybridation VL3 - Sérum final 1/100
4. Hybridation VL4 - Sérum final 1/100 Hybridation GL1 - Sérum final 1/100

### 3.3 Tests des anticorps en co-immunoprécipitation

Ensuite les anticorps ont été testés de la même façon mais avec des cellules qui ont été lysées avec un tampon de lyse CO-IP 1X contenant seulement 0.5% de NP-40 comme détergent. Ce tampon CO-IP 1X est utilisé pour des études de co-immunoprécipitation et est doux en détergent pour ne pas défaire les complexes protéiques qui se sont formés dans la cellule lors de lyse.



**Figure 40 : Tests des anticorps en co-immunoprécipitation**

Les cellules HEK-293 transfectées transitoirement avec les constructions GL-FL-pEGFP.N1 (FL) et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 (NT) ont été lysées dans un tampon CO-IP 1X. Les lysats ont été immunoprécipité ( $\leftrightarrow$ ) avec les sérums finaux des anticorps dirigés contre la région N-terminale (A) et C-terminale (B). Un extrait des lysats cellulaires (L) a été déposé comme contrôle.

1. Hybridation GFP - 1 $\mu$ g/ml
2. Hybridation GL1 - Sérum final 1/100
3. Hybridation VL1 - Sérum final 1/100

Comme les anticorps arrivent à immunoprécipiter nos protéines de fusion GL-FL-pEGFP.N1 et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 dans ces conditions, ils pourront alors être utilisés pour des études de co-immunoprécipitation avec des partenaires potentiels de Gl. Comme on peut le constater dans la Figure 40, les anticorps VL1 et VL2 reconnaissent la construction de GL-FL-pEGFP.N1 mais comme prévu, ils ne reconnaissent pas la construction tronquée GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1. GL-His1 et GL-His2 sont efficaces avec les deux constructions de Gl en fusion EGFP. L'anticorps VL3 est plus efficace à immunoprécipiter la protéine Gl tronquée et l'anticorps est très peu efficace en immunoprécipitation (Résumé Tableau III).

**Tableau IV : Sommaire des tests des anticorps produits lors de cette étude**

Tableau récapitulatif des propriétés des anticorps générés contre les régions N-terminale (NT) et C-terminale (CT) de la protéine Gl. Les anticorps ont été testés en immunoprécipitation avec les constructions GL-FL-pEGFP.N1 et GL $\Delta$ (TM+CT)-pEGFP.N1 et en immunofluorescence avec GL-FL-pEGFP.N1. ND : non déterminé.

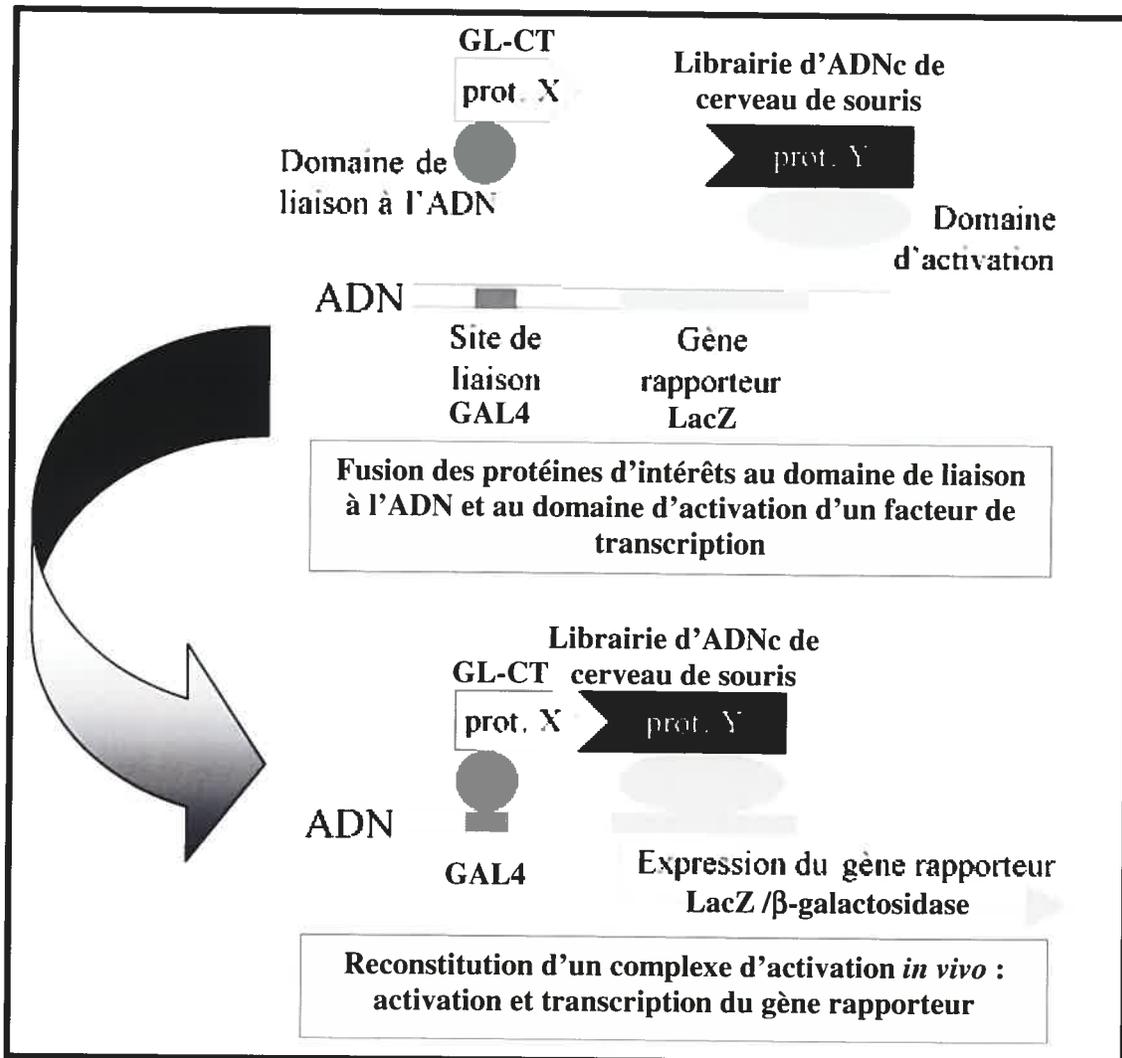
Anticorps	IP GL-FL pEGFP.N1	IP GL $\Delta$ (TM+CT) pEGFP.N1	Immunofluorescence GL-FL pEGFP.N1
VL3 (NT)	+	+++	+/-
VL4 (NT)	-	-	-
GL-HIS1 (NT)	++	+++	++
GL-HIS2 (NT)	++	+++	++
VL1 (CT)	+++	-	+++
VL2 (CT)	++	-	++
GL-GST (CT)	-	-	ND

#### 4. Crible Double-Hybrides

Le principe du crible double-hybrides est de faire exprimer une protéine d'intérêt en fusion au domaine d'activation de GAL4 tandis que le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 est en fusion avec une librairie de cDNA. Lorsqu'il y a interaction entre la protéine d'intérêt et une protéine de la librairie, la proximité des domaines d'activation et de liaison à l'ADN de GAL4 permet l'activation de la transcription de gènes rapporteurs qui vont permettre l'isolement des partenaires d'interaction (Chien *et al.*, 1991; Fields and Song, 1989). Afin d'identifier des partenaires potentiels de la protéine Gl, un crible double-hybrides a été fait en utilisant la région C-terminale cytosolique de Gl (GL-CT) comme domaine de liaison à l'ADN et une librairie d'ADNc de cerveau de souris comme domaine d'activation qui se lie à l'ADN (Figure 41). Nous avons utilisé une librairie d'ADNc (BD Biosciences : Matchmaker Clontech) de cerveau de souris (BALB/c, mâles, 9-12 semaines). Cette librairie a été choisie puisqu'il n'existe pas de librairie d'ostéoclastes et que Gl est très fortement exprimée dans le cerveau.

##### 4.1 Isolation et analyse des clones

Après isolement sur milieu sélectif de 735 clones positifs pour l'expression de gène rapporteur LacZ, environ 90 clones ont été sélectionnés pour leur croissance rapide et leur forte expression de la  $\beta$ -galactosidase (Tableau IV). Leur analyse a ensuite été faite par réaction PCR et par digestion enzymatique. La taille des inserts variait entre 0.2kb et 3kb. Les clones qui n'ont pas amplifié par PCR ont été exclus de l'étude et ensuite, seuls les clones possédant un insert supérieur à 0,5kb ont été sélectionnés pour des analyses de séquençage. Sur les 90 clones analysés, 55 ont été séquencés et analysés dans la base de données NCBI (Blast N, Blast X, ORF finder). Sur les 55 clones séquencés, huit ont été sélectionnés pour les prochaines étapes :  $\epsilon 60$  et  $\epsilon 61$ /lissencephaly-1 protein (LIS-1),  $\alpha 35$ /contactin4,  $\Omega 44$ /ubiquitin-conjugating enzyme E2N,  $\Delta 16$  et  $\alpha 15$  /Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M),  $\gamma 11$ /rhomboid veinlet-like 7,  $\gamma 30$ /Cullin1. Les clones sélectionnés correspondent à des gènes connus et dont la fonction pourrait correspondre aux caractéristiques de la protéine Gl (Tableau V).



**Figure 41 : Crible double-hybrides**

Lors de l'interaction d'une protéine d'intérêt X (GL-CT) liée au domaine de liaison de l'ADN avec une protéine de la librairie Y liée au domaine d'activation qui se lie à l'ADN, il y a activation et transcription du gène rapporteur LacZ et expression de  $\beta$ -galactosidase. Adapté de [www.ibs.fr/ext/labos/LIM/Myriam.BEN-KHALIFA](http://www.ibs.fr/ext/labos/LIM/Myriam.BEN-KHALIFA)



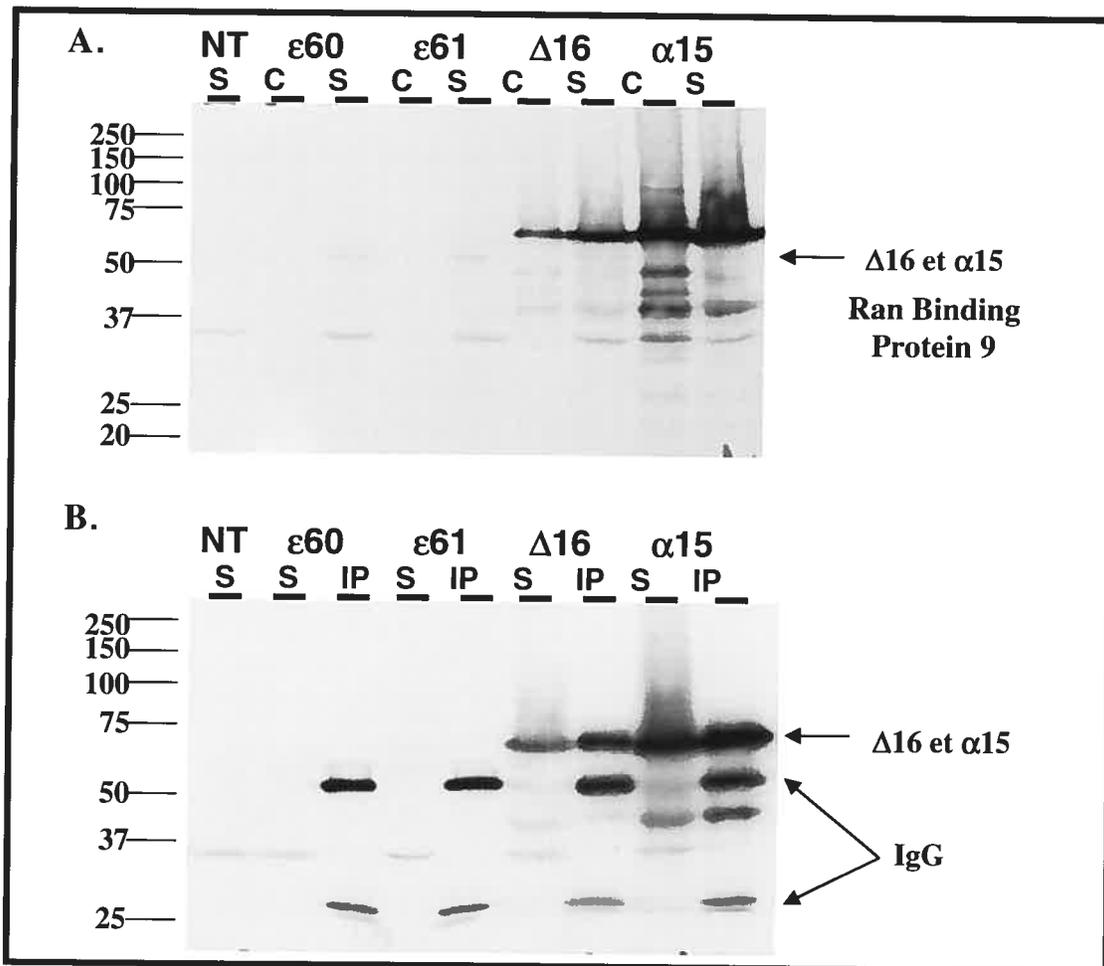
## 4.2 Transfections et immunoprécipitations

Ces différents clones ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression mammifère pCMV-MYC pour ensuite être transfectés dans les cellules HEK293. Après, les cellules ont été lysées dans le tampon de lyse CO-IP1X contenant seulement 0.5% NP-40 comme détergent.

Parmi les huit clones étudiés, seulement quatre d'entre eux s'exprimaient dans les cellules HEK et ont pu être immunoprécipités à l'aide d'un anticorps contre l'étiquette Tag MYC et de billes Protéines-G agarose :  $\alpha 35$ /contactin4,  $\Omega 44$ /ubiquitin-conjugating enzyme E2N,  $\Delta 16$  et  $\alpha 15$ /Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M). Comme les clones double-hybrides contiennent des séquences tronquées de protéines, il est probable que certaines d'entre elles sont instables et/ou non exprimées sous ces formes tronquées dans les cellules HEK. Un exemple d'expression des clones par analyse Western est illustré dans la Figure 42.

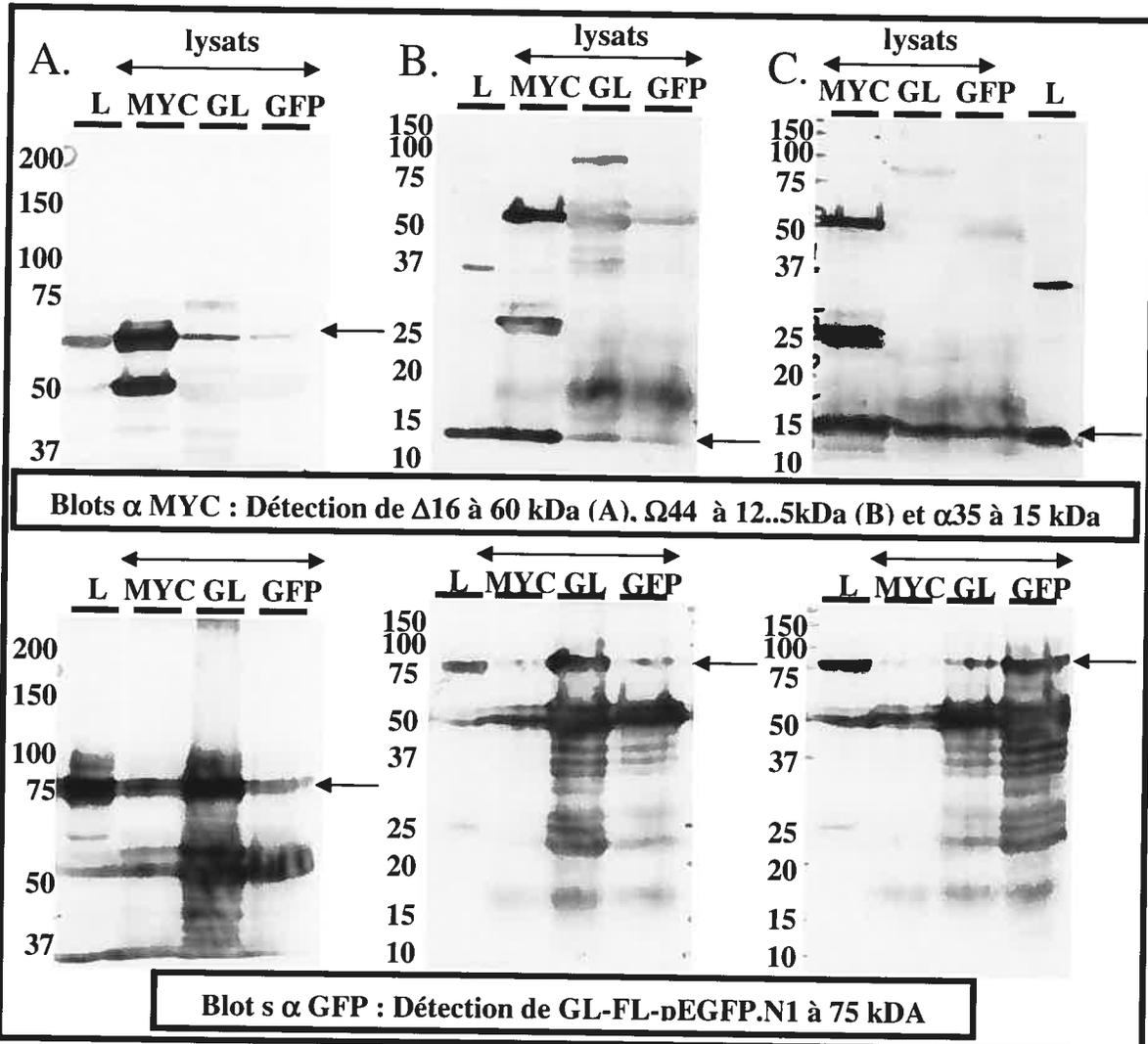
## 4.3 Co-immunoprécipitation avec GL-FL-pEGFP.N1

Chacun des clones exprimés ont ensuite été co-transfectés dans les cellules HEK 293 avec la construction GL-FL-pEGFP.N1 afin de les co-immunoprécipiter. Chacun des extraits protéiques des cotransfectants a été immunoprécipité avec soit l'anticorps MYC, EGFP ou VL1 (GL) et les membranes ont été incubées en présence des anticorps MYC et EGFP. Comme les clones  $\Delta 16$  et  $\alpha 15$  sont presque identiques (10 acides aminés de différence/Voir Tableau V), seul  $\Delta 16$ -MYC a été transfecté. Les trois clones double-hybrides co-transfectés avec GL-FL-pEGFP.N1 ont co-immunoprécipités (Figure 43).



**Figure 42 : Analyse des immunoprécipitations par Western des clones double-hybrides**

Les clones 2HYB sélectionnés et passés en vecteur d'expression pCMV-MYC ont été transfectés dans les cellules HEK 293. **A.** Les culots (C) et surnageants (S) des lysats (tampon CO-IP 1X) ont été déposés sur gel 7.5% polyacrylamide et transférés sur membrane. **B.** Les surnageants ont aussi été immunoprécipités avec l'anticorps MYC + billes Protéines-G agarose (IP). Un contrôle non transfecté a été utilisé (NT). Les deux membranes ont été analysées en Western avec l'anticorps MYC. Ici, seuls les clones Δ16 et α15 expriment une protéine.



**Figure 43 : Co-immunoprécipitation de GL et des protéines exprimées à partir des clones double-hybrides**

Les clones  $\Delta 16$ -MYC,  $\Omega 44$ -MYC et  $\alpha 35$ -MYC ont été co-transfectés avec GL-FL-pEGFP.N1 dans les cellules HEK 293. Les lysats (tampon CO-IP 1X) ont été immunoprécipité ( $\leftrightarrow$ ) avec les anticorps MYC, GL (Sérum final VL1) et EGFP + billes Protéine-G Agarose. Les membranes ont été révélées avec les anticorps MYC et GFP. Un extrait de lysat non immunoprécipité a été déposé comme contrôle (L).

- A. GL-FL-pEGFP.N1 +  $\Delta 16$ -MYC (60 kDa)  
 B. GL-FL-pEGFP.N1 +  $\Omega 44$ -MYC (12.5 kDa)  
 C. GL-FL-pEGFP.N1 +  $\alpha 35$ -MYC (15 kDa)

**Tableau VI : Clones double-hybrides sélectionnés**

Huit clones ont été sélectionnés selon les résultats des analyses de BlastN (séquence ADN), BlastX (séquence protéique) et ORF (*OpenReadingFrame* : séquence codante) sur le site NCBI.

Colonie	Taille de l'insert	Résultats Blast N	Résultats Blast X	Gène trouvé (ORF)
α35	+/- 2.5 kb	1. Contactin 4 [Rattus norvegicus] 2. Neural cell adhesion protein BIG-2 precursor 3. mKIAA3024 protein [Mus musculus]	1. Contactin 4 [Rattus norvegicus] 2. Neural cell adhesion protein BIG-2 precursor 3. mKIAA3024 protein [Mus musculus]	a.a. 902-1026 de Contactin 4 [Rattus norvegicus] / Neural cell adhesion protein BIG-2 precursor / Contactin 4 precursor (Brain-derived immunoglobulin superfamily protein 2) (BIG-2) (1026a.a.)
ε60	+/- 1.6 kb	1. Mus musculus platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Pafah1b1), mRNA / Mus musculus LIS mRNA / Mus musculus lissencephaly-1 protein (LIS-1) mRNA	1. Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Mus Musculus) 2. Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit (PAF acetylhydrolase 45 kDa subunit) (PAFAH alpha) (Lissencephaly-1 protein)	a.a. 225-317 de Lissencephaly-1 protein (LIS-1) mRNA
ε61	+/- 1.2 kb	1. Mus musculus platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Pafah1b1), mRNA / Mus musculus LIS mRNA / Mus musculus lissencephaly-1 protein (LIS-1) mRNA	1. Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Mus Musculus) 2. Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit (PAF acetylhydrolase 45 kDa subunit)(PAFAH alpha) (Lissencephaly-1 prote	a.a. 182-410 de Lissencephaly-1 protein (LIS-1) mRNA
γ11	+/- 1.4 kb	1. Mus musculus rhomboid, veinlet-like 7 (Drosophila) (Rhbd17), mRNA	1. Rhomboid, veinlet-like 7 [Mus musculus]	a.a. 229 - 361 de Rhomboid, veinlet-like 7 [Mus musculus] (361 a.a.)
γ30	+/- 900 bp	1. Cullin 1 [Mus musculus] / SCF complex protein cul-1 [Mus musculus]	1. Cullin 1 [Mus musculus] / SCF complex protein cul-1 [Mus musculus]	a.a. 653-776... de Cullin 1 [Mus musculus] (776 a.a.)
α15	+/- 2.8 kb	1. Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1)	1. Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1)	a.a. 77-360 de Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1) (653 a.a.)
Δ16	< 2 kb	1. Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1)	1. Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1)	a.a. 77-370 de Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M) (RanBPM) (B cell antigen receptor Ig beta associated protein 1) (IBAP-1) (653 a.a.)
Ω44	+/- 2 kb	1. Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (Mus Musculus)	1. Similar to zinc finger protein 69 [Rattus norvegicus] 2. Similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2N [Canis familiaris]	a.a. 1-86 de Similar to zinc finger protein 69 [Rattus norvegicus] (877 a.a.) / a.a. 17-95 Similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2N [Canis familiaris] (179 a.a.)

Le Tableau VI résume les résultats obtenus avec notre crible double-hybrides. Des études plus poussées avec ces clones doivent être effectuées afin de valider les interactions entre la région cytosolique de Gl et ces protéines complètes ou leurs sous-domaines.

**Tableau VII : Résumé des clones double-hybrides en co-immunoprécipitation**

Parmi les 8 clones en vecteur d'expression pCMV-MYC, quatre clones ( $\alpha$ 35,  $\Omega$ 44,  $\Delta$ 16 et  $\alpha$ 15) sont positifs en co-immunoprécipitation avec GL-FL-pEGFP.N1

<u>Clones double-hybrides</u>	<u>CO-IP</u>
$\epsilon$ 60 : lissencephaly-1 protein (LIS-1)	-
$\epsilon$ 61 : lissencephaly-1 protein (LIS-1)	-
<b><math>\alpha</math>35 : contactin 4</b>	+
<b><math>\Omega</math>44 : ubiquitin-conjugating enzyme E2N</b>	+
<b><math>\Delta</math>16 : Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M)</b>	+
<b><math>\alpha</math>15 : Ran binding protein 9 (RanBP9) (Ran-binding protein M)</b>	+
$\gamma$ 11 : rhomboid, veinlet-like 7	-
$\gamma$ 30 : Cullin 1	-

## **CHAPITRE 4 : DISCUSSION**

## La souris grey-lethal

L'ostéopétrose récessive maligne est une maladie génétique rare caractérisée par une accumulation anormale de tissu osseux due à un défaut de résorption des ostéoclastes. Il en résulte des os denses, fragiles, un sous-développement de la moelle osseuse et une anémie. Plusieurs modèles animaux ostéopétrotiques ont été étudiés afin de mieux caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans cette maladie. Pour ce qui est de l'étude de l'ostéopétrose autosomale récessive infantile maligne, la souris grey-lethal est le modèle animal idéal. En plus d'être ostéopétrotique, caractérisée par l'absence de cavité médullaire, la souris *gl* a aussi un phénotype au niveau du pelage qui est gris au lieu d'être agouti. Le laboratoire a démontré que les ostéoclastes *gl/gl*, bien que normalement différenciés, sont incapables de résorber l'os dû à un défaut de formation de leur bordure plissée (Figures 20 et 21) (Rajapurohitam *et al.*, 2001).

Le gène *gl* a récemment été identifié par clonage positionnel et la mutation conduit à une abolition de l'expression du gène (Figure 22) (Chalhoub *et al.*, 2001; Chalhoub *et al.*, 2003). Il n'y a donc aucune production de la protéine Gl chez ces mutants. Une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* dans des souris transgéniques BAC a permis de rétablir les deux phénotypes majeurs de la souris (ostéopétrose et coloration du poil) (Chalhoub *et al.*, 2003). De plus, les phénotypes de coloration du poil et d'ostéopétrose ont été complétés de façon indépendante par transgénèse par une expression de *gl* sous le contrôle des promoteurs tyrosinase (TYR-*gl*) et PU.1 (PU.1-*gl*). L'expression de *gl* a été ciblée aux mélanocytes par le promoteur de la tyrosinase, une enzyme clef dans la biogenèse des mélanines et a été ciblée aux cellules myéloïdes par le promoteur PU.1, un facteur de transcription essentiel à l'ostéoclastogenèse (Vacher J., non publié). Les travaux du laboratoire ont donc pu démontrer que la protéine Gl est essentielle à l'activation et la fonction des ostéoclastes et des mélanocytes. Depuis, plusieurs mutations du gène *gl* ont été identifiées chez des patients ostéopétrotiques, révélant l'importance du rôle joué par la protéine Gl.

## L'étude de l'ostéopétrose

Il n'est pas évident d'étudier le rôle d'une protéine dans le cas de l'ostéopétrose. Dans cette maladie, les cellules cibles impliquées dans le phénotype sont les ostéoclastes. Idéalement, une étude comparative des ostéoclastes *gl/gl* et non ostéopétrotiques aurait permis d'identifier les différences d'expression (ARN et protéine) entre ces cellules et aider à définir le rôle de Gl. Comme les souris ostéopétrotiques n'ont pas de cavité médullaire, il est pratiquement impossible d'en extraire des cellules de la moelle osseuse et donc de mettre des ostéoclastes en culture. De plus, même la culture primaire d'ostéoclastes provenant de souris non ostéopétrotiques n'est pas une tâche facile. Les ostéoclastes sont de grosses cellules multinuclées post-mitotiques. Ce sont les précurseurs qui sont mis en culture et exposés aux facteurs de différenciation (RANKL et M-CSF) qui induiront ces précurseurs à se différencier en ostéoclastes. C'est pourquoi la lignée cellulaire RAW est souvent utilisée pour la culture. Ces cellules proviennent d'une lignée de macrophages et peuvent être induites, en présence de RANKL et M-CSF, à se différencier en OCLs (OsteoClastLike cells) exprimant l'enzyme TRAP. Ces cellules vont exprimer Gl mais elles ne peuvent toutefois pas être considérées comme de vrais ostéoclastes. Par exemple, elles ne peuvent être utilisées pour des études de résorption osseuse (Chapitre 1 : Section 2.4).

Pour ce qui est des patients humains, la tâche est encore plus ardue. Peu de patients humains ostéopétrotiques sont diagnostiqués à temps pour que des études *in vivo* ou même *in vitro* soit effectuées. Il est possible de mettre des fibroblastes de patients en cultures et de faire des études histologiques ou par radiologie mais pour ce qui est de l'étude des ostéoclastes et/ou des os en général, les opportunités sont rares. Les patients doivent être pris en charge et identifiés/génotypés à temps et bien sûr, le consentement des parents doit être obtenu pour toute étude invasive avant ou après la mort de l'enfant.

J'ai donc décidé d'étudier la protéine par d'autres approches. Plusieurs constructions de la protéine Gl (native ou tronquée) ont été testées en cellules HEK 293 et COS afin de pouvoir exprimer de grandes quantités de protéines et permettre une étude plus facile et rapide. De plus, il est essentiel d'avoir de bons anticorps pour étudier les protéines. Comme l'expression endogène de Gl est difficilement détectable à l'aide de nos anticorps (nécessité de concentrer la protéine par fractionnement), il était plus facile d'en faire l'étude à l'aide de

constructions en surexpression. L'étude de la protéine endogène est toujours plus idéale mais pour les fins du projet, il était plus pratique et rapide d'en faire l'étude à l'aide de protéine de constructions. De façon similaire, la technique du double-hybrides en levure a été employée parce qu'elle procure des résultats rapides qui peuvent être confirmés par la suite en cellule de mammifère par co-immunoprécipitation et co-localisation. Par la suite, nous avons décidé de tester la technique du TAP-Tag « *Tandem Affinity Peptide (TAP) tag* » qui permet d'identifier des interactions natives en cellules. Ensemble, la combinaison de ces différentes techniques cellulaires permettra une meilleure évaluation du rôle de la protéine GI dans la cellule.

### **Les rôles connus de la protéine GI**

Depuis le début de mes recherches, deux équipes ont apporté des résultats décrivant le rôle potentiel de GI. La première a identifié GI comme une E3 ubiquitin ligase (Fischer *et al.*, 2003). La deuxième équipe a identifié GI comme une sous-unité  $\beta$  de CLC-7 essentielle à la résorption osseuse et à la fonction lysosomale du canal chlore 7 (Lange *et al.*, 2006). Certains des résultats de cette deuxième équipe sont en concordance avec les miens et seront analysés et comparés au cours de la discussion.

### **Résultats**

L'objectif principal de mes recherches était d'identifier le rôle de la protéine GI dans la cellule. Pour ce faire, trois approches distinctes ont été utilisées. Pour ce qui est de la caractérisation structurale de la protéine, mes travaux ont permis de démontrer que GI possédait une séquence peptide signal en région N-terminale et que celle-ci est clivée dans la cellule. De plus, la confirmation de la présence du domaine transmembranaire en C-terminal et des sites de N-Glycosylations nous a permis de classer la protéine GI parmi les protéines transmembranaires de type I (Figure 14). À l'aide de ces résultats et des résultats obtenus dans les études de localisation, nous avons pu situer notre protéine dans le compartiment cellulaire du réticulum endoplasmique. Ces mêmes études démontrent une rétention de la protéine GI dans ce compartiment et les domaines transmembranaires et C-terminal cytosolique semblent y jouer un rôle primordial.

Le crible double-hybrides a permis d'identifier trois partenaires potentiels de Gl : contactin 4, ubiquitin-conjugating enzyme E2N et Ran binding protein 9 (RanBPM). Par contre, des études plus approfondies devront être effectuées afin de confirmer hors de tout doute ces interactions dans la cellule. De façon complémentaire, une étude de « *Tandem Affinity Peptide (TAP) tag* » est en cours afin de permettre la confirmation et/ou l'identification de nouveaux partenaires de Gl.

### **Caractérisation structurale de la protéine Gl**

La confirmation de la présence d'une séquence peptide signal (MARDAELARSSGWPWRWLPALLLQLLRWRCALCA) en région N-terminale de Gl nous a permis de savoir que Gl est une protéine qui transite par la voie sécrétoire. Donc Gl pénètre dans le réticulum endoplasmique (RE) via cette séquence peptide signal qui est rapidement clivée comme démontrée par l'expérience de séquençage protéique (Figure 26). La protéine continue alors son insertion dans le réticulum endoplasmique et sera ancrée à la membrane par son domaine transmembranaire hydrophobe (TVSVVAVSFILFLPVVLYLSSF) situé en région C-terminale de la protéine. La protéine Gl native est donc ancrée à la membrane et est retenue dans la cellule puisqu'elle n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire. Par contre, la perte de cette séquence transmembranaire qui sert d'ancrage entraîne la sécrétion de la protéine Gl dans le milieu extracellulaire (Figure 28). Ces résultats permettent de définir la topologie de Gl comme étant une protéine transmembranaire de type I typique avec un domaine N-terminal luminal, un domaine transmembranaire et une courte séquence en région C-terminal qui est cytosolique (FLHSEQKKRKLILPKRLKSSTSFANIQENAT) (Voir Chapitre 1 : Section 5.2.1 : Figure 14).

Le réticulum endoplasmique est l'organelle dans lequel l'ajout de N-glycans aux protéines a lieu. La présence des 10 sites de N-Glycosylation dans la région luminaire de Gl, identifiés par un traitement de la protéine à la Tunycamycine, est venue confirmer une fois de plus que Gl est une protéine qui passe par le RE. La protéine passe donc d'un

poids moléculaire de 60kDa à 34kDa, ce qui correspondrait au poids moléculaire attendu d'après sa séquence de 338 acides aminés (38kDa) après la perte du peptide signal (4kDa). Les N-glycans ajoutés aux protéines subiront de nombreux remodelages dans le RE et l'appareil de Golgi, s'il y a lieu (Chapitre 1 : Section 5). Grâce à l'étude de ces N-Glycosylations, nous avons pu confirmer que la protéine Gl non seulement localise au réticulum endoplasmique mais y est aussi retenue (Figures 29 à 33).

Les protéines transmembranaires de type I retenues au RE ont un signal de rétention spécifique à cette classe de protéines dans leur domaine C-terminal cytosolique qui est un signal double-lysines (KKXX ou K(X)KXX) (Voir Chapitre 1 :Section 5.3.6). L'accessibilité de ces signaux ne dépend pas seulement de leur position dans la protéine mais de la proximité du segment transmembranaire. Ainsi, les signaux double-lysines sont plus actifs lorsque positionnés le plus loin de la membrane, en région C-terminale distale du côté cytoplasmique (Shikano and Li, 2003). La séquence C-terminale cytosolique de Gl contient 5 lysines (FLHSEQKKRKLILPKRLKSSSTSFANIQENAT) qui sont situées de façon à recréer ce motif mais sont situées assez près du domaine transmembranaire. Une approche de mutagenèse a alors été entreprise dans le but d'aller muter toutes les lysines de la région C-terminale cytosolique en leucines (FLHSEQLLRLLILPLRLLSSSTSFANIQENAT). Nous voulions voir si la perte des lysines et donc d'un signal potentiel de rétention au RE allait modifier la localisation et/ou la rétention de Gl au RE. Ce mutant a été effectué en protéine de fusion EGFP afin de visualiser la localisation de Gl. La localisation et la rétention de Gl n'ont toutefois pas été modifiées par cette mutagenèse. Les conséquences de ce résultat sont détaillées dans la prochaine section sur les études de localisation.

### **Les études de localisation de la protéine Gl**

Déjà, les études de caractérisation ont permis de situer la localisation de la protéine Gl au niveau du réticulum endoplasmique. Les études de localisation faites en utilisant une des protéines de fusion EGFP ne sont venues que confirmer nos hypothèses de localisation. Effectivement, la protéine Gl native en fusion EGFP localise au réticulum

endoplasmique, est retenue dans cette organelle vue l'accumulation de EGFP près du noyau et co-localise avec la Calnexine, une lectine résidente du RE.

- **La perte du domaine transmembranaire et C-terminal de Gl**

La perte du domaine transmembranaire et du domaine C-terminal cytosolique de Gl a permis de confirmer les résultats obtenus biochimiquement; c'est-à-dire que la localisation de Gl est toujours au réticulum endoplasmique mais n'y est plus retenue et est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Le peptide signal est donc capable de diriger Gl dans le RE mais sans le domaine transmembranaire et C-terminal, Gl devient une protéine soluble et sans un motif KDEL, elle ne peut être retenue au RE et sera sécrétée, probablement par la voie de sécrétion constitutive (Voir Chapitre 1 : Section 5.3.6).

Les domaines transmembranaires et C-terminal de Gl sont les régions dont la séquence est la plus conservée entre l'homme et la souris (Figure 24). Ces domaines ont un rôle important dans la fonction de Gl puisque leur perte résulte en la sécrétion d'une protéine normalement retenue au RE. Une mutation a été retrouvée chez un patient ostéopérotique dont la mutation est une substitution G→A en position +5 du site d'épissage de l'intron 5. La mutation induit un épissage aberrant qui produit un transcrit tronqué où l'exon 5 est absent (Chalhoub *et al.*, 2003;Quarello *et al.*, 2004). L'exon 5 encadre le domaine transmembranaire en entier et une partie du domaine C-terminal cytosolique (FLHSEQKKRKLIL). L'ostéopérose sévère de ce patient révèle l'importance de ces deux domaines dans la fonction de la protéine. Nous n'avons par contre pas la confirmation de la sécrétion de cette protéine tronquée chez ce patient.

- **La perte du domaine C-terminal de Gl**

Ces résultats nous ont poussé à vouloir caractériser le rôle de ces domaines par deux protéines de fusion EGFP : l'une dont seul le domaine C-terminal cytosolique a été délété tout en conservant le domaine transmembranaire et l'autre est un mutant du motif de rétention de la région cytosolique où toutes les lysines ont été mutées en leucines (voir

Section 2). Ces deux mutants n'ont pas modifié la localisation ni la rétention de Gl au réticulum endoplasmique.

L'ancrage de la protéine à la membrane par son domaine transmembranaire joue donc un rôle crucial dans la rétention de la protéine au RE. Comme mentionné en Chapitre 1 : Section 5.3.6, les motifs de rétention servent à récupérer les protéines résidentes du RE qui s'échappent de l'organelle. Le motif de rétention sera alors reconnu par les protéines COPI qui vont les réacheminer par transport rétrograde du *cis*-Golgi vers le RE où les protéines pourront exercer leur fonction. Toutefois, la rétention majeure de ces protéines se fait par des mécanismes de rétention directe par les interactions qu'elles ont entre elles. Par exemple, la Calnexine qui est une protéine transmembranaire de type I et la Calreticuline qui est une protéine soluble sont deux protéines résidentes du RE qui ont des motifs de rétention/relocalisation au RE au cas où elles s'en « échappent », mais c'est l'interaction qu'elles ont entre elles et avec toutes les autres protéines impliquées dans ce cycle qui les retient en majorité au RE (Munro and Pelham, 1987).

Les mécanismes de rétention directe sont peu caractérisés pour le moment mais on sait que ces motifs agissent comme « système de récupération » en cas de fuite et que la perte du motif chez Gl ne sera peut-être pas assez significative pour être visible dans un cas de transfection et de surexpression d'une protéine de fusion EGFP. De plus, comme les motifs double-lysines de Gl ne sont pas situés dans la région la plus distale du domaine C-terminal cytosolique, on peut supposer que le rôle de ces motifs est réduit.

Comme mentionné dans le Chapitre 3 : Section 2.2 (Figure 36), les mutants de la région C-terminale cytosolique de Gl (perte du domaine C-terminal et mutagenèse des lysines en leucines) sont toujours localisés et retenus au RE mais on ne retrouve plus de vésicules denses en EGFP comme on retrouve avec la protéine native de fusion. Ces vésicules pourraient être des vésicules COPI qui assurent le transport rétrograde de Gl du *cis*-Golgi au RE lorsque Gl s'en échappe. On peut supposer que les protéines qui « s'échappent » du RE chez les mutants de la région cytosolique continuent à migrer dans la voie sécrétoire et seront soit éventuellement dégradées, sécrétées ou accumulées à la

membrane plasmique (quoique cette dernière hypothèse ne soit pas visible en immunofluorescence). Les résultats obtenus en immunofluorescence ne peuvent que confirmer que la perte de la région cytoplasmique de Gl ne modifie pas sa localisation et sa rétention dans le RE. Des expériences fonctionnelles de la protéine ou *in vivo* (par transgénèse par exemple) seraient plus aptes à définir le rôle de cette région.

Ces études de mutagenèse des domaines transmembranaires et C-terminal cytosolique de Gl nous porte donc aussi à croire que la région luminale et hyper-glycosylée de Gl joue un rôle important dans sa fonction, en particulier via ses interactions protéiques. Si la perte de son domaine C-terminal n'influence pas la localisation de Gl, c'est que celle-ci doit interagir avec d'autres protéines résidentes du RE, comme les nombreuses chaperonnes du RE (Voir Chapitre 1 : Section 5). Par exemple, Gl pourrait se lier aux lectines Calnexine et Calreticuline ou toute autre protéine impliquée dans ce cycle, aux protéines de la famille « *Heat-Shock Proteins* » (HSP) qui participent au contrôle de qualité du RE, aux isomérases et oxydoréductases localisées au RE,...(Ellgaard and Helenius, 2003). Ce serait alors des mécanismes de rétention directe via ces interactions qui retiendraient Gl au réticulum endoplasmique. Gl pourrait aussi être elle-même une protéine chaperonne du RE impliquée dans la synthèse et le trafic intracellulaire des protéines qui passent par le RE. Ces interactions peuvent être vérifiées par co-immunoprécipitation.

### **Les partenaires du crible double-hybrides**

Jusqu'à maintenant, seulement quatre des huit clones double-hybrides retenus expriment une protéine dans les cellules HEK. Comme mentionné déjà, ceci pourrait être dû au fait que les clones codent pour des protéines tronquées qui pourraient être instables ou carrément non exprimées. Cela ne veut pas dire que ce ne sont pas des partenaires potentiels intéressants à étudier. Toutefois, seuls les clones qui expriment une protéine ont été étudiés en co-immunoprécipitation avec la protéine comprenant la séquence complète de Gl en fusion EGFP. Les clones contactin 4, ubiquitin-conjugating enzyme E2N et Ran binding protein 9 (RanBPM) ont pu être co-immunoprécipités avec Gl et ont été étudiés en détails.

La technique du crible double-hybrides permet d'identifier des interactions protéiques inconnues, de confirmer des interactions « suspectes » et de définir les domaines d'interaction. De plus, cette technique permet l'accessibilité immédiate aux gènes codant les protéines d'interaction. Le crible double-hybrides procure une méthode sensible permettant de détecter les interactions faibles et puisque cette méthode est réalisée *in vivo*, les protéines de fusion sont plus susceptibles d'être dans leur conformation native, ce qui augmente la sensibilité et la validité des interactions.

Le crible double-hybrides en levure peut par contre détecter de fausses interactions ou « faux-positifs ». Ces faux positifs ont lieu lorsque l'interaction de la protéine de fusion d'intérêt avec une protéine de la librairie n'est pas physiologiquement possible. Le système double-hybrides est certes fait *in vivo* mais les interactions protéiques ne sont pas dans les conditions natives de la cellule de mammifère. Les protéines hybrides peuvent être moins stables dans la levure, peuvent se localiser au noyau, les domaines de liaison et d'interaction à l'ADN de GAL4 peuvent empêcher le bon repliement d'une protéine ou camoufler les sites d'interaction, etc... Pour les interactions protéiques qui ont normalement lieu à la surface cellulaire, un système de phages serait plus approprié quoi qu'un système double-hybrides ait été utilisé pour identifier des interactions de protéines extracellulaires qui ont lieu à la surface membranaire (Ozenberger and Young, 1995; Van *et al.*, 1993). De plus, les conditions cellulaires de la levure en elles-mêmes pourraient empêcher le bon repliement des protéines et surtout les bonnes modifications post-traductionnelles, comme les glycosylations, qui sont essentielles à l'interaction de nombreuses protéines (Fields and Sternglanz, 1994). Toutes ces conditions font que la détection d'une interaction spécifique entre deux protéines de mammifères dans un système de levure ne veut pas nécessairement dire qu'il existe une interaction correspondante dans l'environnement natif des protéines. Donc toute interaction détectée dans un système double-hybrides devra être confirmée dans un système d'expression cellulaire de mammifère.

Malgré ces limitations, nous avons décidé d'utiliser l'approche double-hybrides afin d'identifier les partenaires protéiques potentiels de Gl. Comme Gl est une protéine majoritairement luminaire et très glycosylée, nous avons cru bon ne pas utiliser la protéine complète pour faire le crible. Comme mentionné plus haut, le domaine C-terminal de Gl est cytosolique, contient un site potentiel de rétention au RE et est très conservé d'une espèce à l'autre. Nous avons donc utilisé le domaine C-terminal cytosolique de Gl pour le crible double-hybrides pour l'identification de partenaires potentiels cytoplasmique.

- **La protéine Contactin 4**

La formation de connections neuronales est supportée par l'expression spatio-temporelle de molécules d'adhésion neuronales. Les molécules d'adhésion de la super famille des immunoglobulines (Ig), les « *axon-associated cell adhesion molecules* » (AxCAMs), sont reconnues pour leur rôle essentiel dans la guidance axonale durant le développement. De plus, ces molécules jouent un rôle dans la plasticité et la maintenance des connections synaptiques dans le cerveau adulte (Ogawa *et al.*, 1996). Les AxCAMs incluent le sous-groupe TAG-1/F3 dont fait partie la Contactin (CNTN1), TAG-1, BIG-1, NB-1, NB-2 et la Contactin 4 (aussi connue sous les noms BIG-2 et CNTN4) et ces protéines possèdent toutes la fonction de stimuler la croissance des neurites. La Contactin 4 est une protéine possédant une séquence peptide signal clivable en N-terminal, six domaines « *Ig-like* », quatre répétitions fibronectines de type III « *(FNIII)-like* » et un domaine d'ancrage à la membrane de type glycosylphosphatidyl inositol (GPI) en C-Terminal (Voir Chapitre 1 : Section 5.2.1 : Figure 14) (Yoshihara *et al.*, 1995). De plus, c'est une protéine qui possède plusieurs sites potentiels de N-Glycosylation et dont les résidus cystéines dans ses domaines Ig et tryptophane et tyrosine (ou phenylalanine) dans ses domaines FNIII sont conservés d'une espèce à l'autre.

La Contactin 4 est donc une protéine glycosylée majoritairement luminaire qui transite par le RE avant d'exercer sa fonction d'immunoglobuline à la surface membranaire. Il est donc très plausible qu'il y ait une interaction avec Gl au niveau du réticulum endoplasmique. La région contenue dans notre clone de la Contactin correspond à son

domaine GPI en C-Terminal qui pourrait interagir avec le domaine C-Terminal cytosolique de Gl. Nous envisageons donc de vérifier cette hypothèse par des études de co-localisation et de co-immunprécipitation de fractions contenant le RE.

Les souris déficientes en Contactin (CNTN1) souffrent d'une ataxie sévère et meurent à 18 jours (Berglund *et al.*, 1999; Yoshihara *et al.*, 1995). Pour ce qui est de la CNTN4, une protéine recombinante a été démontrée comme stimulant l'activité de croissance des neurites *in vitro*. Une étude a aussi identifié une mutation humaine de CNTN4 reproduisant un phénotype très similaire au syndrome « *3p deletion* » caractérisé par un retard développemental, un retard de croissance et des caractéristiques de dysmorphisme (Fernandez *et al.*, 2004; Yoshihara *et al.*, 1995). De façon intéressante, il a été démontré que la mutation *gl* cause, en plus du phénotype ostéopérotique, une dégénérescence du système nerveux central (Lange *et al.*, 2006; Pangrazio *et al.*, 2006) et ce même lorsque les phénotypes d'ostéopérose et de coloration du poil sont complétés indépendamment (Vacher, non publié). Gl pourrait donc aussi être impliqué dans le transport et/ou la fonction de la protéine CNTN4 et entraîner un phénotype neuronal lors de son inactivation. Par contre, la protéine Gl est exprimée dans plusieurs tissus contrairement à la Contactin 4 et la CNTN1 qui ne sont exprimées que dans le cerveau, ce qui n'en fait pas le candidat le plus intéressant.

- **La protéine « ubiquitin-conjugating enzyme E2N »**

La dégradation des protéines a lieu dans plusieurs compartiments cellulaires : cytosol, membrane, lysosomes et réticulum endoplasmique. Le système ubiquitine-protéasome est l'un des systèmes majeurs responsable de la dégradation des protéines dans la cellule. Comme mentionné en Chapitre 1 :Section 5.3.5 : Figure 17, lorsqu'une glycoprotéine est incapable d'acquies sa bonne conformation, elle sera retenue au RE et éventuellement dégradée. Le processus de dégradation utilisé est l'ERAD « *ER - Associated Degradation* » et ce processus prévient l'accumulation de protéines mal repliées et non fonctionnelles dans le RE. Le ERAD est impliqué dans trois étapes qui sont la reconnaissance de la protéine mal repliée, sa retrotranslocation dans le cytoplasme et sa

dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome « *ubiquitin-proteasome system* » (UPS) (Figure 17) (Yoshida, 2003).

Les protéines acheminées vers la dégradation par le protéasome sont modifiées avec l'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés, par un lien isopeptide covalent entre le groupement glycine carboxy-terminal de l'ubiquitine et un groupement  $\epsilon$ -amino de lysine de la protéine cible. Ensuite, un lien semblable est formé entre les ubiquitines pour former une chaîne. Le résidu lysine où se situe la poly-ubiquitination est important. Par exemple, la formation de chaînes poly-ubiquitine en Lys-48 et Lys-29 de l'ubiquitine cible vers une dégradation au protéasome tandis que les chaînes en Lys-63 sont des signaux de réparation de l'ADN et d'activation de facteurs de transcription (Weissman, 2001). D'autre part, il y a la mono-ubiquitination qui peut avoir des conséquences fonctionnelles pour les protéines ciblées comme des changements dans leur propriété de liaison, leur localisation subcellulaire et leur activité. Par exemple, la mono-ubiquitinylation est impliquée dans des mécanismes comme l'endocytose des récepteurs de surface vers les endosomes tardifs/lysosomes/vacuoles, la réparation de l'ADN, la régulation de l'activité des histones et de la machinerie transcriptionnelle, comme signal de triage des protéines transmembranaires vers les vésicules lysosomales/endosomes. La mono-ubiquitinylation est donc un important signal de régulation et sa fonction est surtout caractérisée dans le transport intracellulaire des protéines à travers la voie sécrétoire tardive et les mécanismes d'endocytose (Hicke, 2001). L'ubiquitinylation peut alors réguler le transport protéique par deux mécanismes : a) en modifiant l'activité de la machinerie de transport et b) en servant de signal de triage attaché aux protéines transmembranaires pour diriger leur localisation entre les différents compartiments cellulaires (Hicke and Dunn, 2003).

Le processus d'ubiquitinylation est un processus qui se déroule en trois étapes qui impliquent les enzymes « *ubiquitin-activating enzyme* » (E1), « *ubiquitin-conjugating enzyme* » (E2) et « *ubiquitin ligase enzyme* » (E3). Premièrement, l'enzyme E1 forme un lien thioester hautement énergétique avec l'ubiquitine. L'ubiquitine est alors transférée sur l'enzyme E2 par transthioylation. Les E2 contiennent un domaine catalytique

« *catalytic UBCc domain* » qui va catalyser le lien entre l'ubiquitine et les résidus lysines des protéines cibles. Notre clone double-hybrides de l'UBE2N est situé dans le site catalytique UBCc. La E2 est habituellement en coopération avec la E3 pour transférer l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat, mais elle peut aussi agir seule. Les E3s spécifient la durée dans le temps et la sélection du substrat lors des réactions d'ubiquitinylation. Les ubiquitines ligases sont donc les régulateurs de la réaction d'ubiquitinylation. L'étude du génome révèle que quelques gènes encodent pour des E1, des dizaines pour les E2 et des centaines de gènes encodent pour les ligases. En combinant la spécificité des E2 et E3, on peut comprendre comment le « *Ubiquitin Proteasome System* » (UPS) régule et élimine des protéines spécifiques tout en laissant les autres intactes (Pickart, 2001).

Plus spécifiquement, la UBE2N, une protéine cytosolique de type « *ubiquitin-conjugating enzyme* » (E2), a été démontrée comme étant régulée négativement dans un cas d'étude par biopuces du cortex préfrontal de patients schizophrènes. Il a été proposé que cette protéine serait impliquée dans le processus d'apoptose par régulation de la stabilité de p53 via son ubiquitinylation, donc cette « *ubiquitin-conjugating enzyme* » aurait une activité pro-apoptotique (Vawter *et al.*, 2002). La protéine UBE2N a aussi été décrite comme faisant partie d'un complexe avec STK15, un « *candidate skin tumor susceptibility gene* » (Ewart-Toland *et al.*, 2003). Une autre étude a démontré que la perte de l' $\alpha$ -Synuclein, une protéine exprimée dans les neurones et associée avec un rôle dans la formation et la plasticité des synapses neuronales, stimule l'expression de l'UBE2N. La protéine UBE2N est un homologue de Ubc13 dans la levure et comme Ubc13 elle médie l'assemblage de chaînes polyubiquitines Lys-63 qui sont impliquées dans diverses fonctions incluant la neurodégénérescence. On peut supposer que la protéine UBE2N serait impliquée dans les mêmes processus. De plus, plusieurs enzymes à activité E1 et E2 ont été associés au contrôle des étapes précoces de l'autophagie chez la levure et l'homme (Leng and Chuang, 2006). En résumé, cette protéine a été associée aux processus d'apoptose et de dégénérescence et comme mentionné plus haut, l'absence de Gl chez la souris entraîne aussi une dégénérescence du système nerveux central.

Il est possible que la protéine UBE2N forme un complexe avec Gl ou régule la fonction et/ou localisation de Gl en l'ubiquitylant sur les lysines du domaine C-terminal. Une première publication avait proposé que Gl pouvait être une E3 ubiquitine ligase (Fischer *et al.*, 2003). Ce groupe avait identifié Gl comme s'associant à la RGS-GAIP. Les RGS sont des protéines possédant un motif riche en cystéines et qui régulent de façon négative les protéines G. Les RGS s'associent à la sous-unité alpha des protéines G ( $G\alpha$ ) et stabilisent l'état de transition de l'hydrolyse GTP à GDP de leur activité GTPase. La dégradation des sous-unités alpha des protéines G ( $G\alpha$ ) par le système UPS est un régulateur négatif des protéines G. Le domaine N-terminal de la protéine RGS-GAIP est riche en cystéines et est responsable de son ancrage aux vésicules COPs. L'équipe de Fischer a démontré que Gl avait une activité E3 ubiquitin ligase et qu'en liant le domaine N-terminal de RGS-GAIP, Gl stimulait la dégradation protéasome-dépendante de  $G\alpha i3$ . Cette interaction démontrait donc un lien fonctionnel entre les sous-unités  $G\alpha$  et la dégradation ubiquitine-dépendante par un intermédiaire RGS.

Cette même équipe a aussi identifié un motif de type « *RING Finger-Like* » dans la région N-terminale de Gl (a.a.116 à 287) typique des E3 ubiquitine ligases. Le problème c'est que cette équipe a déduit par analyse bioinformatique que Gl était une protéine avec un large domaine cytoplasmique et un court domaine C-terminal luminal, ce qui aurait été en concordance avec son interaction avec la RGS-GAIP et son activité E3 ligase. De plus, la présence de nombreuses N-Glycosylations dans cette région n'est pas compatible avec l'activité E3 ubiquitine ligase. Cette équipe a identifié Gl comme se retrouvant dans la fraction cytosolique (bande à 38 kDa) et membranaire (bande à 94kDa) d'un extrait de rein et a localisé Gl à la membrane plasmique dans une transfection de HEK-293 (Fischer *et al.*, 2003). Mes résultats ainsi que ceux d'une autre équipe (Lange *et al.*, 2006) démontrent clairement que Gl est une protéine transmembranaire de type I et ne peut pas avoir une activité E3 ubiquitine ligase. Par contre, comme décrit précédemment, la présence de résidus lysines dans le domaine cytosolique de Gl peut en faire un substrat pour une ubiquitine ligase.

L'équipe de Lange a par contre identifié Gl comme une sous-unité  $\beta$  de CLC-7 essentielle à sa fonction lysosomale et donc à la résorption osseuse. Ils ont localisé Gl aux lysosomes avec CLC-7. On peut alors supposer que Gl pourrait être mono-ubiquitinylée lorsqu'en association avec ce partenaire, ce qui servirait de signal de transport vers le lysosome. Comme dans nos expériences, lorsque l'équipe de Lange a transfecté Gl seul dans des fibroblastes, la protéine est majoritairement localisée et retenue au réticulum endoplasmique. Ce n'est que lorsqu'il y a co-transfection de Gl et CLC-7, avec une surexpression de CLC-7 par rapport à Gl, que Gl localise aux lysosomes avec CLC-7. Je reviendrai sur cette interaction et son lien avec l'ubiquitinylation plus tard.

- **Ran binding protein 9 (RanBPM)**

La Ran Binding Protein 9 (RanBPM) a été originellement identifiée comme une protéine pouvant se lier à la protéine Ran d'où l'appellation « Ran-binding protein ». Cette interaction a été identifiée par un crible visant à trouver des partenaires de la Ran, une protéine ayant un rôle de transport noyau-cytoplasme et impliquée dans la réorganisation du réseau de microtubules au niveau du centrosome (Nakamura *et al.*, 1998; Nishitani *et al.*, 2001). La RanBPM contient aussi un domaine putatif SPRY « repeats in *splA* and *RyR* (ryanodine receptor) » souvent impliqué dans les interactions protéine-protéine mais encore de fonction inconnue dans la protéine RanBPM (Ponting *et al.*, 1997). Bien que la plupart des « Ran-binding proteins » aient un rôle important dans le transport nucléocytoplasmique, il est peu probable que la RanBPM soit impliquée dans ce processus (Nishitani *et al.*, 2001).

De nombreuses études ont impliqué la protéine RanBPM à plusieurs niveaux. L'expression ectopique de RanBPM a été démontrée comme liant c-Met, une « RTPK (receptor protein-tyrosine kinase) for HGF (hepatocyte growth factor) » qui régule l'activation de Ras (Wang *et al.*, 2002). Une autre équipe a démontré que la RanBPM cytoplasmique devenait nucléaire lorsqu'en présence d'une surexpression de p73 $\alpha$ , un facteur de transcription nucléaire relié à p53 et qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Kramer *et al.*, 2005). Une autre équipe a démontré une interaction avec les

sous-familles  $\beta 1$  et  $\beta 2$  des intégrines (Denti *et al.*, 2004). Une étude plus récente a démontré que RanBPM s'associait à CD39 dans les lymphocytes B et que cette association de RanBPM au domaine N-terminal intracytoplasmique de CD39 régulaient son activité enzymatique de façon négative. La CD39 est une glycoprotéine avec de courtes séquences cytoplasmiques et qui joue un rôle dans l'inflammation, la prolifération cellulaire et la migration (Wu *et al.*, 2006). Une autre étude très récente rapporte que RanBPM contribue à la signalisation de Semaphorin3A, une molécule de guidance axonale répulsive, par son association au domaine intracellulaire de la protéine Plexine-A (PlexA1) qui est essentielle à la régulation morphologique cellulaire. La perturbation de RanBPM affecterait la croissance et la guidance axonale à long terme (Togashi *et al.*, 2006).

Toutes ces études ont donc associé la protéine RanBPM à des protéines et des fonctions diverses donc la fonction précise de la RanBPM est encore incertaine. De plus, la majorité des études ont démontré des interactions entre la protéine cible avec la RanBPM par crible double-hybrides. Le fait que cette protéine ait été isolée dans plusieurs cribles double-hybrides différents et que les clones contiennent toujours le domaine SPRY (a.a. 212-333 de RanBPM) impliqué dans les interactions protéine-protéine peut apporter un doute sur ces nombreuses études et fonctions diverses de RanBPM. Notre étude ne fait donc pas exception puisque c'est aussi dans un crible double-hybrides que nous avons identifié deux clones différents de la RanBPM (a.a. 77 à 370 pour le clone  $\Delta 16$  et a.a. 77 à 360 pour le clone  $\alpha 15$ ) qui encadrent le domaine SPRY impliqué dans les interactions protéine-protéine.

Cependant la protéine RanBPM a été démontrée comme interagissant avec plusieurs protéines membranaires et/ou cytoplasmiques, son interaction avec Gl est plausible. Il a été suggéré que la protéine RanBPM aurait un rôle assez large dans la croissance cellulaire et la signalisation mais la fonction reste à préciser. Le lien et la fonction de l'interaction entre Gl et RanBPM est encore difficile à évaluer vu les interactions nombreuses de RanBPM avec des molécules de signalisation. La protéine RanBPM pourrait jouer un rôle de protéine membranaire de type « *scaffold* » qui modulerait la

fonction de plusieurs protéines dont Gl. Des études plus poussées doivent être faites avant de pouvoir déterminer de quel type de modulation il pourrait s'agir dans le cas de l'interaction Gl-RanBPM.

### Partenaires en TAP-tag

Pour caractériser de façon plus globale les interactions et la fonction de Gl, une étude de « *Tandem Affinity Peptide (TAP) tag* » a été démarrée. La région cytosolique de Gl (GL-CT) (30 a.a.) a été clonée dans les vecteurs pMZI et NTAP contenant les peptides (TAP-tag) placés en région C-terminale et N-terminale de Gl respectivement: GL-CT—Tag (pMZI) et Tag—GL-CT (NTAP). Le Tag a été placé en N-Terminal et C-Terminal de notre peptide contenant la région cytosolique de Gl (GL-CT) pour contrer l'effet allostérique que pourrait avoir le Tag sur notre peptide (Figure S2 en Annexe). Par exemple, le Tag en N-Terminal pourrait cacher un site d'interaction de Gl que le Tag en C-Terminal ne cacherait pas. En mettant le Tag de part et d'autre de notre peptide dans deux clones différents, nous diminuons la probabilité de camouflage des sites d'interactions de Gl par le Tag. Ces tags double-affinité sont composés de domaines de liaison IgG répétés en tandem « *tandemly-repeated IgG-binding domains* » provenant de la protéine A de *S.aureus* et un peptide de liaison à la Calmodulin « *Calmodulin-binding domain (CBP)* » séparés par un site de clivage de la protéase TEV. Les vecteurs expriment le gène de résistance à la Geneticin (G-418) afin d'isoler des clones stables (Rigaut *et al.*, 1999). Le système d'expression est basé sur l'utilisation de vecteurs d'expression sous le contrôle d'un promoteur régulé par des récepteurs nucléaires exprimés de façon exogène dans la lignée cellulaire transfectée. Dans notre cas, il s'agit de la lignée humaine de rein EcR-293 (Invitrogen) qui exprime de façon stable les récepteurs nucléaires VgEcr et RXR pVgEcr. Après traitement à l'hormone Ecdysone (Ponasterone A), les récepteurs nucléaires sont activés et l'expression de la protéine de fusion qui contient le tag est induite (Vickers and Sharrocks, 2002). Comme Gl est exprimée dans les reins, cette lignée assure une spécificité tissulaire des interactions (Chapitre 1 : Section 6.4 / Figure 22).

Les protéines qui contiennent le TAP-tag peuvent alors être purifiées en conditions natives et physiologiques. Deux colonnes d'affinité successives sont utilisées et chacune est constituée

de billes couplées soit aux IgG, soit à la calmoduline. L'élution des protéines liées de la colonne IgG utilise le clivage par la protéase TEV tandis que la colonne « *Calmodulin-Binding Peptide* » (CBP-Mg) utilise une élution à l'EGTA (Figure S3 en Annexe). Les protéines purifiées sont dans leur conformation native et peuvent être utilisées pour analyse fonctionnelle *in vitro* (Coulombe *et al.*, 2004; Jeronimo *et al.*, 2004). Les peptides dérivés des protéines digérées (Trypsine) pourront être identifiées par spectrométrie de masse. Comme ces protéines sont exprimées en conditions physiologiques, la méthode minimise les fausses interactions souvent retrouvées en méthodes de surexpression ou dans les cribles double-hybrides. De plus, comme ces interactions ont lieu dans des cellules de mammifère, la spécificité tissulaire et la crédibilité de l'interaction ne seront plus en doute contrairement aux interactions identifiées dans le crible double-hybrides.

### **Cl comme sous-unité $\beta$ de CLC-7**

La famille de canaux chlore « *CLC family* » est une large famille moléculaire avec des isoformes exprimés dans presque toutes les cellules eucaryotes, et neuf isoformes ont été identifiées dans le génome humain (Chen, 2005; Pusch, 2004). La localisation ubiquitaire de ces canaux chlore atteste de leur importance fonctionnelle et est confirmée par les nombreuses maladies humaines résultant de mutations affectant ces gènes : myopathies (CLC-1), épilepsie idiopathique (CLC-2), hypotension dans le syndrome de Bartter (CLC-Kb), lithiases rénales chronique dans le syndrome de Dent (CLC-5) et ostéopétrose (CLC-7) (Miller, 2006). L'activité de ces canaux est contrôlée par trois variables physiologiques : le pH, la concentration en  $\text{Cl}^-$  et le voltage. L'ouverture des canaux est favorisée par un pH bas, une concentration élevée en  $\text{Cl}^-$  et un voltage dépolarisant (charge positive interne).

L'acidification de la lacune de résorption qui permet la dissolution de la matrice minérale par l'ostéoclaste ainsi qu'une activité optimale des enzymes protéolytiques qui participent à la dégradation de la matrice osseuse organique fait intervenir la pompe V-ATPase vacuolaire et le canal chlore 7 CLC-7. Les protons produits par l'anhydrase carbonique de type II (CAII) vont se localiser dans les compartiments intracytoplasmiques grâce à la pompe V-ATPase. Cette pompe est toujours associée au canal chlore 7 qui permet le

passage d'ions  $\text{Cl}^-$  pour compenser les différences de potentiel membranaire. Lors de la polarisation de l'ostéoclaste, il y aura relocalisation des complexes V-ATPase et CLC-7 présents à la membrane des compartiments cytoplasmiques vers la membrane plissée des ostéoclastes pour permettre l'acidification de la lacune de résorption (Blin-Wakkach *et al.*, 2004).

Les mutations dans le gène *TCIRG1* codant pour l'isoforme  $\alpha 3$  de la sous-unité de 116kDa de la V-ATPase comptent pour environ 55% des cas d'ostéopétrose infantile humaine récessive tandis que les mutations du canal chlore 7 représente environ 10% des cas (Blin-Wakkach *et al.*, 2004). CLC-7 est une protéine transmembranaire membre de la famille des canaux chlore et transporteurs CLC (Brandt and Jentsch, 1995) localisée dans les endosomes tardifs et lysosomes (Jentsch *et al.*, 2005b; Jentsch *et al.*, 2005a). Les mutations dans le CLC-7 causent une ostéopétrose et le syndrome « *lysosomale storage disease* » chez l'homme et la souris (Kasper *et al.*, 2005; Kornak *et al.*, 2001a). En effet, la perte du canal CLC-7 cause une ostéopétrose sévère accompagnée d'une dégénérescence de la rétine et du système nerveux central (Kornak *et al.*, 2001b; Steward, 2003). Tous ces symptômes se rapprochent énormément des symptômes retrouvés chez la souris *gl* et chez les patients humains (environ 5% des cas d'ostéopétrose infantile maligne). De plus, la gravité des symptômes neuronaux a été mise en évidence par la complémentation de l'ostéopétrose puisque les souris *gl* complémentées pour l'ostéopétrose meurent de dégénérescence neuronale à peine quelques semaines plus tard que leurs congénères non complémentés. (Vacher. J., non publié).

L'équipe de Lange a démontré que Gl et CLC-7 co-localisent dans les endosomes tardifs et lysosomes d'une variété de tissus comme dans la bordure plissée des ostéoclastes en résorption (Lange *et al.*, 2006). Des études de co-immunoprécipitation ont aussi révélé que Gl et CLC-7 forment un complexe moléculaire suggérant que Gl soit une sous-unité  $\beta$  de CLC-7. Selon eux, CLC-7 serait requis pour localiser Gl aux lysosomes où Gl, qui est hautement glycosylée dans son domaine luminal, serait clivée. Comme la protéine CLC-7 est fortement réduite chez *gl*, le modèle proposé est que l'interaction Gl-CLC-7 serait nécessaire à stabiliser CLC-7. Les nombreuses glycosylations de Gl serviraient de

protection pour éviter la dégradation des protéines membranaires lysosomales, de façon similaire aux LAMPs (Voir Chapitre 1 :Section 5.3.8). La mutation Gl causerait donc une ostéopétrose en empêchant l'acidification de la lacune de résorption qui dépend de CLC-7. Les phénotypes d'ostéopétrose, d'accumulation aux lysosomes ou « *lysosomale storage disease* » ainsi que la neurodégénérescence dus à la perte de Gl pourraient être expliqués par la réduction des niveaux protéiques de CLC-7 (Lange *et al.*, 2006). Cette équipe a aussi confirmé le rôle de Gl au niveau des mélanocytes puisque le mutant de CLC-7 sur fond agouti a aussi un pelage gris.

Tout comme nous, cette équipe a localisé Gl au réticulum endoplasmique lorsque transfectée seule et c'est seulement en co-transfectant avec CLC-7 en surexpression que Gl s'est retrouvée aux lysosomes. CLC-7 serait donc essentiel pour amener Gl aux lysosomes. Ils démontrent aussi que Gl semble subir un clivage une fois aux lysosomes tandis que la forme native n'est retrouvée que dans le RE et les endosomes. Comme prévu, la co-expression de CLC-7 et une forme tronquée de Gl ayant perdue le domaine transmembranaire et C-terminal ne peut diriger Gl aux lysosomes puisque la protéine tronquée est sécrétée.

Ceci suggère que Gl ne puisse plus interagir avec CLC-7 sous cette forme et que comme mentionné plus haut, les régions transmembranaires et C-terminale de Gl sont cruciales pour sa fonction. Il serait donc intéressant de voir si les deux mutants de la région C-terminal (perte de la région C-terminale et mutagenèse des lysines en leucines) seraient en mesure d'interagir avec CLC-7 et assurer la fonction de protection lysosomale. En effet, la structure de Gl est très semblable à celle des LAMPs qui sont des protéines transmembranaires de type I hyper-glycosylées et qui sont localisées aux lysosomes. Les LAMPs possèdent toutefois un signal Gly-Tyr cytoplasmique de localisation aux lysosomes (Honing *et al.*, 1996;Honing and Hunziker, 1995;Hunziker and Geuze, 1996). Une construction de la région luminale de Gl avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique de LAMP1 a été générée et transfectée dans les cellules Cos-1. Les résultats préliminaires localisent toujours cette construction au RE où elle semble être

retenue. Il y a donc une interaction luminale qui est plus forte que le motif Gly-Tyr de LAMP1 et qui retient Gl au RE.

Il serait intéressant de co-transfecter cette construction avec CLC-7 pour déterminer si elle est en mesure s'assumer la fonction de Gl. Si oui, cela suggérerait que l'interaction Gl-CLC-7 se fait au niveau de la région luminale mais que le domaine transmembranaire de Gl est essentiel pour son ancrage. Si ce n'est pas le cas, cela confirmerait que l'interaction avec CLC-7 se fait avec la région cytoplasmique et que cette interaction pourrait par exemple venir camoufler/cacher les sites double-lysines de Gl et empêcher sa relocalisation au RE. Il semble aussi évident que Gl interagit avec des protéines au niveau luminale puisque Gl localise au RE lorsque transfectée seule et que la perte de la région C-terminale n'influence pas cette localisation. Gl serait retenue au RE en attente d'interaction avec un partenaire qui vient camoufler/déplacer les sites de rétention et/ou d'interaction luminale de Gl pour lui permettre de continuer son chemin dans la voie sécrétoire et assurer sa fonction lysosomale.

Les protéines qui arrivent au niveau du *trans*-Golgi sont triées/redirigées à la membrane plasmique ou vers les compartiments endosomaux en route vers les lysosomes. Les signaux d'ubiquitine jouent un rôle important dans cette décision (Helliwell *et al.*, 2001). Nous en revenons donc à déterminer si la mono-ubiquitinylation des sites de lysines de la région C-terminale de Gl peut jouer un rôle dans son trafic vers les lysosomes. Le mutant de lysines en leucines de Gl est déjà fait; il s'agirait donc de voir si celui-ci est en mesure de localiser aux lysosomes lorsque co-transfecté avec CLC-7 et de voir si ces sites sont bel et bien mono-ubiquitinylés en conditions normales et si il y a interaction avec la protéine UBE2N qui est une « *ubiquitin-conjugating enzyme* » (E2).

De plus l'équipe de Lange a démontré qu'une fois aux lysosomes, la protéine Gl subirait un clivage enzymatique produisant deux fragments. Ce clivage serait total puisque la protéine glycosylée mais non clivée se retrouve dans les fractions réticulaire et endosomales tandis que seules les deux formes clivées se retrouvent dans la fraction lysosomales. Ce clivage sera donc total et essentiel à la fonction de la protéine. En effet,

la protéine détectée *in vivo* (Figure 25) dans nos extraits d'OCLs correspond à deux fragments de 38kDa et 34 kDa. Ces deux fragments correspondraient aux mêmes fragments identifiés par l'équipe de Lange une fois que la protéine a atteint le compartiment lysosomal. Tout comme l'équipe de Lange, ces fragments sont absents dans les extraits de souris *gl/gl*. Ces fragments n'ont pas été détectés dans mes études de transfections transitoires mais comme le partenaire CLC-7 n'a pas été co-transfecté, la protéine est retenue au RE et ne subit pas ce clivage aux lysosomes. Le domaine C-terminal de Gl est probablement impliqué dans son transport vers les autres compartiments cellulaires. En absence de CLC-7, le site de rétention serait actif et retiendrait Gl au RE. En présence de CLC-7, ce site serait camouflé et permettrait le transport de Gl vers les endosomes et lysosomes où la protéine jouerait sa fonction de sous-unité  $\beta$  de CLC-7 et où elle subirait ce clivage enzymatique.

### **La fonction de Gl**

Comme Gl et CLC-7 sont des protéines ubiquitaires, nous pouvons en déduire que leur fonction ne se limite pas au niveau des ostéoclastes, du système nerveux central et des mélanocytes. La fonction de Gl est probablement aussi ubiquiste que sa localisation. On peut supposer qu'il existe plusieurs phénotypes non caractérisés dans d'autres tissus qui sont dus à la perte de Gl. Par contre, on peut supposer que Gl aura un rôle dans les tissus et les types cellulaires où il y a beaucoup de trafic intravésiculaire et de sécrétion. Comme les pompes vacuolaires V-ATPase sont aussi localisées aux lysosomes et qu'elles sont associées aux CLC-7, il se pourrait que Gl interagisse avec celles-ci.

L'interaction de Gl et de CLC-7 n'exclut pas la possibilité d'interactions avec d'autres partenaires. L'expression de Gl dans divers tissus peut impliquer des interactions ubiquitaires ou tissu-spécifique avec divers partenaires protéiques impliqués dans le trafic protéique, dans la sécrétion ou dont la fonction est associée aux lysosomes. L'étude de l'interaction Gl-UBE2N est donc particulièrement intéressante. Nous avons l'intention de vérifier l'ubiquitinylation de Gl sur ses lysines, son interaction avec les protéines UBE2N et CLC-7 et comment vont varier ces interactions avec les divers mutants de Gl créés :

perte des domaines transmembranaires et C-terminal cytosolique, perte du domaine C-terminal cytosolique, mutations des lysines situées dans le domaine C-terminal cytosolique en leucines, substitution des domaines transmembranaires et C-terminal cytosolique de Gl par ceux de LAMP1.

Le pronostic des patients ostéopétroriques ayant une mutation de Gl est peu encourageant. Même si ces patients subissent un transfert de moelle osseuse qui complète l'ostéopétrose, la dégénérescence neuronale ne sera pas stoppée et les patients mourront quand même. Par contre, un diagnostic précoce *in utero* des familles avec cas d'ostéopétrose infantile maligne permettrait d'identifier les fœtus porteurs d'une mutation récessive dans le gène Gl. Pour le moment, les tests diagnostiques effectués chez ces familles commencent par un séquençage du gène TCIRG1 qui représente environ 55% des cas et si aucune mutation n'est identifiée, le gène CLC-7 sera séquençé à son tour. Dans plusieurs cas (environ 35%) aucun de ces deux gènes n'est muté et pourtant l'ADN de peu de ces patients a été séquençé afin de rechercher une mutation dans le gène Gl. Notre laboratoire a mis au point un essai PCR capable de diagnostiquer rapidement les patients porteurs de mutations dans le gène Gl humain. Nous croyons qu'il serait nécessaire de faire le séquençage de tous les patients qui ne présentent aucune mutation dans les gènes TCIRG1 et CLC-7.

## CONCLUSION

La souris grey-lethal (*gl*) est un modèle idéal pour l'étude de l'ostéopétrose infantile maligne. La caractérisation du gène et de la mutation *gl* par le laboratoire a permis d'identifier une nouvelle protéine (Gl) dont la perte de fonction entraîne une ostéopétrose sévère accompagnée d'un phénotype de coloration du poil. La découverte de patients ostéopétrotiques humains avec une mutation dans le gène Gl nous a poussé à caractériser la protéine Gl dont la fonction était encore inconnue au début de mes travaux. Mon projet a donc consisté à faire la caractérisation structurale de Gl ainsi que de définir sa localisation cellulaire et d'identifier des partenaires protéiques dont la fonction est connue et qui pourraient nous éclairer sur la fonction de Gl.

Mes travaux ont permis de caractériser Gl comme une protéine transmembranaire de type I avec une séquence peptide signal clivable en N-terminal, un large domaine luminal hyper-glycosylé (10 sites de N-Glycosylations), un segment transmembranaire et un court domaine C-terminal cytosolique contenant des sites double-lysines typiques des motifs de rétention au réticulum endoplasmique des protéines transmembranaires de type I. Ces mêmes études de caractérisation m'ont permis de situer Gl au réticulum endoplasmique. Des études de transfections transitoires d'une protéine de fusion EGFP ont confirmé les résultats de caractérisation en localisant Gl au réticulum endoplasmique tout en démontrant que celle-ci était retenue dans ce compartiment. J'ai aussi pu déterminer que l'ancrage de la protéine par son domaine transmembranaire était essentiel pour la bonne localisation et la fonction de la protéine. Par contre, des études plus poussées du domaine C-terminal cytosolique et des sites double-lysines devront être effectuées afin d'en déterminer sa fonction précise dans la protéine et en relation avec ses partenaires.

Pendant mes études, une autre équipe a publié des travaux associant la fonction de Gl à celle du canal chlore 7 (Lange *et al.*, 2006). Cette étude est venue confirmer mes résultats obtenus pour la caractérisation et la localisation de la protéine Gl. Par contre, l'association de Gl avec son partenaire CLC-7 change la localisation de Gl du réticulum

endoplasmique aux lysosomes où Gl aurait comme fonction potentielle de protéger le canal chlore CLC-7 de la dégradation lysosomale. Cette association Gl-CLC-7 n'exclut toutefois pas une interaction de Gl avec d'autres partenaires protéiques puisque Gl est une protéine exprimée de façon ubiquiste et qui joue un rôle important dans le trafic protéique intracellulaire/vésiculaire et dans le transport vers les lysosomes.

L'identification de partenaires potentiels de Gl par crible double-hybrides confirmée en co-immunoprécipitation nous porte à croire que Gl pourrait avoir de nombreux partenaires, autre que CLC-7, qui pourraient être exprimés de façon ubiquiste ou tissu-spécifique. Le partenaire UBE2N qui correspond à une « *ubiquitin-conjugating enzyme* » (E2) est particulièrement intéressant puisque la mono-ubiquitylation de Gl sur ses lysines pourrait être un signal de transport vers les lysosomes. Les interactions entre Gl et/ou les mutants de Gl et la protéine UBE2N, l'ubiquitine et CLC-7 seront à étudiées dans les mois à venir. L'interaction de Gl avec les deux autres partenaires du crible double-hybrides est tout aussi plausible mais dans chacun de ces cas, des études plus poussées devront être effectuées pour confirmer les interactions et leur fonction dans la cellule.

En résumé, mes études ont permis de caractériser la protéine Gl et mes résultats sont en concordance avec ceux de Lange et al. Les domaines d'interaction dans l'association GL-CLC-7 sont encore à déterminer et seront utiles afin de définir la fonction des différents domaines de la protéine Gl.

Encore récemment, d'autres patients ostéopérotiques avec une mutation dans GL ont été diagnostiqués (Pangrazio *et al.*, 2006). L'étude de la protéine Gl est d'autant plus importante puisque la complémentation du phénotype ostéopérotique par transplantation de moelle osseuse n'assurera pas la survie des patients qui seront atteints d'une dégénérescence du système nerveux central. D'autres types de thérapies devront donc être étudiés. De nombreuses études du modèle murin *gl* et de la protéine Gl restent donc à faire afin de pouvoir traiter et/ou améliorer le pronostic de ces patients.

## Bibliographic

- Ambroszkiewicz,J., Gajewska,J., and Laskowska-Klita,T. (2002). [Serum osteocalcin and bone alkaline phosphatase in healthy children in relation to age and gender]. *Med. Wieku. Rozwoj.* 6, 257-265.
- Appenzeller,C., Andersson,H., Kappeler,F., and Hauri,H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* 1, 330-334.
- Apweiler,R., Hermjakob,H., and Sharon,N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 4-8.
- Aubin,J.E., Liu,F., Malaval,L., and Gupta,A.K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17, 77S-83S.
- Balch,W.E., McCaffery,J.M., Plutner,H., and Farquhar,M.G. (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* 76, 841-852.
- Balemans,W., Van,W.L., and Van,H.W. (2005a). A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcif. Tissue Int.* 77, 263-274.
- Balemans,W., Van,W.L., and Van,H.W. (2005b). A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcif. Tissue Int.* 77, 263-274.
- Baron,R., Saffar,J.L., and Dufлот-Vignery,A. (1977). Alveolar bone remodelling in the rat: normal status and effects of PTX and PTH on the remodelling sequence and the osteoclastic pool. *Calcif. Tissue Res.* 22 *Suppl.*, 502-504.
- Berglund,E.O., Murai,K.K., Fredette,B., Sekerkova,G., Marturano,B., Weber,L., Mugnaini,E., and Ranscht,B. (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24, 739-750.
- Blair,H.C. and Schlesinger,P.H. (1990). Purification of a stilbene sensitive chloride channel and reconstitution of chloride conductivity into phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 920-925.
- Blair,H.C., Teitelbaum,S.L., Ghiselli,R., and Gluck,S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857.
- Blin-Wakkach,C., Bernard,F., and Carle,G.F. (2004). [Osteopetrosis, from mouse to man]. *Med. Sci. (Paris)* 20, 61-67.

- Blobel,G. and Dobberstein,B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67, 835-851.
- Boyle,W.J., Simonet,W.S., and Lacey,D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Brandt,S. and Jentsch,T.J. (1995). ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett.* 377, 15-20.
- Burda,P. and Aebi,M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 239-257.
- Cha,Y., Holland,S.M., and August,J.T. (1990). The cDNA sequence of mouse LAMP-2. Evidence for two classes of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 265, 5008-5013.
- Chalhoub,N., Benachenhou,N., Rajapurohitam,V., Pata,M., Ferron,M., Frattini,A., Villa,A., and Vacher,J. (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat. Med.* 9, 399-406.
- Chalhoub,N., Benachenhou,N., and Vacher,J. (2001). Physical and transcriptional map of the mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mamm. Genome* 12, 887-892.
- Chandrasekhar,S., Kleinman,H.K., Hassell,J.R., Martin,G.R., Termine,J.D., and Trelstad,R.L. (1984). Regulation of type I collagen fibril assembly by link protein and proteoglycans. *Coll. Relat Res.* 4, 323-337.
- Chen,T.Y. (2005). Structure and function of clc channels. *Annu. Rev. Physiol* 67, 809-839.
- Chen,W., Helenius,J., Braakman,I., and Helenius,A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6229-6233.
- Chien,C.T., Bartel,P.L., Sternglanz,R., and Fields,S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 9578-9582.
- Christenson,R.H. (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin. Biochem.* 30, 573-593.
- Cleiren,E. *et al.* (2001). Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the ClCN7 chloride channel gene. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2861-2867.

Clemons, W.M., Jr., Menetret, J.F., Akey, C.W., and Rapoport, T.A. (2004). Structural insight into the protein translocation channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 390-396.

Coulombe, B., Jeronimo, C., Langelier, M.F., Cojocaru, M., and Bergeron, D. (2004). Interaction networks of the molecular machines that decode, replicate, and maintain the integrity of the human genome. *Mol. Cell Proteomics.* *3*, 851-856.

Currey, J.D. (2003). The many adaptations of bone. *J. Biomech.* *36*, 1487-1495.

Daroszewska, A. and Ralston, S.H. (2005). Genetics of Paget's disease of bone. *Clin. Sci. (Lond)* *109*, 257-263.

Denti, S., Sirri, A., Cheli, A., Rogge, L., Innamorati, G., Putignano, S., Fabbri, M., Pardi, R., and Bianchi, E. (2004). RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.* *279*, 13027-13034.

Dougall, W.C. *et al.* (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* *13*, 2412-2424.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* *89*, 747-754.

Duong, L.T. and Rodan, G.A. (1998). Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front Biosci.* *3*, d757-d768.

Egea, P.F., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 213-220.

Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 181-191.

Ewart-Toland, A. *et al.* (2003). Identification of *Stk6/STK15* as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat. Genet.* *34*, 403-412.

Fambrough, D.M., Takeyasu, K., Lippincott-Schwarz, J., and Siegel, N.R. (1988). Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and the plasma membrane, deduced from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *J. Cell Biol.* *106*, 61-67.

Fassio, A. and Sitia, R. (2002b). Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem. Cell Biol.* *117*, 151-157.

Fassio, A. and Sitia, R. (2002a). Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem. Cell Biol.* *117*, 151-157.

Fernandez,T., Morgan,T., Davis,N., Klin,A., Morris,A., Farhi,A., Lifton,R.P., and State MW (2004). Disruption of contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1286-1293.

Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fields,S. and Sternglanz,R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10, 286-292.

Fischer,T., De,V.L., Meerloo,T., and Farquhar,M.G. (2003). Promotion of G alpha i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8270-8275.

Fisher,L.W., Termine,J.D., DeJter,S.W., Jr., Whitson,S.W., Yanagishita,M., Kimura,J.H., Hascall,V.C., Kleinman,H.K., Hassell,J.R., and Nilsson,B. (1983). Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.* 258, 6588-6594.

Francis,F. *et al.* (1997). Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res.* 7, 573-585.

Franzoso,G., Carlson,L., Xing,L., Poljak,L., Shores,E.W., Brown,K.D., Leonardi,A., Tran,T., Boyce,B.F., and Siebenlist,U. (1997). Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* 11, 3482-3496.

Frattini,A. *et al.* (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.* 25, 343-346.

Frattini,A. *et al.* (2003). Chloride channel CLCN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1740-1747.

Gilmore,R., Walter,P., and Blobel,G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* 95, 470-477.

Gowen,M. *et al.* (1999). Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1654-1663.

Grigoriadis,A.E., Wang,Z.Q., Cecchini,M.G., Hofstetter,W., Felix,R., Fleisch,H.A., and Wagner,E.F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266, 443-448.

Guise,T.A. and Mundy,G.R. (1998). Cancer and bone. *Endocr. Rev.* 19, 18-54.

Halleen,J.M., Raisanen,S., Salo,J.J., Reddy,S.V., Roodman,G.D., Hentunen,T.A., Lehenkari,P.P., Kaija,H., Vihko,P., and Vaananen,H.K. (1999). Intracellular

fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* *274*, 22907-22910.

Hammond,C., Braakman,I., and Helenius,A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 913-917.

Hammond,C. and Helenius,A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* *126*, 41-52.

Hanai,J. *et al.* (1999). Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J. Biol. Chem.* *274*, 31577-31582.

Hauri,H., Appenzeller,C., Kuhn,F., and Nufer,O. (2000a). Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett.* *476*, 32-37.

Hauri,H.P., Kappeler,F., Andersson,H., and Appenzeller,C. (2000b). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 4)*, 587-596.

Hayman,A.R., Jones,S.J., Boyde,A., Foster,D., Colledge,W.H., Carlton,M.B., Evans,M.J., and Cox,T.M. (1996). Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* *122*, 3151-3162.

Hebert,D.N., Foellmer,B., and Helenius,A. (1996). Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.* *15*, 2961-2968.

Helenius,A. and Aebi,M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364-2369.

Helenius,A. and Aebi,M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 1019-1049.

Helliwell,S.B., Losko,S., and Kaiser,C.A. (2001). Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.* *153*, 649-662.

Herscovics,A. (2001). Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie* *83*, 757-762.

Hicke,L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 195-201.

Hicke,L. and Dunn,R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 141-172.

Hilt,W. and Wolf,D.H. (2004). The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1545.

Hirschberg,C.B. and Snider,M.D. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87.

Hodgkinson,C.A., Moore,K.J., Nakayama,A., Steingrimsson,E., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Arnheiter,H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.

Hollinshead,M.B., Schneider,L.C., and Smith,M.E. (1975). Prenatal development of the grey lethal mouse. I. Teeth and jaws. *Anat. Rec.* 182, 305-319.

Honing,S., Griffith,J., Geuze,H.J., and Hunziker,W. (1996). The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* 15, 5230-5239.

Honing,S. and Hunziker,W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128, 321-332.

Hsu,H. *et al.* (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3540-3545.

Huang,Q.Y. and Kung,A.W. (2006). Genetics of osteoporosis. *Mol. Genet. Metab.*

Hunziker,W. and Geuze,H.J. (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18, 379-389.

Imperiali,B. and O'Connor,S.E. (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 643-649.

Jakob,C.A., Burda,P., Roth,J., and Aebi,M. (1998). Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J. Cell Biol.* 142, 1223-1233.

Jentsch,T.J., Neagoe,I., and Scheel,O. (2005a). CLC chloride channels and transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 319-325.

Jentsch,T.J., Poet,M., Fuhrmann,J.C., and Zdebik,A.A. (2005b). Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu. Rev. Physiol* 67, 779-807.

Jeronimo,C. *et al.* (2004). RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Mol. Cell Biol.* *24*, 7043-7058.

Johnson,A.E. and van Waes,M.A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 799-842.

Kasper,D. *et al.* (2005). Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J.* *24*, 1079-1091.

Katagiri,T. and Takahashi,N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* *8*, 147-159.

Keenan,R.J., Freymann,D.M., Stroud,R.M., and Walter,P. (2001). The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 755-775.

Kingsley,D.M. (1994). What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet.* *10*, 16-21.

Kingsley,D.M. (2001). Genetic control of bone and joint formation. *Novartis. Found. Symp.* *232*, 213-222.

Klausner,R.D., Donaldson,J.G., and Lippincott-Schwartz,J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* *116*, 1071-1080.

Klausner,R.D. and Sitia,R. (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* *62*, 611-614.

Kobayashi,T., Vischer,U.M., Rosnoblet,C., Lebrand,C., Lindsay,M., Parton,R.G., Kruithof,E.K., and Gruenberg,J. (2000). The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1829-1843.

Komori,T. *et al.* (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* *89*, 755-764.

Kong,Y.Y. *et al.* (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* *397*, 315-323.

Kornak,U., Kasper,D., Bosl,M.R., Kaiser,E., Schweizer,M., Schulz,A., Friedrich,W., Delling,G., and Jentsch,T.J. (2001a). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* *104*, 205-215.

Kornak,U., Kasper,D., Bosl,M.R., Kaiser,E., Schweizer,M., Schulz,A., Friedrich,W., Delling,G., and Jentsch,T.J. (2001b). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* *104*, 205-215.

Kornak,U., Schulz,A., Friedrich,W., Uhlhaas,S., Kremens,B., Voit,T., Hasan,C., Bode,U., Jentsch,T.J., and Kubisch,C. (2000). Mutations in the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2059-2063.

Kornfeld,S. (1990). Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.* *18*, 367-374.

Kowarik,M., Kung,S., Martoglio,B., and Helenius,A. (2002). Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *10*, 769-778.

Kozak,M. (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* *308*, 241-246.

Kozak,M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* *196*, 947-950.

Kramer,S., Ozaki,T., Miyazaki,K., Kato,C., Hanamoto,T., and Nakagawara,A. (2005). Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* *24*, 938-944.

Kundra,R. and Kornfeld,S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* *274*, 31039-31046.

Kuo,S.C. and Lampen,J.O. (1974). Tunicamycin--an inhibitor of yeast glycoprotein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *58*, 287-295.

Lacey,D.L. *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* *93*, 165-176.

Lakkakorpi,P.T. and Vaananen,H.K. (1996). Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc. Res. Tech.* *33*, 171-181.

Lange,P.F., Wartosch,L., Jentsch,T.J., and Fuhrmann,J.C. (2006). ClC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* *440*, 220-223.

Lemp,D., Haselbeck,A., and Klebl,F. (1990). Molecular cloning and heterologous expression of N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* *265*, 15606-15610.

Leng,Y. and Chuang,D.M. (2006). Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J. Neurosci.* *26*, 7502-7512.

Letourneur,F., Gaynor,E.C., Hennecke,S., Demolliere,C., Duden,R., Emr,S.D., Riezman,H., and Cosson,P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* *79*, 1199-1207.

Li,Z., Kong,K., and Qi,W. (2006). Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 345-350.

Liu,Y., Choudhury,P., Cabral,C.M., and Sifers,R.N. (1999). Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* *274*, 5861-5867.

Loening,U.E. (1965). Synthesis of messenger ribonucleic acid in excised pea-seedling root segments. Separation of the messenger from microsomes by electrophoresis. *Biochem. J.* *97*, 125-133.

Lomaga,M.A. *et al.* (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* *13*, 1015-1024.

Luchin,A., Suchting,S., Merson,T., Rosol,T.J., Hume,D.A., Cassady,A.I., and Ostrowski,M.C. (2001). Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 36703-36710.

Mackie,E.J. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1301-1305.

Mackie,E.J. and Ramsey,S. (1996). Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 6)*, 1597-1604.

Maley,F., Trimble,R.B., Tarentino,A.L., and Plummer,T.H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* *180*, 195-204.

Manolagas,S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* *21*, 115-137.

Marchisio,P.C., Bergui,L., Corbascio,G.C., Cremona,O., D'Urso,N., Schena,M., Tesio,L., and Caligaris-Cappio,F. (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* *72*, 830-833.

Marcus,N.Y. and Perlmutter,D.H. (2000). Glucosidase and mannosidase inhibitors mediate increased secretion of mutant alpha1 antitrypsin Z. *J. Biol. Chem.* *275*, 1987-1992.

McHugh,K.P., Hodivala-Dilke,K., Zheng,M.H., Namba,N., Lam,J., Novack,D., Feng,X., Ross,F.P., Hynes,R.O., and Teitelbaum,S.L. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest* *105*, 433-440.

Melton,L.J., III (1995). How many women have osteoporosis now? *J. Bone Miner. Res.* *10*, 175-177.

- Michalski, J.C. and Klein, A. (1999). Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1455, 69-84.
- Miller, C. (2006). ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 440, 484-489.
- Miller, J.D. and Walter, P. (1993). A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Ciba Found. Symp.* 176, 147-159.
- Miyamoto, T., Ohneda, O., Arai, F., Iwamoto, K., Okada, S., Takagi, K., Anderson, D.M., and Suda, T. (2001). Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 98, 2544-2554.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 395-400.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., and Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J. Cell Biol.* 143, 1041-1052.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de, C.B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.
- Nesbitt, S.A. and Horton, M.A. (1997). Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276, 266-269.
- Nicola, A.V., Chen, W., and Helenius, A. (1999). Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 341-345.
- Nilsson, I.M. and von, H.G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 268, 5798-5801.
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P.A. (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58, 707-718.
- Nishi, T. and Forgacs, M. (2002). The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 94-103.

Nishikawa,A., Nanda,A., Gregory,W., Frenz,J., and Kornfeld,S. (1999). Identification of amino acids that modulate mannose phosphorylation of mouse DNase I, a secretory glycoprotein. *J. Biol. Chem.* *274*, 19309-19315.

Nishimura,N. and Balch,W.E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* *277*, 556-558.

Nishitani,H., Hirose,E., Uchimura,Y., Nakamura,M., Umeda,M., Nishii,K., Mori,N., and Nishimoto,T. (2001). Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* *272*, 25-33.

Ogawa,J., Kaneko,H., Masuda,T., Nagata,S., Hosoya,H., and Watanabe,K. (1996). Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci. Lett.* *218*, 173-176.

Olden,K., Pratt,R.M., Jaworski,C., and Yamada,K.M. (1979). Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: specific inhibition by tunicamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 791-795.

Ozenberger,B.A. and Young,K.H. (1995). Functional interaction of ligands and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast. *Mol. Endocrinol.* *9*, 1321-1329.

Palade,G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* *189*, 347-358.

Pangrazio,A. *et al.* (2006). Mutations in OSTM1 (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive osteopetrosis with neural involvement. *J. Bone Miner. Res.* *21*, 1098-1105.

Parfitt,A.M. (1983). Recent developments in bone physiology. *Henry. Ford. Hosp. Med. J.* *31*, 209-210.

Parfitt,A.M., Mundy,G.R., Roodman,G.D., Hughes,D.E., and Boyce,B.F. (1996). A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 150-159.

Pickart,C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 503-533.

Pieren,M., Galli,C., Denzel,A., and Molinari,M. (2005). The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins. *J. Biol. Chem.* *280*, 28265-28271.

Ponting,C., Schultz,J., and Bork,P. (1997). SPRY domains in ryanodine receptors (Ca(2+)-release channels). *Trends Biochem. Sci.* *22*, 193-194.

Pusch,M. (2004). Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels. *Biochemistry* 43, 1135-1144.

Quarello,P., Forni,M., Barberis,L., Defilippi,C., Campagnoli,M.F., Silvestro,L., Frattini,A., Chalhoub,N., Vacher,J., and Ramenghi,U. (2004). Severe malignant osteopetrosis caused by a GL gene mutation. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1194-1199.

Rajapurohitam,V., Chalhoub,N., Benachenhou,N., Neff,L., Baron,R., and Vacher,J. (2001). The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function. *Bone* 28, 513-523.

Ramirez,A., Faupel,J., Goebel,I., Stiller,A., Beyer,S., Stockle,C., Hasan,C., Bode,U., Kornak,U., and Kubisch,C. (2004). Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in human malignant infantile osteopetrosis. *Hum. Mutat.* 23, 471-476.

Reddy,S.V. (2006). Etiologic factors in Paget's disease of bone. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 391-398.

Rigaut,G., Shevchenko,A., Rutz,B., Wilm,M., Mann,M., and Seraphin,B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17, 1030-1032.

Roberts,D.L., Weix,D.J., Dahms,N.M., and Kim,J.J. (1998). Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 93, 639-648.

Rodan,G.A. (2003). The development and function of the skeleton and bone metastases. *Cancer* 97, 726-732.

Rothman,J.E. and Orci,L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355, 409-415.

Rowe,P.S. (2000). The molecular background to hypophosphataemic rickets. *Arch. Dis. Child* 83, 192-194.

Rowe,P.S., de Zoysa,P.A., Dong,R., Wang,H.R., White,K.E., Econs,M.J., and Oudet,C.L. (2000). MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67, 54-68.

Salo,J., Lehenkari,P., Mulari,M., Metsikko,K., and Vaananen,H.K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 276, 270-273.

Scheel,A.A. and Pelham,H.R. (1996). Purification and characterization of the human KDEL receptor. *Biochemistry* 35, 10203-10209.

Scheel,A.A. and Pelham,H.R. (1998). Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 2467-2472.

Schmitt,J.M., Hwang,K., Winn,S.R., and Hollinger,J.O. (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J. Orthop. Res.* *17*, 269-278.

Schutze,M.P., Peterson,P.A., and Jackson,M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* *13*, 1696-1705.

Scimeca,J.C., Franchi,A., Trojani,C., Parrinello,H., Grosgeorge,J., Robert,C., Jaillon,O., Poirier,C., Gaudray,P., and Carle,G.F. (2000). The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone* *26*, 207-213.

Seifert,M.F. and Marks,S.C., Jr. (1985). Morphological evidence of reduced bone resorption in the osteosclerotic (oc) mouse. *Am. J. Anat.* *172*, 141-153.

Servet-Delprat,C. *et al.* (2002). Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC. Immunol.* *3*, 15.

Sha,W.C., Liou,H.C., Tuomanen,E.I., and Baltimore,D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321-330.

Shikano,S. and Li,M. (2003). Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 5783-5788.

Simonet,W.S. *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* *89*, 309-319.

Snapper,C.M., Zelazowski,P., Rosas,F.R., Kehry,M.R., Tian,M., Baltimore,D., and Sha,W.C. (1996). B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.* *156*, 183-191.

Sobacchi,C. *et al.* (2001). The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1767-1773.

Steward,C.G. (2003). Neurological aspects of osteopetrosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *29*, 87-97.

Suda,T., Jimi,E., Nakamura,I., and Takahashi,N. (1997). Role of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast differentiation and function. *Methods Enzymol.* *282*, 223-235.

Suda,T., Takahashi,N., and Martin,T.J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* *13*, 66-80.

Suzuki,T. and Lennarz,W.J. (2003). Hypothesis: a glycoprotein-degradation complex formed by protein-protein interaction involves cytoplasmic peptide:N-glycanase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 1-5.

Takahashi,N., Akatsu,T., Udagawa,N., Sasaki,T., Yamaguchi,A., Moseley,J.M., Martin,T.J., and Suda,T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602.

Takahashi,N., Udagawa,N., Akatsu,T., Tanaka,H., Isogai,Y., and Suda,T. (1991). Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. *Endocrinology* 128, 1792-1796.

Takami,M., Takahashi,N., Udagawa,N., Miyaura,C., Suda,K., Woo,J.T., Martin,T.J., Nagai,K., and Suda,T. (2000). Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* 141, 4711-4719.

Takami,M., Woo,J.T., Takahashi,N., Suda,T., and Nagai,K. (1997). Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors and Ca<sup>2+</sup>-ionophore induce osteoclast-like cell formation in the cocultures of mouse bone marrow cells and calvarial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 111-115.

Takaoka,K. (1985). [Process of bone induction--bone induction factors]. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 59, 327-337.

Tanaka,Y., Guhde,G., Suter,A., Eskelinen,E.L., Hartmann,D., Lullmann-Rauch,R., Janssen,P.M., Blanz,J., von,F.K., and Saftig,P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-906.

Teitelbaum,S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.

Termine,J.D., Kleinman,H.K., Whitson,S.W., Conn,K.M., McGarvey,M.L., and Martin,G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26, 99-105.

Tiegs,R.D., Lohse,C.M., Wollan,P.C., and Melton,L.J. (2000). Long-term trends in the incidence of Paget's disease of bone. *Bone* 27, 423-427.

Togashi,H., Schmidt,E.F., and Strittmatter,S.M. (2006). RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *J. Neurosci.* 26, 4961-4969.

Tondravi,M.M., McKercher,S.R., Anderson,K., Erdmann,J.M., Quiroz,M., Maki,R., and Teitelbaum,S.L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386, 81-84.

Trombetta,E.S., Simons,J.F., and Helenius,A. (1996). Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 27509-27516.

- Tsai,B., Ye,Y., and Rapoport,T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 246-255.
- Tsuchihashi,H. and Nagatomo,T. (1985). Binding characteristics of 3H-dihydroalprenolol to beta-adrenergic receptors of rat brain: influence of exo- and endo-glycosidases and glycopeptidase. *Jpn. J. Pharmacol.* 38, 403-409.
- Vaananen,H.K. (1993). Mechanism of bone turnover. *Ann. Med.* 25, 353-359.
- Vaananen,H.K. and Horton,M. (1995a). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 8), 2729-2732.
- Vaananen,H.K. and Horton,M. (1995b). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 8), 2729-2732.
- Vaananen,H.K., Karhukorpi,E.K., Sundquist,K., Wallmark,B., Roininen,I., Hentunen,T., Tuukkanen,J., and Lakkakorpi,P. (1990). Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 111, 1305-1311.
- Vaananen,H.K., Zhao,H., Mulari,M., and Halleen,J.M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 3), 377-381.
- Vaananen,K. (2005). Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 959-971.
- Vacher,J. and Bernard,H. (1999). Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey-lethal mutation. *Mamm. Genome* 10, 239-243.
- Van,A.L., Hohmann,S., Bulaya,B., de,K.W., Sierkstra,L., Neves,M.J., Luyten,K., Alijo,R., Ramos,J., and Coccetti,P. (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 8, 927-943.
- van,A.E. and Braakman,I. (2005). Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 191-228.
- Vawter,M.P., Crook,J.M., Hyde,T.M., Kleinman,J.E., Weinberger,D.R., Becker,K.G., and Freed,W.J. (2002). Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr. Res.* 58, 11-20.
- Vickers,E.R. and Sharrocks,A.D. (2002). The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors. *Methods* 26, 270-280.
- Wada,S., Udagawa,N., Akatsu,T., Nagata,N., Martin,T.J., and Findlay,D.M. (1997). Regulation by calcitonin and glucocorticoids of calcitonin receptor gene expression in mouse osteoclasts. *Endocrinology* 138, 521-529.

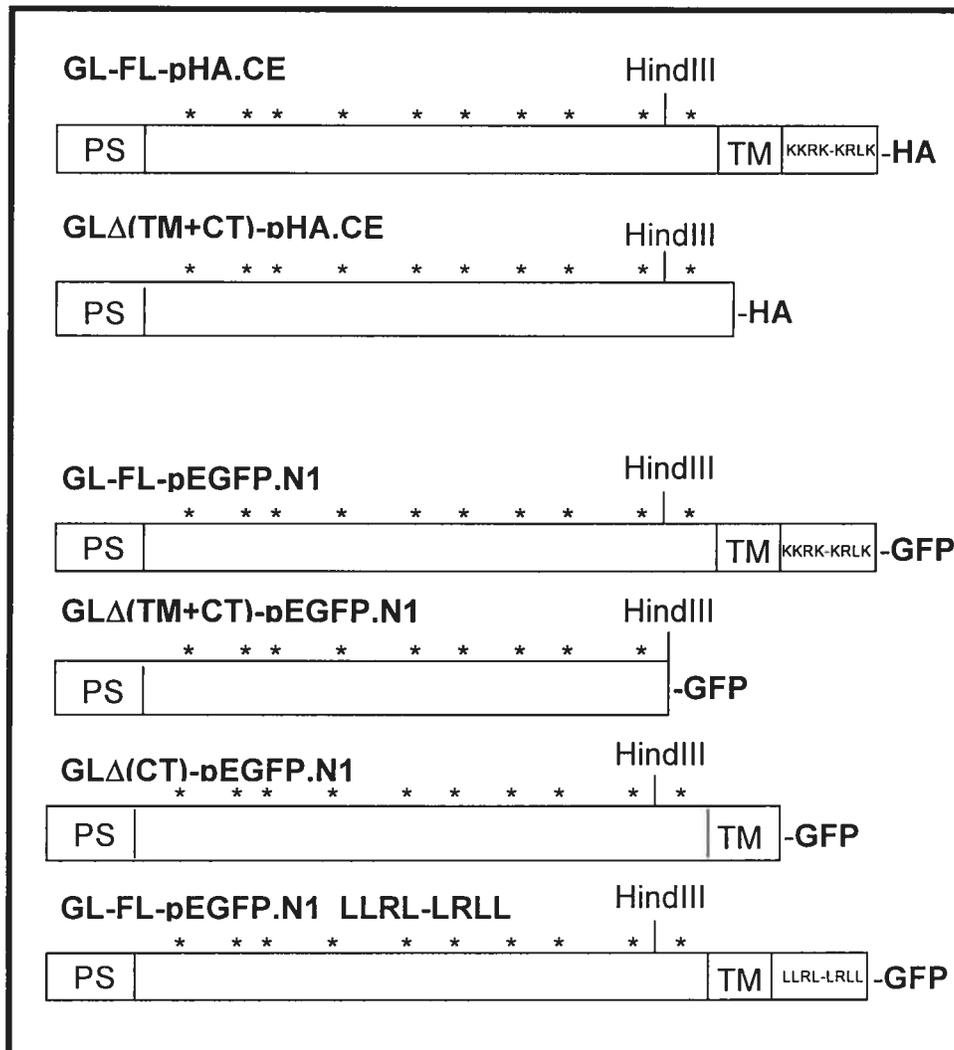
- Wagner,E.F. and Karsenty,G. (2001). Genetic control of skeletal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 527-532.
- Walker,D.G. (1975a). Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* *190*, 784-785.
- Walker,D.G. (1975b). Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *J. Exp. Med.* *142*, 651-663.
- Walker,D.G. (1975c). Spleen cells transmit osteopetrosis in mice. *Science* *190*, 785-787.
- Walter,P. and Johnson,A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* *10*, 87-119.
- Wang,D., Li,Z., Messing,E.M., and Wu,G. (2002). Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J. Biol. Chem.* *277*, 36216-36222.
- Weis,W.I. and Drickamer,K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 441-473.
- Weissman,A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 169-178.
- Wilson,D.W., Lewis,M.J., and Pelham,H.R. (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* *268*, 7465-7468.
- Winchester,B. (2005). Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* *15*, 1R-15R.
- Wu,Y., Sun,X., Kaczmarek,E., Dwyer,K.M., Bianchi,E., Usheva,A., and Robson,S.C. (2006). RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem. J.* *396*, 23-30.
- Wu,Y., Swulius,M.T., Moremen,K.W., and Sifers,R.N. (2003). Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 8229-8234.
- Yamaguchi,A., Komori,T., and Suda,T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* *21*, 393-411.
- Yasuda,H. *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 3597-3602.

Yoshida,H., Hayashi,S., Kunisada,T., Ogawa,M., Nishikawa,S., Okamura,H., Sudo,T., Shultz,L.D., and Nishikawa,S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-444.

Yoshida,Y. (2003). A novel role for N-glycans in the ERAD system. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 183-190.

Yoshihara,Y., Kawasaki,M., Tamada,A., Nagata,S., Kagamiyama,H., and Mori,K. (1995). Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. Neurobiol.* 28, 51-69.

## ANNEXE



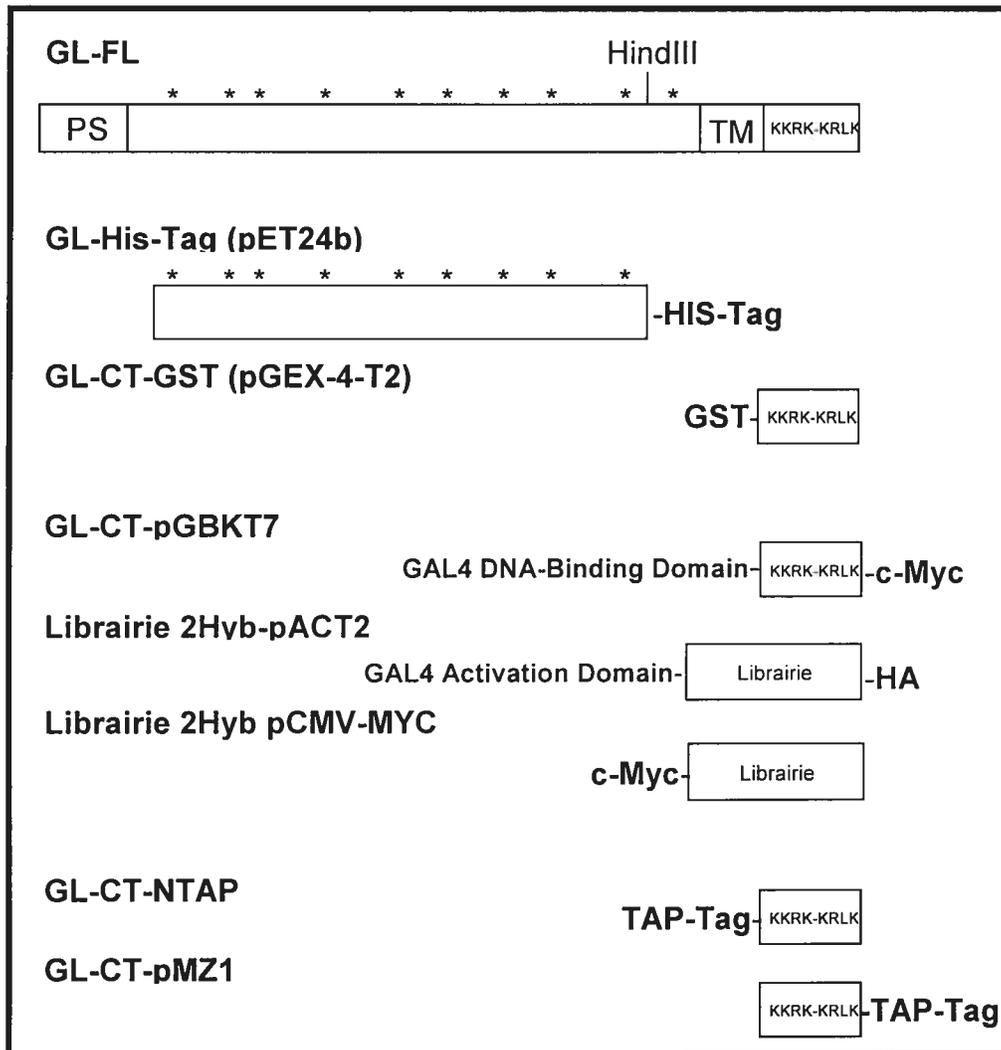
**Figure supplémentaire S1 : Constructions pour les études de caractérisation et localisation de la protéine**

Les différentes constructions utilisées pour les études de caractérisation de la protéine (vecteur pHA.CE) et pour les études de localisation de la protéine (vecteur pEGFP.N1).

PS : Peptide Signal

TM : domaine TransMembranaire

\* : sites de N-Glycosylation



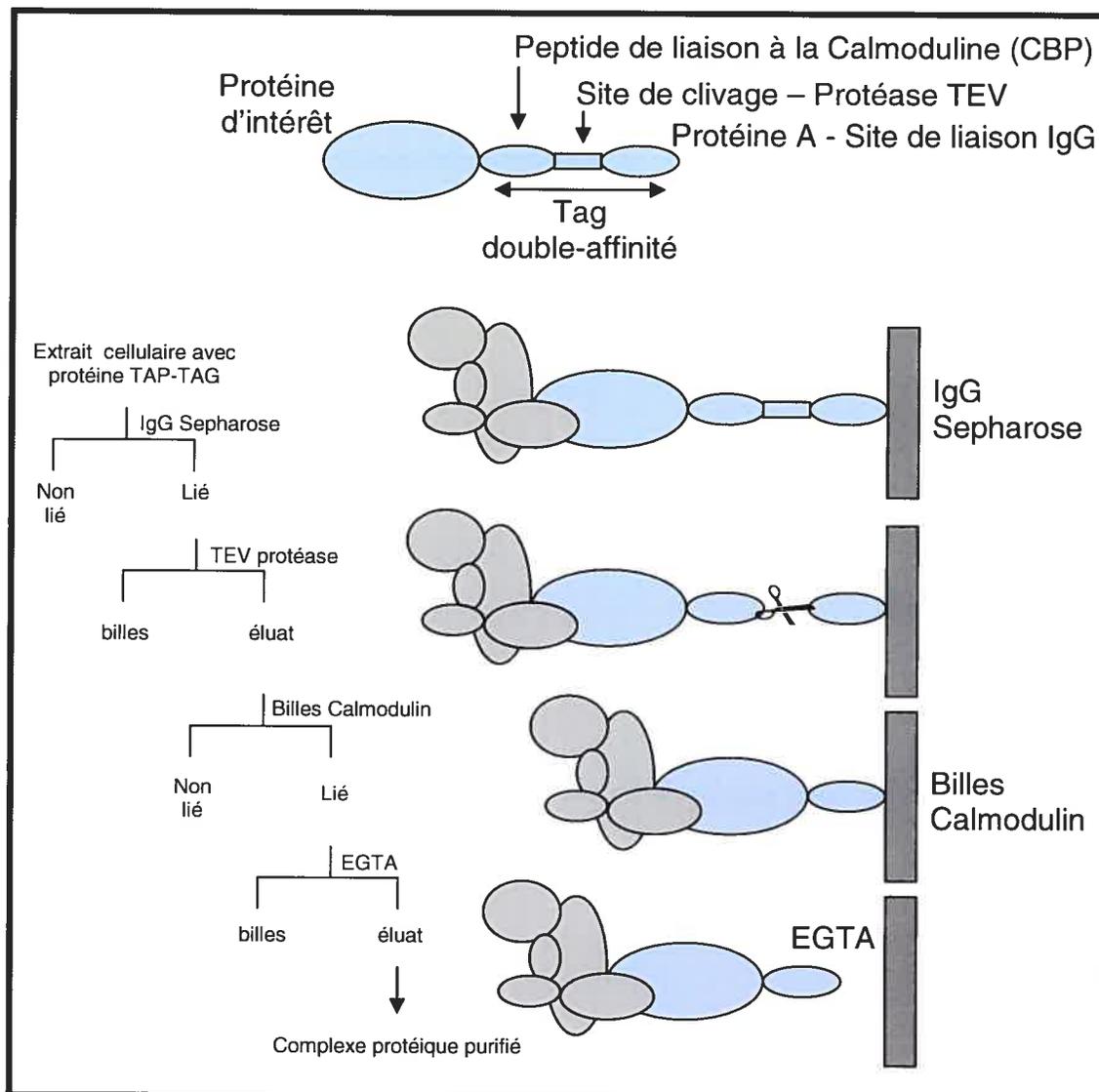
**Figure supplémentaire S2 : Constructions pour les anticorps, le double-hybrides et le TAP-Tag**

Les différentes constructions utilisées pour la production d'anticorps (vecteurs pET24b et pGEX-4-T2), le double-hybrides (vecteurs pGBKT7, pACT2 et pCMV-MYC) et le TAP-Tag (vecteurs NTAP et pMZ1).

PS : Peptide Signal

TM : domaine TransMembranaire

\* : sites de N-Glycosylation



### Figure supplémentaire S3 : Procédure de la purification TAP

Un extrait cellulaire contenant la protéine d'intérêt TAP-Tag exprimée/induite est incubé avec des billes IgG Sepharose. La portion Protéine A du Tag lie les billes IgG et les protéines non liées sont lavées en condition douce. Les protéines liées sont éluées par clivage à l'aide de la protéase TEV. L'éluat est incubé avec des billes Calmodulin qui lient le domaine CBP. Les protéines non liées sont lavées en condition douce et l'EGTA est utilisé pour éluer les protéines liées. Adapté de (Coulombe *et al.*, 2004)

