

Université de Montréal

**Comparaison de l'ubiquitylation de différentes protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose suite à leur interaction avec la ligase de l'ubiquitine Itch**

par

Guillaume Desrochers

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

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

Mars, 2010

© Guillaume Desrochers, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**Comparaison de l'ubiquitylation de différentes protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose suite à leur interaction avec la ligase de l'ubiquitine Itch**

Présenté par :  
Guillaume Desrochers

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Pflieger, président-rapporteur  
Annie Angers, directrice de recherche  
Michel Anctil, membre du jury

## RÉSUMÉ

Itch est la seule ligase de l'ubiquitine de type C2-WW-HECT capable d'interagir avec les protéines à domaine SH3. Ce domaine est particulièrement représenté parmi les protéines régulatrices de l'endocytose. Les travaux présentés ici visaient à examiner la capacité d'Itch à interagir avec plusieurs protéines endocytiques. Nous avons utilisé la technique du BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) pour examiner quelques protéines candidates. Nous avons ensuite confirmé les résultats obtenus par BRET avec des tests d'interaction *in vitro*, puis déterminé la capacité d'Itch à ubiquityler les protéines liées via leurs domaines SH3. Nous avons ainsi découvert deux nouveaux partenaires d'interaction et substrats d'Itch parmi les protéines endocytiques, amphiphysine et pacsine. De plus, Itch interagit avec les domaines SH3 isolés d'intersectine, mais pas avec la protéine complète, suggérant que cette dernière n'est pas un substrat d'Itch. Itch est donc bien positionnée pour exercer un rôle régulateur de l'endocytose en ubiquitylant ses substrats.

**Mots Clés :** Itch, endophiline, pacsine, intersectine, amphiphysine, BRET, ubiquitine, endocytose.

## ABSTRACT

Itch is the only C2-WW-HECT type ubiquitin ligase that can bind SH3 domain proteins. This domain is particularly frequent in accessory endocytic proteins. We have used Bioluminescent Resonance Energy Transfer to examine a few candidate endocytic proteins, in addition to the already known substrate of Itch, endophilin. We then used standard *in vitro* techniques to confirm these interactions, and tested Itch capacity to ubiquitylate these putative substrate proteins. We thus discovered two new substrates of Itch, amphiphysin and pacsin. We also determined that although Itch interacts with the isolated SH3 domains of intersectin, it does not recognize the full length protein, thus rulling out Intersectin as a substrate of Itch. Itch is thus a putatively important regulator of endocytosis, through its capacity to recognize and ubiquitylate several SH3-domain proteins.

**Keywords :** Itch, endophilin, pacsin, intersectin, amphiphysin, BRET, ubiquitin, endocytosis.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1. LA RÉACTION D'UBIQUITYLATION : .....	1
1.1.1. <i>Principes généraux</i> .....	1
1.1.2. <i>Les enzymes d'ubiquitylation</i> .....	3
1.2. LA LIGASE ITCH : .....	5
1.2.1. <i>Architecture de la protéine</i> .....	5
1.2.2. <i>Quelques substrats d'Itch</i> .....	7
1.2.3. <i>Régulation de l'activité ligase d'Itch</i> .....	8
1.3. L'ENDOCYTOSE : .....	10
1.3.1. <i>Principes généraux</i> .....	10
1.3.2. <i>Les récepteurs à l'EGF</i> .....	11
1.3.3. <i>Le rôle de Cbl dans l'internalisation</i> .....	12
1.3.4. <i>L'endophiline et ses rôles multiples</i> .....	14
1.3.5. <i>L'assemblage du manteau de clathrine et les protéines accessoires</i> .....	15
1.4. PROTÉINES À DOMAINES SH3 .....	25
1.4.1. <i>Rôle des SH3 dans l'endocytose</i> .....	25
1.4.2. <i>Caractéristiques des domaines SH3</i> .....	28
1.5. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....	29
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>32</b>
2.1. BRET .....	32
2.2. PLASMIDES ET TRANSFECTION CELLULAIRE.....	34
2.3. ANTICORPS.....	35
2.4. IMMUNOPRÉCIPITATION ET CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ .....	35
2.5. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE FAR WESTERN .....	36
<b>3. RÉSULTATS</b> .....	<b>38</b>
3.1. IDENTIFICATION DES PROTÉINES À DOMAINES SH3 IMPLIQUÉES DANS L'ENDOCYTOSE ET INTERAGISSANT AVEC ITCH .....	38
3.2. CONFIRMATION DE L'INTERACTION DIRECTE ENTRE ITCH ET LES DIFFÉRENTES PROTÉINES À DOMAINES SH3 PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE FAR-WESTERN.....	43

3.3. IDENTIFICATION DES DOMAINES DE LA LIGASE ITCH IMPLIQUÉS DANS L'INTERACTION AVEC LES PROTÉINES SH3 .....	45
3.4. IDENTIFICATION D'INTERACTIONS ENTRE LA LIGASE ITCH ET DIFFÉRENTES PROTÉINES SH3 PROVENANT D'EXTRAITS DE CERVEAU DE RAT PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ .....	48
3.5. LA LIGASE ITCH EST RESPONSABLE DE L'UBIQUITYLATION DES PROTÉINES SH3 INTERAGISSANT AVEC ELLE .....	50
3.6. IDENTIFICATION DES DOMAINES UBIQUITYLÉS PAR LA LIGASE ITCH.....	53
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>56</b>
4.1. ITCH INTERAGIT AVEC ENDOPHILINE, CIN85 ET B-PIX VIA LEUR DOMAINE SH3 .....	56
4.2. D'AUTRES INTERACTIONS ITCH-SH3 SONT ELLES POSSIBLES AU SEIN DE L'ENDOCYTOSE? .....	57
4.3. PRÉDICTIONS THÉORIQUES .....	57
4.4. CONFIRMATION DE L'INTERACTION ENTRE ITCH ET ENDOPHILINE IN VIVO PAR BRET ...	60
4.5. UTILISATION DU BRET DANS LA DÉCOUVERTE ET LA CONFIRMATION DE NOUVELLES INTERACTIONS .....	61
4.6. DIFFÉRENTS SH3 IMPLIQUENT DIFFÉRENTES CAPACITÉS D'INTERACTIONS?.....	62
4.7. RÔLE D'ITCH DANS L'ENDOCYTOSE ET LA SIGNALISATION VIA L'UBIQUITYLATION DE PROTÉINES SH3.....	64
4.8. UBIQUITYLATION SUR LE SH3 D'ENDOPHILINE ET DE L'AMPHISINE.....	66
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>68</b>
<b>6. RÉFÉRENCES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 1. ....</b>	<b>XVIII</b>
<b>ANNEXE 2. ....</b>	<b>XXXI</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Représentation de la réaction d'ubiquitylation. Cette dernière est initiée suite à l'activation et au transport de l'ubiquitine respectivement par les enzymes E1 et E2. L'enzyme E3 permet ensuite le transfert de l'ubiquitine sur un substrat spécifique soit en formant un complexe permettant de rapprocher E2 du substrat ou encore en catalysant directement le transfert de l'ubiquitine sur celui-ci. Cette modification peut mener à l'endocytose et au trafic intracellulaire ainsi qu'à la dégradation protéique (D'après Ohta et Fukuda, 2004). ..... 2
- Figure 2.** Schéma de la protéine Itch avec à son extrémité N-terminale un domaine C2 suivi d'une région riche en proline (PRD), de 4 domaines tryptophanes (WW) et d'un domaine catalytique HECT. .... 6
- Figure 3.** Modèle d'internalisation du récepteur à l'EGF montrant le recrutement du complexe protéique Cbl-CIN85-Endophiline et l'ubiquitylation du récepteur suite à son activation. Ces derniers seront alors internalisés vers les endosomes, où réside Itch, puis recyclés vers la membrane ou alors détruits par les lysosomes. La signalisation induite par l'EGF permet l'activation de la kinase JNK responsable de la phosphorylation et l'activation d'Itch menant à la dégradation de l'endophiline et de Cbl. .... 9
- Figure 4.** L'activation des récepteurs par leur ligand permet leur homo- ou hétérodimérisation et leur signalisation via l'activation de différentes protéines. On distingue ici son effet sur la voie de l'AKT et celle de JAK/STAT menant à la survie cellulaire. L'activation des kinases de type MAPK mène quant à elle à la prolifération des cellules (D'après Ladanyi et Pao, 2008). ..... 12
- Figure 5.** Les interactions protéiques à la base de l'endocytose. A) Structure de la clathrine formant des triskèles en associant des chaînes légères avec des chaînes lourdes. Ces dernières interagissent avec plusieurs protéines nécessaires à l'internalisation. B) La protéine AP-2 se présente sous la forme d'un complexe entre l' $\alpha$  et la  $\beta$ 2-adaptine avec au centre les sous-unités  $\mu$ 2 et  $\sigma$ 2. Cette conformation permet l'interaction avec la clathrine ainsi qu'avec les protéines régulant l'endocytose (D'après Benmerah et Lamaze, 2002). ..... 16
- Figure 6.** L'endocytose dépendante de la clathrine nécessite la participation de plusieurs protéines afin de recruter les cargos à internaliser ainsi que les protéines permettant l'assemblage du manteau sur les vésicules en formation (D'après Sorkin, 2000). ..... 17
- Figure 7.** Structure de plusieurs protéines importantes dans l'endocytose par vésicule de clathrine. On constate que les motifs NPF, les domaines PRD ainsi que les domaines SH3 sont des domaines d'interactions très présents au sein des protéines formant le complexe protéique nécessaire à l'internalisation. Ces

- différents domaines permettent aux protéines de s'associer entre elles pour effectuer leurs fonctions (D'après Benmerah et Lamaze, 2002). ..... 26
- Figure 8. Vérification de l'interaction entre Itch et différentes protéines à domaine SH3 par BRET.** Des cellules HEK-293T sont transfectées avec des quantités constantes de rLuc-Itch et différentes concentrations pour les protéines marquées à la GFP. (A) Ceci permet de confirmer et de comparer l'interaction entre Itch et endophiline ou pacsine par l'obtention de courbes saturables typiques d'une interaction spécifique. (B) L'interaction entre le domaine SH3 isolé ou l'endophiline complète montre un comportement similaire. (C) Itch interagit avec différents domaines SH3 de façon différentielle avec des niveaux plus élevés pour le domaine SH3 de l'endophiline. (D) La superposition des différentes données obtenues. .... 42
- Figure 9. Itch interagit de façon directe avec l'endophiline, l'amphiphysine et pacsine.** Un immunomarquage de type Far-Western a été effectué avec les protéines de fusion GST et GST-Itch PRD sur des extraits de cellules HEK293T non transfectées (CL) ou transfectées avec GFP, GFP-endophiline, GFP-pacsine, GFP-intersectine ou pcDNA3-amphiphysine. Les extraits réalisés en triplicats ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. La première série fut directement marquée (IB) avec l'anticorps anti-GFP (panneau du haut) ou anti-amphiphysine (panneau du bas) pour montrer l'expression des différentes protéines (Blot). Les autres membranes furent incubées préalablement avec 50 pmol/ml de protéine de fusion GST-Itch PRD ou GST avant d'être marquées avec l'anticorps contre GST afin de montrer la liaison des protéines de fusion. Les pistes des extraits non transfectés servent ici de contrôle pour montrer la spécificité de la liaison. .... 44
- Figure 10. Itch interagit avec les différentes protéines à domaines SH3 via son domaine PRD.** Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide des anticorps anti-amphiphysine ou anti-GFP. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Les autres pistes représentent les protéines de ces mêmes extraits s'étant liées suite à leur incubation avec des billes de glutathionésépharose couplées aux protéines de fusion GST, GST-Itch PRD, GST-Itch WW ou GST-Itch WT. .... 46
- Figure 11.** La ligase Itch est en mesure de lier les différentes protéines à domaines SH3 exprimées de façon endogène dans le cerveau de rats. Des extraits de cerveaux présentant des niveaux variables d'expression des protéines endogènes (sm) ont été incubés avec des billes de glutathion-sépharose liées aux protéines de fusion GST ou GST-Itch afin de vérifier leur liaison. La fraction des protéines liées aux billes (B) montre leur interaction avec les protéines de fusion GST-Itch alors que les protéines non récupérées par les



billes sont représentées dans une autre piste (V). Les différentes protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis détectées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques. .... 49

**Figure 12. La ligase Itch est responsable de l'ubiquitylation de plusieurs protéines à domaine SH3.** Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide d'anticorps spécifiques. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Le panneau du centre (anti-GFP) montre la récupération de ces protéines par des billes de glutathion-sépharose couplées à GST-Itch PRD. Le marquage anti HA montre finalement l'ubiquitylation de l'endophiline (A) et de pacsine (B) en présence de la ligase. (C) Des extraits cellulaires surexprimant l'amphiphysine ont été immunoprécipités puis séparés sur gel SDS-PAGE et marqués à l'aide d'anticorps contre cette protéine (1874) (panneau de gauche) pour en montrer la récupération. Le panneau de droite représente l'ubiquitylation des protéines récupérées à l'aide de billes de protéine-A-sépharose couplées à 1874 et marquées sur la membrane à l'aide d'anti-myc. .... 53

**Figure 13. La ligase Itch ubiquityle l'endophiline et l'amphiphysine sur leur domaine SH3.** Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide d'anticorps spécifiques. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Le panneau du centre (anti-GFP) montre la récupération de ces protéines par des billes de glutathion-sépharose couplées à GST-Itch PRD. Le marquage anti HA montre finalement l'ubiquitylation de l'amphiphysine SH3 (A) et de l'endophiline SH3 (B) en présence de la ligase. .... 54

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU I.</b> Probabilités de liaisons de séquences du PRD d'Itch prédites par SH3 Hunter .....	59
---	----

**LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE 1.</b> The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid .....	xviii
<b>ANNEXE 2.</b> Utilisation du BRET pour évaluer l'interaction entre la ligase de l'ubiquitine Itch et LITAF .....	xxxi

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Aip4	Atrophin-1 interacting protein 4
ANTH	AP180 N-terminal homology
AP180	Adaptor protein 180
AP2	Adaptor protein 2
Arp2/3	Actin related protein 2/3
ATP	Adénosine triphosphate
B	Beads (protéines d'un extrait liées aux billes)
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs-homology
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
c-FLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
CALM	Clathrin assembly myeloid leukemia protein
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
Cdc42	Cell division control protein 42
CIN85	Cbl-interacting protein of 85 kDa
CL	Cell lysate
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DH	Dbl homology
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EH	Eps15 homology
ENTH	Epsin N-terminal homology
Eps15	Epidermal growth factor receptor substrate 15
Epsin	Eps15 interacting protein
GEF	Guanine exchange factor

GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transférase
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hemagglutinine
HECT	Homologous to E6-associated protein
HEK293T	Human embryonic kidney 293T cells
Hip1	Huntingtin-interacting protein 1
IB	Immunoblot
IP	Immunoprecipitation
JAK	Janus protein tyrosine kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mSOS	Mammalian son-of-sevenless
Nedd4	Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
NPF	Asparagine-proline-phenylalanine motif
PBS	Phosphate-buffered saline
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphoinositides 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol biphosphate
PLC- $\gamma$	Phospholipase-C $\gamma$
PPII	Polyproline type II
PR	Proline rich
PRD	Proline rich domain

RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RING	Really interesting new gene
rLuc	Renilla luciférase
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH3	Src-homology 3
SM	Standard material (voir CL)
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
Src	Sarcome kinase
STAT	Signal transducers and activators of transcription
t-Bid	Truncated C-terminal Bid
Tfn	Transferrine
Th2	T helper 2 cells
TKB	Tyrosine kinase binding
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
V	Void (protéines non fixées d'un extrait après incubation avec des billes)
WT	Wild type
WW	Domaine tryptophanes
$\beta$ -PIX	$\beta$ -p21-activated kinase-interactive exchange factor

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de maîtrise, Annie Angers, pour son apport incroyable tant au niveau des idées et de l'élaboration du projet que sur le plan technique. Merci de m'avoir permis de vivre une telle expérience et de m'avoir soutenu, peu importe les obstacles rencontrés.

Je remercie mes collègues passés et présents; Bilal Azakir, Raymond Wong et Rachel Forget. Sans votre aide et votre support, ce projet n'aurait jamais pu être réalisé. Merci aussi à tous les stagiaires ayant participé à ce projet de même qu'à mes collègues du département avec qui j'ai partagé tant de bons moments: Maxime Lemieux, Alexe Vigneault-Pinard, Syndia Champagne, Ha-Loan Phan, Abdellatif Nemri, Narcis Ghisovan et Serguei Marshanski.

Merci aussi au Dr Bouvier pour m'avoir permis de réaliser les expériences de BRET de même qu'aux membres de son laboratoire pour m'avoir si chaleureusement accueilli. Merci particulièrement à Elena Shirokova pour son aide lors du clonage d'Itch et à Billy Breton pour ses nombreux conseils sur le BRET et son support technique indispensable.

Finalement, je tiens à remercier mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études.

## **1. Introduction**

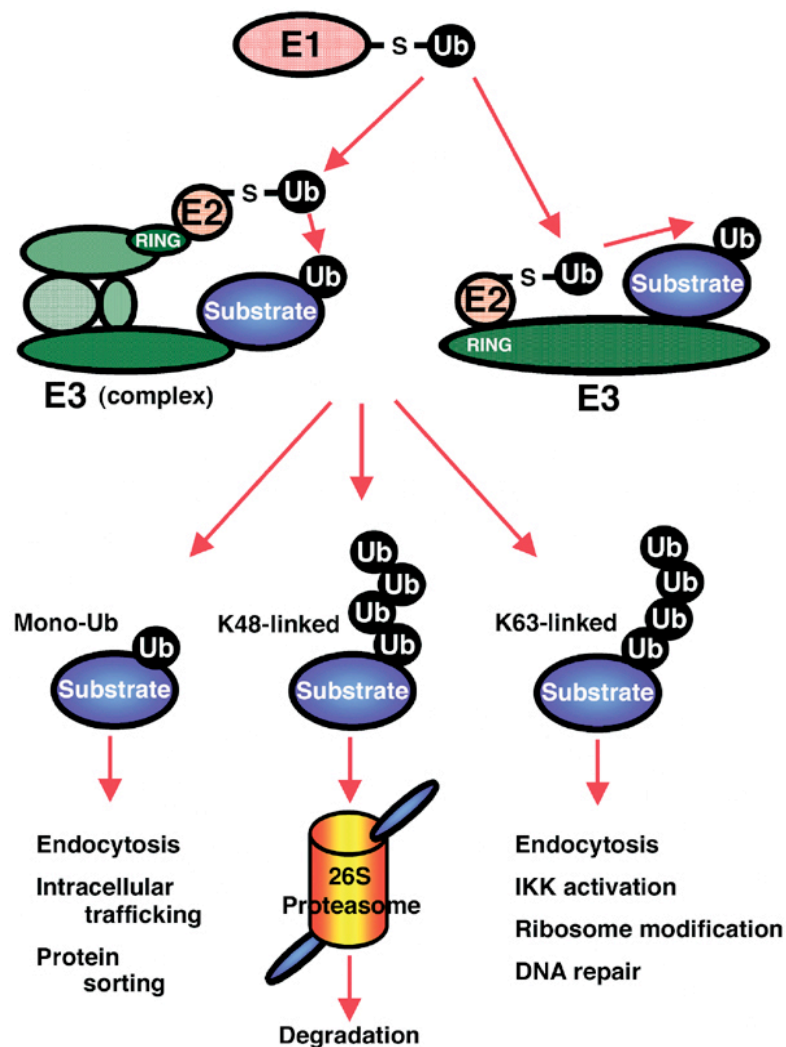
Ce projet de recherche vise à mieux comprendre les interactions entre la ligase Itch et certaines protéines impliquées dans l'endocytose, soit l'invagination d'une partie de la membrane plasmique et l'internalisation des protéines membranaires et leur cheminement à travers les compartiments intracellulaires. Ce phénomène dépend de la formation d'un complexe protéique reposant sur la capacité des différents acteurs à interagir entre eux et avec d'autres protéines permettant leur régulation et entraînant un contrôle très précis de l'internalisation des protéines. Nos travaux portent donc sur la relation entre la ligase de l'ubiquitine Itch et certaines des protéines formant le complexe nécessaire à l'endocytose. De par sa nature, la ligase pourrait ainsi être en mesure de modifier ses substrats en les ubiquitylant, ce qui lui permettrait de réguler indirectement l'endocytose.

### **1.1. La réaction d'ubiquitylation :**

#### **1.1.1. Principes généraux**

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur un substrat. Cette protéine de 76 acides aminés est généralement ajoutée sur une protéine substrat via la création d'un lien peptidique entre la glycine en C-terminal de l'ubiquitine et l'amine de la chaîne latérale d'une lysine du substrat. Cette modification est comparable à la phosphorylation, en ce sens qu'elle peut moduler une multitude de fonctions cellulaires. L'ubiquitylation est un phénomène réversible et il existe des enzymes capables d'enlever l'ubiquitine d'un substrat. De plus, on distingue plusieurs types d'ubiquitylation: la polyubiquitylation, la multi-





**Figure 1.** Représentation de la réaction d'ubiquitylation. Cette dernière est initiée suite à l'activation et au transport de l'ubiquitine respectivement par les enzymes E1 et E2. L'enzyme E3 permet ensuite le transfert de l'ubiquitine sur un substrat spécifique soit en formant un complexe permettant de rapprocher E2 du substrat ou encore en catalysant directement le transfert de l'ubiquitine sur celui-ci. Cette modification peut mener à l'endocytose et au trafic intracellulaire ainsi qu'à la dégradation protéique (D'après Ohta et Fukuda, 2004).

ubiquitylation ainsi que la monoubiquitylation (Figure 1). Cette dernière se définit par l'addition d'une molécule d'ubiquitine simple sur un seul résidu lysine d'une protéine.

Lorsque plusieurs résidus lysines portent une molécule d'ubiquitine on parle alors de multiubiquitylation. La polyubiquitylation, quant à elle, consiste en l'ajout d'une

chaîne d'ubiquitine sur un substrat. La chaîne est alors produite en liant l'ubiquitine à une lysine située dans la molécule d'ubiquitine précédente (Hicke, 2001; Pickart, 2001).

Ces différentes formes d'ubiquitylation permettent de réguler une grande variété de processus biologiques. L'ubiquitylation influence ainsi la progression du cycle cellulaire, le transport des protéines et l'inflammation. De plus, elle joue un rôle dans le contrôle de la qualité au réticulum endoplasmique et participe à la réponse aux dommages à l'ADN et au stress cellulaire (Weissman, 2001).

La monoubiquitylation est plus particulièrement associée à l'endocytose, la régulation des histones ainsi qu'au bourgeonnement des rétrovirus. La polyubiquitylation, de façon classique, destine le substrat à une dégradation protéasomale (Hicke, 2001). Cependant, on distingue divers types de polyubiquitylation selon la position du résidu lysine à l'intérieur de l'ubiquitine acceptant une autre molécule d'ubiquitine. Une liaison via la lysine 48 (K48) ou K29 est associée à la dégradation protéasomale. On peut aussi observer des liaisons K63 entre les molécules d'ubiquitine n'impliquant pas la protéolyse. Ce type de liaison est plutôt associé au trafic des protéines de même qu'à l'activation de certaines kinases (Pickart et Fushman, 2004). Les chaînes d'ubiquitine liées par K63 sont aussi associées à la modification de sous-unités ribosomales résultant en une augmentation de la traduction et une régulation de l'expression génique (Figure 1) (Weissman, 2001).

### 1.1.2. Les enzymes d'ubiquitylation

La réaction d'ubiquitylation nécessite la participation de 3 enzymes : E1, E2 et E3. La spécificité de la réaction d'ubiquitylation est assurée par l'interaction entre la E3 et son substrat. L'enzyme E1 est une enzyme d'activation responsable de l'adénylation transitoire de l'ubiquitine, ce qui permet sa liaison à un résidu cystéine de l'enzyme E1

dans une réaction dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate). Ce lien thiol ester entre l'ubiquitine et E1 forme un complexe permettant une reconnaissance par diverses enzymes E2, les transporteurs de l'ubiquitine. Le transfert de l'ubiquitine activée va se faire sur un résidu cystéine de E2. Cette enzyme va permettre le transfert de l'ubiquitine via une ligase E3. Le transfert va s'effectuer sur le groupe amine  $\epsilon$  d'un résidu lysine du substrat. La liaison peut aussi parfois s'effectuer via le groupement  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> en N-terminal du substrat. D'autres études mentionnent aussi une ubiquitylation possible d'une cystéine de la chaîne latérale du complexe CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité) (Cadwell et Coscoy, 2005). La reconnaissance des substrats à ubiquityler par les ligases E3 dépend de la reconnaissance de signaux particuliers. Il existe deux types principaux de ligases présentant deux mécanismes distincts d'ubiquitylation : les enzymes de type RING (Really interesting new gene) et ceux de type HECT (Homologous to E6-associated protein) (Hershko et Ciechanover, 1998; Kerscher et al, 2006; Nandi et al, 2006; Scheffner et al, 1995). Ces deux mécanismes impliquent d'une part la reconnaissance de l'enzyme E2 par la ligase et d'autre part la liaison du substrat, permettant ainsi la conjugaison d'ubiquitine sur un site spécifique de celui-ci (Pickart et al, 2001).

Les enzymes de type RING se caractérisent par la présence d'un motif riche en cystéine et en histidine. L'espacement entre ces résidus permet l'incorporation de deux atomes de zinc et c'est cette structure dite en « doigt de zinc » qui va permettre le transfert de l'ubiquitine sur le substrat. En fait, il s'agirait d'une catalyse par proximité puisque le motif RING ne se trouve jamais très près de la cystéine active de l'enzyme E2. Les ligases RING serviraient plutôt à amener à proximité la lysine acceptatrice du

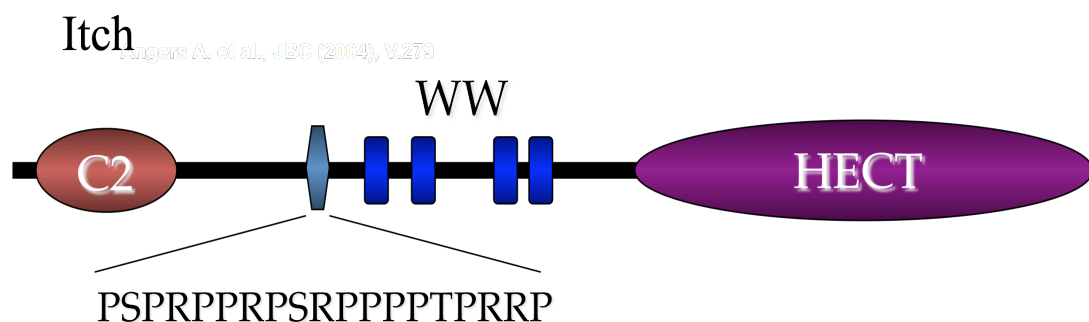
substrat avec le complexe formé de l'enzyme E2 avec l'ubiquitine. De cette façon, les enzymes RING augmentent la probabilité de la liaison de l'ubiquitine sur les substrats (Pickart et Eddins, 2004).

Les enzymes de type HECT vont elles aussi permettre l'ubiquitylation de substrats spécifiques, mais vont cette fois participer plus activement à la réaction en formant un complexe intermédiaire avec l'ubiquitine avant le transfert au substrat. Les ligases E3 vont présenter un domaine catalytique HECT en forme de L lequel sera reconnu à l'extrémité de sa base par l'enzyme E2. L'ubiquitine portée par E2 sera ensuite transférée sur l'enzyme E3 pour former un lien thiol ester avec l'enzyme E3. De cette façon, l'ubiquitine pourra être transférée spécifiquement sur les substrats reconnus par les ligases E3 (Figure 1) (Pickart, 2001; Pickart et Eddins, 2004).

## **1.2. La ligase Itch :**

### **1.2.1. Architecture de la protéine**

Les travaux effectués par notre laboratoire portent sur cette dernière classe d'enzymes E3 et plus précisément sur la ligase Itch. Cette protéine est une enzyme d'ubiquitylation identifiée au départ dans les souris non-agouti létales 18H, comme le produit d'un gène dont la mutation était responsable de plusieurs symptômes immunologiques sévères et d'une irritation de la peau qui a donné son nom au phénotype car les souris se grattent beaucoup (Perry et al., 1998). Itch, aussi connue sous le nom AIP4 (Atrophin-1 interacting protein 4) appartient à la famille Nedd4/Rsp5p (neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4) dont les membres possèdent une organisation similaire. Ils sont composés d'un domaine C2, de 2 à 4 domaines tryptophanes (WW) ainsi que d'un domaine HECT (Figure 2) (Rotin et al, 2000).



**Figure 2.** Schéma de la protéine Itch avec à son extrémité N-terminale un domaine C2 suivi d'une région riche en proline (PRD), de 4 domaines tryptophanes (WW) et d'un domaine catalytique HECT.

Itch possède ainsi un domaine C2 lui permettant d'interagir avec des phospholipides. Ce domaine permet l'association d'Itch au niveau des membranes (Nalefski et Falke, 1996). Il est d'ailleurs établi qu'Itch est situé au niveau de la membrane des endosomes ainsi qu'au réseau transgolgien, ce qui permet son interaction avec les protéines trafiquant entre les divers compartiments cellulaires (Angers et al, 2004).

Un autre domaine présent à l'extrémité C-terminale de la ligase est le domaine HECT, responsable de l'activité catalytique. Comme nous l'avons mentionné, ce domaine permet de lier l'enzyme E2 et de catalyser le transfert de l'ubiquitine au substrat. Ce domaine est aussi responsable de la polyubiquitylation en permettant l'élongation de la chaîne d'ubiquitine (Rotin et al, 2000).

Entre les deux, les motifs WW sont constitués d'environ 40 acides aminés et permettent aux ligases de la famille Nedd4/Rsp5p d'interagir avec plusieurs protéines. Itch possède ainsi 4 domaines WW lui permettant d'interagir avec ses substrats et de réguler une panoplie de fonctions cellulaires. Ces domaines servent aux membres des

Nedd4/Rsp5p à reconnaître des séquences particulières comme les motifs PPXY ou encore des résidus sérines et tyrosines phosphorylées (Rotin et al, 2000; Ingham et al, 2004; Macias et al, 2002).

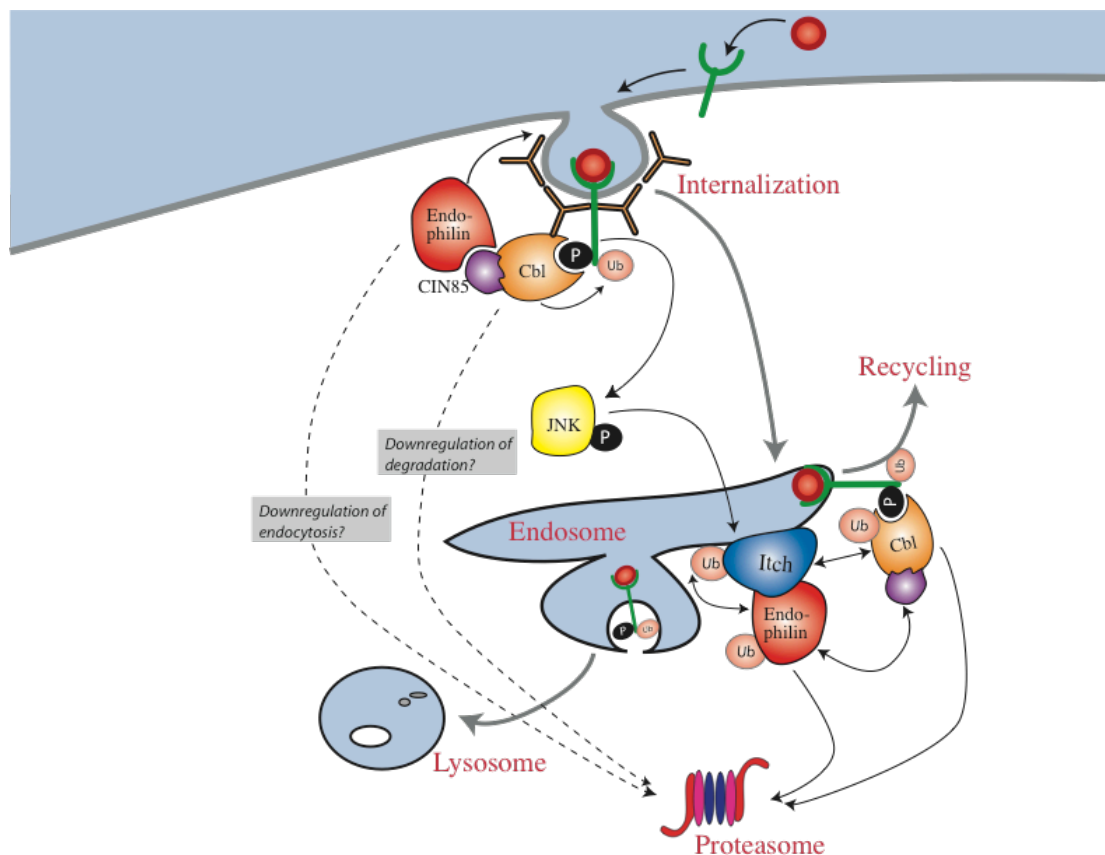
Une particularité de la protéine Itch est son domaine riche en proline (PRD) formé de la séquence d'acides aminés PSRPPRPSRPPPTPRRP. Itch est en effet le seul membre de la famille Nedd4/Rsp5p à posséder un tel domaine. Ce dernier permet l'interaction entre Itch et des protéines possédant un domaine SH3 (Src-homology 3) (Macias et al, 2002; Pawson, 1995).

### 1.2.2. Quelques substrats d'Itch

La ligase Itch est connue pour son interaction avec la protéine Notch impliquée dans les décisions concernant le destin cellulaire et pouvant réguler la réponse immunitaire (Qiu et al, 2000). Itch permet aussi de réguler l'intégrité para cellulaire en agissant sur l'occludine, une protéine transmembranaire impliquée dans les jonctions serrées entre cellules (Traweger et al, 2002). La ligase permet aussi de réguler certains facteurs de transcription comme c-Jun et JunB, des facteurs entre autres responsables de la différenciation des cellules Th2 (T helper 2) du système immunitaire (Fang et al, 2002). L'interaction entre Itch et la protéine antiapoptotique c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) menant à sa destruction permet de lier Itch à la mort cellulaire par apoptose (Chang et al, 2006). Des résultats obtenus par notre laboratoire montrent aussi un lien entre Itch et l'apoptose via son interaction avec la protéine proapoptotique t-Bid (truncated C-terminal Bid). Itch est donc responsable de l'ubiquitylation et de la dégradation de cette protéine, ce qui a pour effet de protéger la cellule des effets proapoptotiques de t-Bid (Azakir et al, 2010) (Voir Annexe 1). Itch permet donc la dégradation de plusieurs partenaires impliqués dans des mécanismes cellulaires variés.

### 1.2.3. Régulation de l'activité ligase d'Itch

L'activité de la ligase Itch menant à l'ubiquitylation et la dégradation de ses substrats peut être contrôlée de plusieurs façons. Tout d'abord, Itch est en mesure de participer à sa propre autoubiquityation, ce qui a pour effet de l'envoyer aux protéasomes pour y être dégradée et ainsi empêcher son effet au niveau cellulaire. Itch est donc en mesure de s'inactiver elle-même, ce qui peut toutefois être compensé par la présence de la protéase de l'ubiquitine FAM. Cette protéine est en mesure d'enlever les molécules d'ubiquitine présentes sur Itch et sauver cette dernière de la dégradation. FAM est donc en mesure de contrôler le niveau d'expression et par le fait même l'activité d'Itch (Mouchantaf et al, 2006). La phosphorylation d'Itch serait un autre des mécanismes permettant d'influencer son activité. Ainsi, l'ajout de phosphates peut s'effectuer sur des résidus sérines, thréonines et tyrosines (Gallagher et al, 2006). Itch est phosphorylée au niveau d'une tyrosine par la kinase de la famille Src (sarcome kinase) Fyn. Cette modification entraîne une diminution de son activité ligase, ce qui est démontré par une augmentation de la dégradation de son substrat c-Jun dans des cellules déficientes pour l'enzyme Fyn (Yang et al, 2006). Cette augmentation de la dégradation étant compensée par la mutation de la tyrosine impliquée, cela démontre l'effet négatif de ce type de phosphorylation sur Itch (Yang et al, 2006). Un autre exemple de phosphorylation menant cette fois à une augmentation de l'activité d'Itch est effectuée par la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase). Cette phosphorylation survient dans le domaine PRD d'Itch et plus précisément sur deux sérines et une thréonine. Ce type de phosphorylation est associé à une augmentation de la dégradation de substrats d'Itch tel c-Jun et JunB, témoignant de l'augmentation de l'activité de la ligase (Figure 3) (Gao et al, 2004; Gallagher et al, 2006).



**Figure 3.** Modèle d'internalisation du récepteur à l'EGF montrant le recrutement du complexe protéique Cbl-CIN85-Endophiline et l'ubiquitylation du récepteur suite à son activation. Ces derniers seront alors internalisés vers les endosomes, où réside Itch, puis recyclés vers la membrane ou alors détruits par les lysosomes. La signalisation induite par l'EGF permet l'activation de la kinase JNK responsable de la phosphorylation et l'activation d'Itch menant à la dégradation de l'endophiline et de Cbl.

De plus, des travaux effectués par notre laboratoire ont permis de montrer que l'activation de JNK suite à une stimulation des récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor) entraînait aussi une augmentation de l'ubiquitylation et de la dégradation de protéines impliquées dans l'endocytose (Angers et al, 2004; Azakir et Angers, 2009). Il s'agit des protéines Cbl (casitas B-lineage lymphoma) et endophiline qui jouent un rôle clé dans l'internalisation des RTKs (récepteurs tyrosine kinase) et donc des récepteurs à



l'EGF. La stimulation de ces derniers créerait ainsi une sorte de rétroaction négative en stimulant la dégradation de substrats impliqués dans leur internalisation qui serait causée par la stimulation d'Itch induite par JNK (Figure 3) (Azakir et Angers, 2009; Angers et al, 2004).

### **1.3. L'endocytose :**

#### 1.3.1. Principes généraux

L'endocytose est un mécanisme complexe d'internalisation des protéines membranaires permettant de réguler l'abondance de ces protéines à la surface des cellules. L'endocytose est aussi responsable d'actions diverses allant de l'entrée de nutriments à l'entrée de pathogènes dans la cellule. De plus, l'endocytose permet de réguler la signalisation à partir de protéines de surface en les internalisant au niveau des endosomes afin de déterminer si celles-ci doivent être dégradées ou encore recyclées vers la membrane plasmique.

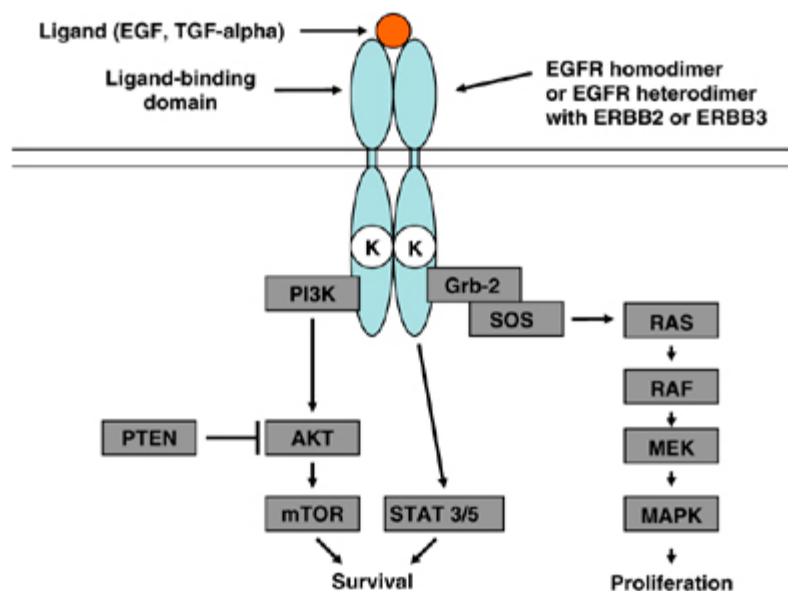
Il existe différents mécanismes d'endocytose reposant sur des composantes protéiques différentes. Ainsi, on distingue la voie dépendante de la cavéole, la voie indépendante de la clathrine et finalement celle dépendant de la clathrine (Doherty et McMahon, 2009). Cette dernière est particulièrement présente dans le système nerveux où elle permet le recyclage des vésicules synaptiques (Mousavi et al, 2004). De plus, ce type d'endocytose nous intéresse particulièrement puisqu'il permet l'internalisation d'une foule de récepteurs comme les récepteurs tyrosine-kinases (RTK) ou encore les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G). Étant donnée cette panoplie de cargos à internaliser, différentes interactions protéiques seront impliquées dans leur recrutement au sein des vésicules de clathrine. Les RCPG seront ainsi recrutés via leurs interactions avec les

arrestines tandis que les RTKs utiliseront plutôt la protéine AP2 (protéine adaptatrice 2) (McPherson et al, 2001). L'internalisation des RTKs nous intéresse particulièrement puisque, comme nous l'avons mentionné, il existe un lien entre leur signalisation et l'activité d'Itch. Ainsi, les récepteurs à l'EGF constituent un modèle d'internalisation des RTKs et leur activation est responsable de l'augmentation de son activité ligase via l'effet de la kinase JNK (Azakir et Angers, 2009). Nous verrons donc maintenant les caractéristiques de ces récepteurs ainsi que les différentes étapes nécessaires à leur internalisation.

### 1.3.2. Les récepteurs à l'EGF

Il existe plusieurs membres appartenant à la famille des RTKs de type ErbB pouvant s'homo- ou hétérodimériser et activer plusieurs voies de signalisation importantes. Ainsi, on distingue ErbB3 et ErbB4 qui sont des récepteurs de neurégulines ayant pour fonction de transmettre les signaux entre le mésenchyme et l'épithélium afin de permettre la croissance cellulaire (Yarden et Sliwkowski, 2001). Il est intéressant de noter qu'Itch est responsable de l'ubiquitylation et de la dégradation de ErbB4 (Omerovic et al, 2007). La protéine ErbB2 est quant à elle une oncoprotéine dont la mutation peut causer le cancer. Finalement, le récepteur à l'EGF (aussi appelé ErbB1) qui constitue notre modèle est lui aussi impliqué dans de nombreux mécanismes cancéreux ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante (Hynes et Lane, 2005). Ceci s'explique entre autres par la diversité des voies de signalisation activées suivant la liaison du ligand aux récepteurs. Parmi celles-ci on retrouve la voie JAK/STAT (Janus protein tyrosine kinase/Signal transducers and activators of transcription) ainsi que la voie Ras/MAPK/JNK (mitogen-activated protein kinase) responsables de la prolifération,

la différenciation ainsi que la survie cellulaire en agissant sur plusieurs facteurs de transcription (Figure 4) (Quesnelle et al, 2007).



**Figure 4.** L'activation des récepteurs par leur ligand permet leur homo- ou hétérodimérisation et leur signalisation via l'activation de différentes protéines. On distingue ici son effet sur la voie de l'AKT et celle de JAK/STAT menant à la survie cellulaire. L'activation des kinases de type MAPK mène quant à elle à la prolifération

Le modèle d'endocytose que nous étudions est basé sur l'internalisation du récepteur à l'EGF à cause de son importance dans le cancer de même que pour l'étendue des recherches qui lui sont consacrées. La compréhension de ses mécanismes d'internalisation pourrait ainsi permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'atténuer sa signalisation en le séquestrant à l'intérieur de la cellule ou encore en augmentant sa dégradation.

### 1.3.3. Le rôle de Cbl dans l'internalisation

La liaison du ligand au récepteur à l'EGF provoque sa dimérisation suivie de la transphosphorylation du récepteur permettant ainsi son activation et sa signalisation (Zhang et al, 2006). Dans cette conformation, le récepteur est en mesure de recruter Cbl

via son domaine TKB (tyrosine kinase binding). La protéine Cbl est une ligase de l'ubiquitine de type RING. Il existe 3 homologues de la protéine Cbl appelés c-Cbl, Cbl-b et Cbl-3. Ces protéines possèdent toutes un domaine de liaison TKB, un domaine linker ainsi qu'un domaine RING (Thien et Langdon, 2005). Comme nous l'avons mentionné, le domaine TKB permet la liaison de Cbl avec des RTKs alors que le domaine RING catalyse la réaction d'ubiquitylation. Il est aussi intéressant de noter que malgré son nom, le domaine TKB est aussi responsable de l'interaction de Cbl avec des protéines n'étant pas des tyrosines kinases (Swaminathan et Tsygankov, 2006). La forme principale de Cbl impliquée dans la régulation des récepteurs RTKs à l'EGF est c-Cbl. La localisation de cette protéine est principalement cytoplasmique quoiqu'on la retrouve aussi associée à la membrane et au cytosquelette. De plus, Cbl possède un domaine riche en proline permettant son interaction avec des protéines possédant un domaine SH3, comme CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa). Cbl va ainsi pouvoir participer à l'endocytose de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) de plusieurs façons. Tout d'abord, son domaine TKB va pouvoir lier les récepteurs activés et phosphorylés. Cbl va aussi pouvoir ubiquityler le récepteur et permettre son internalisation. Finalement, Cbl est en mesure de recruter et de modifier plusieurs protéines impliquées dans l'endocytose de l'EGFR. Ainsi, Cbl va recruter et ubiquityler CIN85 et l'ubiquitylation est augmentée suivant une stimulation à l'EGF. Ceci suggère un rôle de Cbl dans l'établissement du complexe d'internalisation favorisant l'endocytose. Ainsi, le complexe Cbl-CIN85 va recruter d'autres protéines favorisant l'endocytose comme l'endophiline. Le complexe formé de Cbl-CIN85 et endophiline est d'ailleurs nécessaire à l'internalisation des récepteurs (Swaminathan et Tsygankov, 2006; Soubeyran et al, 2002). L'activité de la ligase Cbl

peut aussi être régulée par phosphorylation, ce qui pourra alors modifier ses interactions et son activité ligase. La stabilité de Cbl et de l'endophiline est aussi régulée par l'activité d'une autre ligase, soit notre protéine d'intérêt Itch. Des travaux ont en effet démontré qu'Itch affecte l'expression de Cbl et de l'endophiline et que sa surexpression est responsable de la diminution de leur expression, réduisant ainsi leur participation au phénomène de l'endocytose (Magnifico et al, 2002; Azakir et Angers, 2009). De plus, comme une stimulation de l'EGFR entraîne son internalisation au niveau des endosomes avec le complexe protéique Cbl-CIN85-endophiline, la ligase Itch résidante dans ce compartiment sera en mesure d'ubiquityler Cbl et endophiline et ainsi mener à leur dégradation (Magnifico et al, 2002; Angers et al, 2004; Soubeyran et al, 2002; Azakir et Angers, 2009). L'activité ligase d'Itch étant augmentée par un traitement à l'EGF, cela suggère qu'Itch influence la disponibilité de ces protéines pour l'endocytose (Figure 3) (Azakir et Angers, 2009).

#### 1.3.4. L'endophiline et ses rôles multiples

L'endophiline est une protéine importante de la voie de l'endocytose par vésicule de clathrine. Comme nous venons de le mentionner, son expression est régulée par la ligase Itch et elle fait partie du complexe nécessaire à l'endocytose des récepteurs à l'EGF. De plus, elle permet de faire le lien avec d'autres protéines également nécessaires à ce processus.

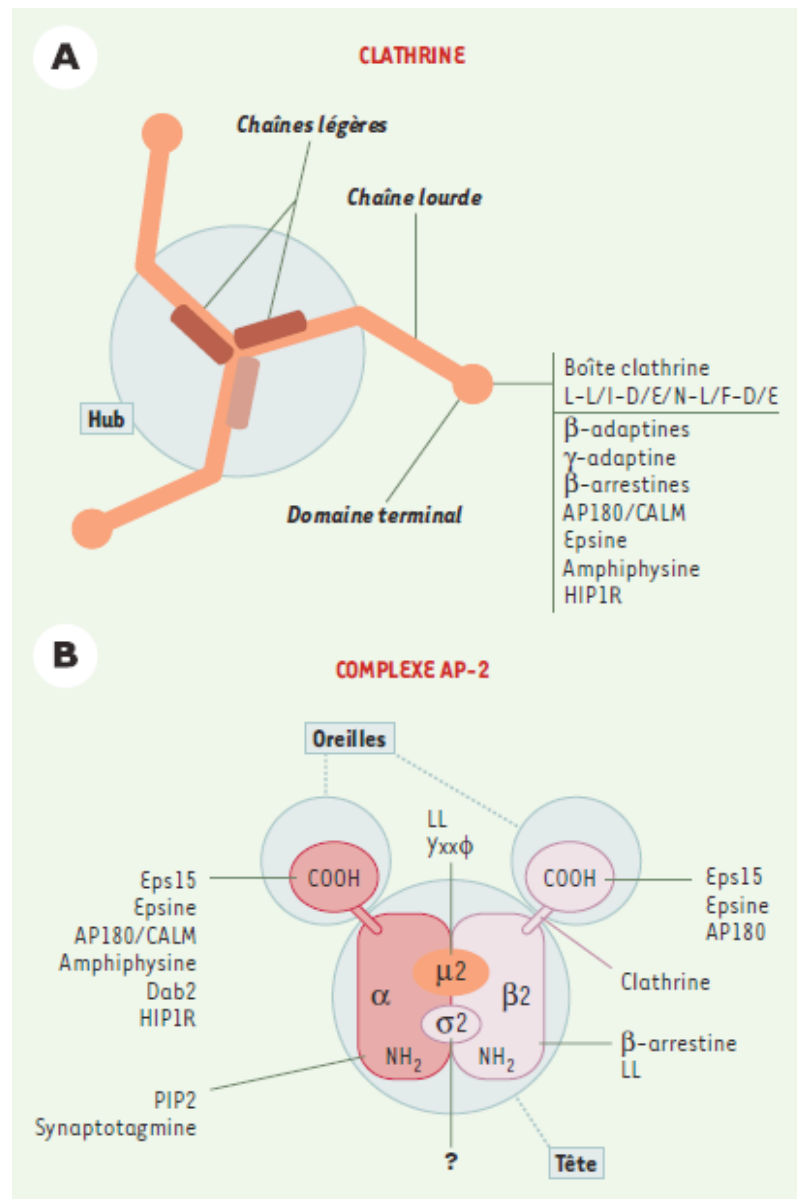
Il existe 3 isoformes d'endophiline ayant chacune une distribution tissulaire différente. L'endophiline A1 est exprimée dans le cerveau tandis que l'endophiline A3 est exprimée dans le cerveau ainsi que les testicules. L'endophiline A2 est quant à elle exprimée de façon ubiquitaire dans les différents tissus (Ringstad et al, 1997). La forme la mieux caractérisée est l'endophiline A1, mais il est probable que les autres isoformes

fonctionnent de la même façon étant donné la très grande homologie entre leurs séquences. L'endophiline fut identifiée au départ via son domaine SH3 lui permettant d'interagir avec la synaptojanine, une protéine impliquée dans le désassemblage de la cage de clathrine (De Heuvel et al, 1997; Verstreken et al, 2003). L'endophiline lie aussi la dynamine via son domaine C-terminal SH3. Cette protéine GTPase est impliquée dans l'étranglement de la vésicule formée et de sa dissociation de la membrane plasmique soit dans les stades tardifs de l'endocytose (Reutens et Begley, 2002; Mousavi et al, 2004; McPherson et al, 2001). L'endophiline est donc une protéine cytoplasmique impliquée dans l'endocytose via son interaction avec d'autres protéines, mais aussi en raison de son propre effet sur la membrane dans les stades primaires de l'endocytose. L'endophiline possède en effet un autre domaine appelé BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs-homology) situé en N-terminal. Ce domaine est responsable de la courbure de la membrane plasmique. La dimérisation de domaines BAR donne une structure en forme de croissant imposant ses charges positives sur la membrane chargée négativement. Cette interaction permet d'appliquer une force suffisante à la courbure de la membrane (Masuda et al, 2006; Gallop et al, 2006)

#### 1.3.5. L'assemblage du manteau de clathrine et les protéines accessoires

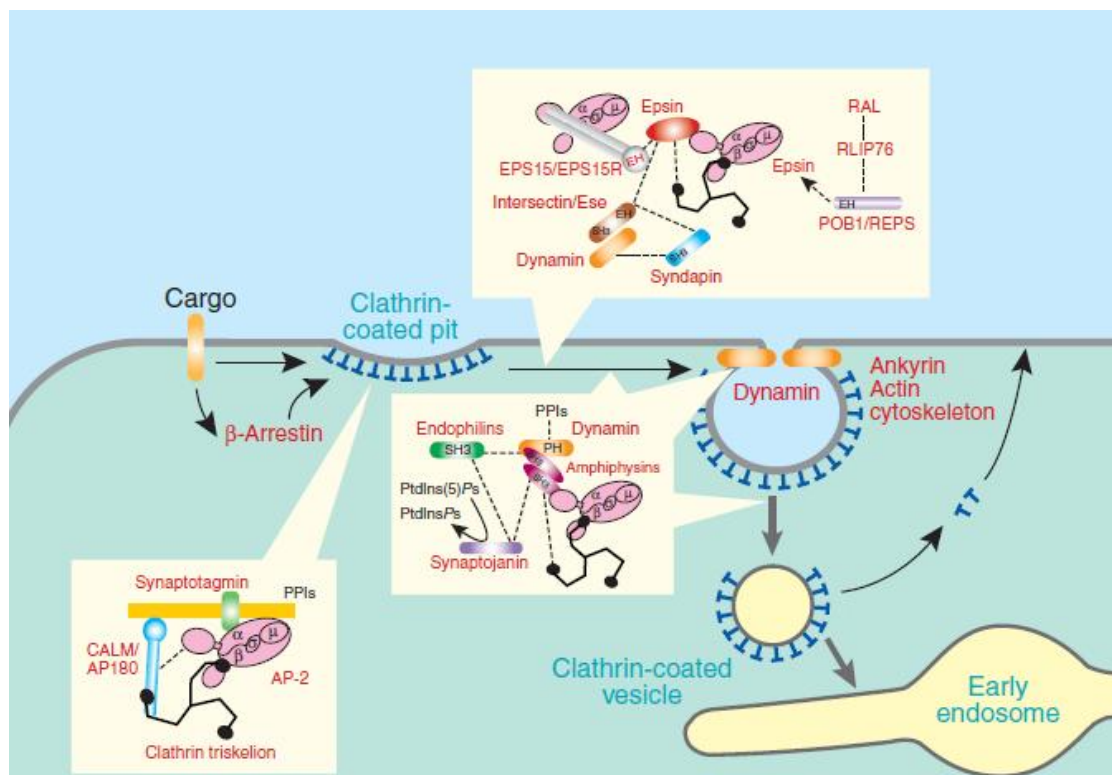
La formation de vésicules de clathrine débute par la liaison du ligand aux récepteurs permettant le recrutement et l'activation de kinases PI3K (phosphoinositides 3-kinases) responsables de la formation de PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) au niveau de la membrane. Ceci aura pour effet de recruter la protéine AP2 aux vésicules en formation (Czech, 2000; Maldonado-Baez et Wendland, 2006). La protéine AP2 servant à concentrer les protéines cargo à l'intérieur des puits de clathrine va ensuite lier la clathrine et stimuler son assemblage sous forme de triskèles. Cette structure est formée de

chaînes légères de clathrine ainsi que de chaînes lourdes. La cage de clathrine en formation va ainsi contribuer à effectuer une pression sur la membrane et induire sa courbure (Figure 5) (Benmerah et Lamaze, 2002).



**Figure 5.** Les interactions protéiques à la base de l'endocytose. A) Structure de la clathrine formant des triskèles en associant des chaînes légères avec des chaînes lourdes. Ces dernières interagissent avec plusieurs protéines nécessaires à l'internalisation. B) La protéine AP-2 se présente sous la forme d'un complexe entre l'α et la β2-adaptine avec au centre les sous-unités μ2 et σ2. Cette conformation permet l'interaction avec la clathrine ainsi qu'avec les protéines régulant l'endocytose (D'après Benmerah et Lamaze, 2002).

Différentes interactions protéines-protéines vont par la suite permettre le recrutement par la clathrine et l'AP2 de protéines accessoires participant activement au phénomène de l'endocytose. Ainsi, ce complexe sera en mesure de recruter Eps15 (epidermal growth factor receptor substrate 15), epsine (Eps15 interacting protein), amphiphysine, intersectine, AP180/CALM (adaptor protein 180/clathrin assembly myeloid leukemia protein) et HIP1 (huntingtin-interacting protein 1). Ces protéines pourront à leur tour recruter pacsin, synaptojanine et dynamine (McPherson et al, 2001; Kelly, 1999; Metzler et al, 2001). Toutes ces protéines participent à l'internalisation d'un



**Figure 6.** L'endocytose dépendante de la clathrine nécessite la participation de plusieurs protéines afin de recruter les cargos à internaliser ainsi que les protéines permettant l'assemblage du manteau sur les vésicules en formation (D'après Sorkin, 2000).



cargo spécifique. Ceci démontre la complexité et la diversité des principaux acteurs impliqués dont nous verrons maintenant un aperçu des fonctions principales (Figure 6).

### *L'epsine*

Tout d'abord, l'epsine va être en mesure de lier la clathrine via 2 types de séquences en plus de pouvoir lier les oreilles  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine AP2 (Drake et al, 2000; Drake et Traub, 2001; Owen et al, 1999; Owen et al, 2000). Elle est aussi capable de s'ancrer au PIP2 présent sur la membrane et d'y insérer une hélice amphipatique appartenant à son domaine ENTH (epsin N-terminal homology). Cette forme d'ancrage permet à l'epsine de jouer un rôle dans la déformation et la courbure de la membrane plasmique (Ford et al, 2002; Hurley et Wendland, 2002; Stahelin et al, 2003). De plus, l'epsine interagit avec l'intersectine qui pourra alors recruter d'autres protéines accessoires au site d'endocytose (Chen et al, 1998). Un autre rôle de l'epsine serait de faire le lien entre le cytosquelette et la vésicule en formation via son interaction avec la tubuline et les microtubules (Hussain et al, 2003). Finalement, l'epsine interagit via sa partie C-terminale avec Eps15 (Chen et al, 1998).

### *Eps15*

Eps15 est une protéine pouvant s'arrimer au niveau des vésicules de clathrine en formation en liant les oreilles  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine AP2 (Owen et al, 1999; Owen et al, 2000). Cette protéine va permettre l'endocytose en recrutant plusieurs partenaires impliqués dans ce phénomène. Ainsi, Eps15 va être constitutivement lié à l'intersectine qui pourra à son tour faire le lien avec d'autres protéines de l'endocytose (Sengar et al, 1999). De plus, Eps15 possède un domaine EH (Eps15 homology) capable de lier les motifs NPF (asparagine-proline-phénylalanine). Ces motifs sont notamment présents sur

la synaptojanine 170 ainsi que sur la protéine AP180, ce qui permet leur interaction avec l'Eps15 (Haffner et al, 1997; Morgan et al, 2003).

### *Ap180*

La protéine AP180 est présente au niveau neuronal et constitue l'homologue de la protéine CALM dont l'expression est ubiquitaire. Cette protéine, en plus de lier Eps15, est aussi recrutée au niveau des vésicules en formation via son interaction avec la clathrine et l'AP2. Ainsi, AP180 est en mesure de s'associer avec la partie N-terminale de la clathrine et avec les oreilles  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine AP2 (Slepnev et al, 2000; Owen et al, 2000; Scheele et al, 2003; Tebar et al, 1999). AP180 possède aussi un domaine ANTH (AP180 N-terminal homology) similaire au domaine ENTH de l'epsine qui lui permet de s'associer au PIP2 présent au niveau de la membrane en plus de faire le lien entre cette protéine et le cytosquelette de par sa liaison à la tubuline (Stahelin et al, 2003; Hussain et al, 2003). Cependant, le rôle de ce domaine ne serait pas d'induire la courbure de la membrane, mais plutôt de réguler la taille des vésicules formées lors de l'endocytose (Ye et Lafer, 1995; Zhang et al, 1998). AP180 serait aussi en mesure d'affecter la signalisation cellulaire par sa liaison à la PLC- $\gamma$  (phospholipase-C $\gamma$ ) (Han et al, 2002).

### *HIP1*

Le complexe formé de la clathrine et de l'AP2 est aussi responsable du recrutement de la protéine HIP1. Cette dernière est en effet capable de lier la protéine AP2 et d'interagir avec les chaînes lourdes de la clathrine (Metzler et al, 2001). HIP1 interagit aussi avec la région régulatrice des chaînes légères, ce qui lui permet de jouer un rôle dans l'assemblage de la clathrine (Legendre-Guillemin et al, 2005). De plus, HIP1 possède un homologue appelé HIP1R et ces deux protéines s'associent *in vitro* avec la F-actine et sont associées avec les vésicules de clathrine. Ceci suggère donc un rôle de ces

protéines dans l'ancrage des vésicules au cytosquelette d'actine (Waelter et al, 2001; Engqvist-Goldstein et al, 1999; Engqvist-Goldstein et al, 2001).

### *L'amphiphysine*

Une autre protéine jouant un rôle majeur dans l'endocytose est l'amphiphysine. Il existe 2 isoformes de cette protéine soit l'amphiphysine I ainsi que l'amphiphysin II dont il existe 5 variations formées par épissage alternatif (Ramjaun et McPherson, 1998). Toutes ces protéines montrent des interactions et des fonctions similaires. Elles sont particulièrement présentes au niveau des terminaisons nerveuses et possèdent un domaine SH3 en C-terminal en plus d'un site de liaison aux SH3 et de sites de phosphorylation. L'amphiphysine interagit ainsi avec l'endophiline, une protéine endocytaire décrite précédemment et cette interaction repose sur un site de 43 acides aminés identifié comme étant le site de liaison de domaines SH3 (Micheva et al, 1997). Le domaine SH3 d'amphiphysine lui permet aussi d'interagir avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose. Ainsi, l'amphiphysine interagit avec la dynamine et la synaptojanine (Ramjaun et al, 1997). Cette dernière sera alors responsable du désassemblage du manteau de clathrine ainsi que d'une activité phosphatase agissant sur les lipides. On constate d'ailleurs chez des souris mutantes déficientes en synaptojanine une accumulation de PIP2 au niveau des neurones. Cette concentration de PIP2 permet de maintenir un niveau élevé d'affinité entre les protéines adaptatrices formant le manteau de clathrine et la surface de la vésicule, lorsque celle-ci doit diminuer drastiquement afin de permettre son désassemblage rapide (Cremona et al, 1999). De plus, l'ablation génétique de la synaptojanine mène à une accumulation de vésicules de clathrine libres de même qu'à un ralentissement de leur disponibilité suite à leur recyclage, suggérant encore l'implication de la synaptojanine dans ce phénomène (Mani et al, 2007). La

liaison de l'amphiphysine avec la dynamine permettrait aussi d'augmenter l'activité GTPase de cette dernière, responsable de la fission des vésicules à internaliser (Yoshida et Takei, 2005). De plus, l'amphiphysine ne fait pas que s'accrocher à la clathrine et à l'oreille  $\alpha$  de l'AP2 pour y recruter d'autres protéines, mais effectue aussi un rôle direct sur l'endocytose. En effet, l'amphiphysine possède un domaine BAR similaire à celui de l'endophiline. L'amphiphysine permet donc l'insertion d'une hélice amphipatique située en N-terminal de son domaine BAR (N-BAR) dans la membrane, ce qui permet d'induire sa courbure (Peter et al, 2004).

### *L'intersectine*

L'endocytose est aussi facilitée par la présence d'une protéine importante : l'intersectine. Son expression tissulaire est ubiquitaire et elle possède 2 domaines EH en N-terminal, une portion centrale formée d'hélices  $\alpha$  et 5 domaines SH3 situés en C-terminal (nommés A à E) (Guipponi et al, 1998; Yamabhai et al, 1998). De plus, il existe une autre forme d'intersectine un peu plus longue (intersectin-l) provenant d'un épissage alternatif. Cette dernière est exprimée spécifiquement dans le cerveau et possède les mêmes domaines que l'intersectine (aussi appelée intersectine-s) avec une portion C-terminale supplémentaire. Cette portion contient un domaine C2 ainsi qu'un domaine DH (Dbl homology) et PH (pleckstrin homology); ces derniers étant responsables de l'activation de petites GTPases (Guipponi et al, 1998). La structure particulière de l'intersectine en fait une protéine d'échafaudage majeure permettant le recrutement d'une foule de protéines au sein de la vésicule de clathrine en formation. Elle interagit ainsi avec l'epsine via ses domaines EH et avec la dynamine et la synaptojanine via ses domaines SH3 (Chen et al, 1998; Cremona et al, 1999; Sever et al, 1999). Finalement, l'intersectine s'hétérodimérise de façon constitutive avec l'Eps15 pouvant à son tour

permettre d'autres interactions (Sengar et al, 1999). En plus de recruter diverses protéines, l'intersectine permettrait aussi de faire le lien entre l'endocytose et la signalisation. Des travaux ont en effet montré un lien entre l'expression d'intersectine et l'activation de facteurs de transcription dans un mécanisme dépendant de la voie de signalisation des MAPK (Adams et al, 2000). D'autres études ont aussi permis de démontrer l'interaction dans le cerveau de rats entre l'intersectine et mSOS (mammalian son-of-sevenless), une protéine permettant l'activation de Ras/Rac et leurs effets sur le cytosquelette et la polymérisation de l'actine (Tong et al, 2000; Hall, 1998). L'intersectine collaborerait aussi avec Ras dans un mécanisme indépendant de cette dernière afin d'activer la transcription via l'activation de kinases JNK (Mohney et al, 2003). Récemment, une étude de Martin et ses collaborateurs a aussi permis d'en apprendre beaucoup plus sur les mécanismes permettant de relier l'intersectine et la signalisation des récepteurs à l'EGF. Ainsi, l'intersectine est nécessaire à l'internalisation des récepteurs activés de même qu'à l'activation de la voie de signalisation MAPK et l'activation de la transcription. Elle est aussi associée avec Cbl, ce qui lui permet de réguler l'ubiquitylation et la dégradation des récepteurs et ainsi jouer un rôle majeur dans la signalisation (Martin et al, 2006). Un rôle supplémentaire de l'intersectine serait de faire le lien entre l'endocytose, l'exocytose et le cytosquelette. En effet, l'intersectine-1 permettrait la nucléation de filaments d'actine Arp2/3-dépendante (actin related protein 2/3) via l'activation de Cdc42 (cell division control protein 42). Cette dernière pourra alors, avec la collaboration de PIP2, activer N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) et permettre la nucléation de l'actine. N-WASP est aussi en mesure de lier directement l'intersectine-1 et d'augmenter son activité GEF (guanine exchange factor),

ce qui va permettre d'augmenter le niveau de GTP-Cdc42 (guanosine triphosphate-Cdc42) et l'activation de N-WASP (Rohatgi et al, 2000; Hussain et al, 2001; Higgs et Pollard, 2001). L'activation de N-WASP par Cdc42 est responsable de la stimulation de l'exocytose dans des cellules neuronales permettant de faire le lien entre ce phénomène et l'intersectine (Gasman et al, 2004). De plus, l'intersectine lie la protéine SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) qui est une composante majeure de l'exocytose en permettant l'arrimage de la vésicule à la membrane (Okamoto et al, 1999). Récemment, une étude a aussi permis d'établir un lien plus direct entre l'intersectine-1, Cdc42 et la sécrétion de granules en réponse à un stimulus (Malacombe et al, 2006). Finalement, il existe une autre forme très similaire d'intersectine qui fut très peu étudiée jusqu'à maintenant. Cette intersectine-2 présente les mêmes domaines que l'intersectin-1 et se trouve aussi sous 2 formes principales soit la forme longue et la forme courte. Elle serait impliquée dans l'endocytose, possiblement en jouant un rôle similaire à son homologue puisqu'elle colocalise avec plusieurs protéines endocytiques. On constate aussi que leur surexpression tout comme celle de l'intersectine-1 est responsable de l'inhibition de l'internalisation des récepteurs à la transferrine dans des vésicules de clathrine (Pucharcos et al, 2000). De plus, une l'intersectine-2l permettrait de relier WASP et Cdc42 avec le phénomène d'internalisation des récepteurs des cellules T activés grâce à son activité GEF (McGavin et al, 2001; Seifert et al, 2007).

### *Pacsine*

Une autre protéine très importante pour l'endocytose, mais qui n'est pas directement recrutée aux vésicules en formation via la clathrine et l'AP2 est pacsine. Cette protéine présente 3 isoformes appelées pacsine 1, 2 et 3 qui s'expriment respectivement dans le cerveau, de façon ubiquitaire ou encore concentrée dans les

poumons et les tissus musculaires dans le cas de pacsin 3. La surexpression de ces isoformes inhibe l'internalisation clathrine-dépendante de la transferrine, ce qui peut être récupéré par une mutation de leur domaine SH3. Ceci suggère qu'ils possèdent tous une fonction similaire qui est de recruter différentes protéines endocytiques via leur domaine SH3. Ces protéines sont hautement conservées et leur organisation est similaire. Pacsine 1 et 2 sont ainsi formées d'une séquence d'hélices  $\alpha$  suivie de 2 ou 3 motifs NPF respectivement et d'un domaine C-terminal SH3. Seule pacsine 3 diffère de la description générale en ce sens qu'elle contient un domaine PRD à la place des motifs NPF. Pacsin 3 est donc capable de lier des domaines SH3 impossibles à lier pour les autres isoformes qui pourront plutôt lier des motifs EH (Modregger et al, 2000). Des travaux permettent de mettre en évidence le rôle de pacsine 1 dans la régulation de l'endocytose et du cytosquelette d'actine. Ce rôle provient de l'interaction entre pacsine 1 et la protéine mSOS, une GEF qui comme nous l'avons mentionné dans le cas de l'intersectine est associée à la polymérisation de l'actine (Wasiak et al, 2001; Hall, 1998). De plus pacsine 1 serait aussi en mesure d'interagir avec la protéine huntingtin via son domaine SH3. Cette interaction n'est toutefois pas observée dans le cas des autres pacsines malgré la présence de leur domaine SH3 (Modregger et al, 2002). Par ailleurs, la majorité des informations que nous avons sur les pacsines 1 et 2 nous proviennent de leurs homologues chez le rat, soit les syndapines 1 et 2. Ces homologues interagissent avec la dynamine, ce qui implique que leur présence est nécessaire pour effectuer l'étape de la fission des vésicules de clathrine formées. De plus, les syndapines interagissent avec N-WASP qui, comme nous l'avons mentionné, leur confère une fonction dans

l'établissement du cytosquelette d'actine (Kessels et Qualmann, 2002; Kessels et Qualmann, 2004).

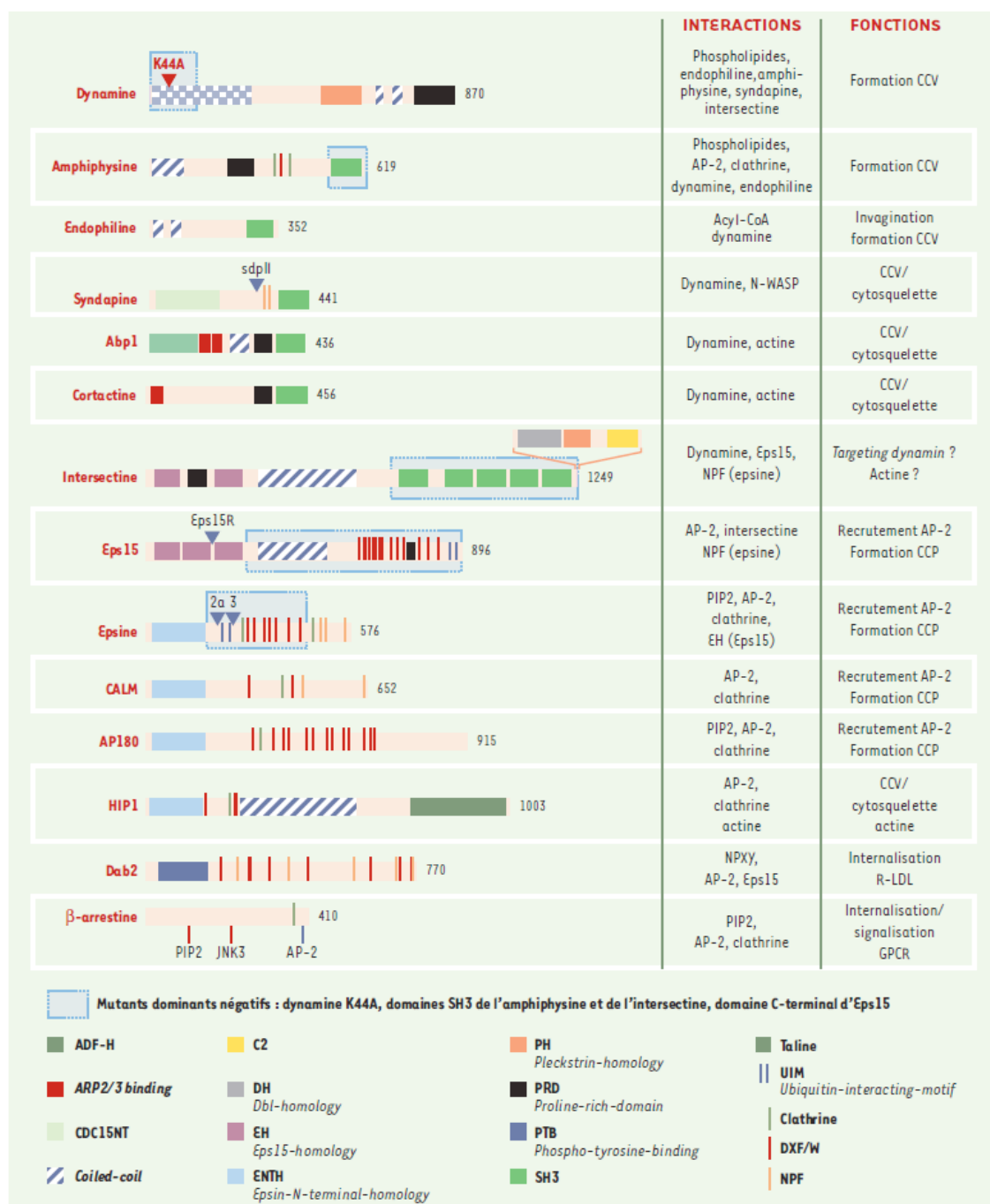
#### **1.4. Protéines à domaines SH3**

##### 1.4.1. Rôle des SH3 dans l'endocytose

On constate suite aux diverses descriptions des protéines endocytiques faites précédemment que l'endocytose est un phénomène dont les différentes étapes nécessitent l'établissement d'un réseau complexe de protéines agissant de concert pour permettre l'internalisation. Ce réseau de protéines repose essentiellement sur leur capacité à interagir entre elles. De plus, on constate que plusieurs des acteurs impliqués possèdent des domaines SH3 leur permettant diverses interactions. Ces liaisons joueraient un rôle majeur dans l'endocytose comme le démontrent plusieurs études (Figure 7) (Shupliakov et al, 1997; Gad et al, 2000).

En effet, la surexpression des domaines isolés d'endophiline A1, d'intersectine et d'amphiphysine II permet de faire compétition avec les protéines endogènes en les empêchant d'interagir avec leurs partenaires via ces domaines, causant une inhibition de l'internalisation de la Tfn (transferrine) *in vivo*. Ceci suggère la participation de ces domaines dans l'endocytose des récepteurs. De plus, des essais d'internalisation sur des cellules 3T3-L1 perméabilisées montrent une inhibition équivalente de l'internalisation de la Tfn par les domaines SH3 de l'endophiline A1 et de syndapine1, l'homologue de pacsine chez le rat. Ces dernières recrutent à la fois la dynamine et la synaptojanine, deux protéines impliquées dans les étapes tardives de l'endocytose, ce qui suggère un rôle de l'endophiline et de la synapine dans ce phénomène. L'intersectine, qui possède 5 domaines SH3 (A-E) montre une inhibition plus puissante de l'internalisation de Tfn dans





**Figure 7.** Structure de plusieurs protéines importantes dans l'endocytose par vésicule de clathrine. On constate que les motifs NPF, les domaines PRD ainsi que les domaines SH3 sont des domaines d'interactions très présents au sein des protéines formant le complexe protéique nécessaire à l'internalisation. Ces différents domaines permettent aux protéines de s'associer entre elles pour effectuer leurs fonctions (D'après Benmerah et Lamaze, 2002).

ces essais avec le premier de ses domaines SH3. Ce domaine possède aussi un effet plus marqué sur l'internalisation par rapport à ceux de l'amphiphysine II, endophiline A1 et syndapine1. D'autres essais ont aussi montré l'inhibition de l'endocytose à des stades distincts dans des cellules A431 perméabilisées. L'addition de GST-syndapine1 SH3 (glutathione S-transférase) à ces cellules provoque une inhibition très faible de l'endocytose tandis que GST-intersectine SH3A inhibe fortement le phénomène. Ces cellules peuvent facilement rétablir les événements précoces de l'endocytose, ce qui signifie que l'inhibition par l'intersectine SH3A affecte les événements précoces de l'endocytose. Le domaine SH3 de syndapine1, d'amphiphysine II, d'endophiline A1 et finalement les autres domaines SH3 de l'intersectine interviennent pour leur part dans les stades tardifs de l'endocytose (Simpson et al, 1999). Ceci est cohérent avec le recrutement de protéines impliquées dans les étapes finales de l'internalisation par le domaine SH3 de ces protéines. Endophiline, amphiphysine et pacsine vont ainsi recruter la dynamine afin de permettre la fission des vésicules tandis que l'endophiline et l'amphiphysine vont aussi recruter la synaptojanine impliquée dans le désassemblage du manteau de clathrine. L'endophiline et l'amphiphysine contiennent aussi un domaine BAR favorisant la courbure de la membrane plasmique, donc l'initiation de l'internalisation. La surexpression du domaine isolé ne permet cependant pas de faire compétition avec cette fonction puisque les stades précoces peuvent quand même survenir. Il semble donc que le domaine SH3 de ces protéines ne soit pas requis afin de permettre l'invagination de la membrane plasmique au début de l'endocytose (Simpson et al, 1999).

#### 1.4.2. Caractéristiques des domaines SH3

Les domaines protéiques de type SH3 constituent les motifs de reconnaissance privilégiés des séquences riches en prolines, et ce, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Whisstock et Lesk, 1999; Petsko et al, 2008). Ils sont constitués d'une séquence d'environ 60 acides aminés formant deux feuillets  $\beta$  antiparallèles disposés à angle droit comprenant aussi deux boucles variables appelées RT et n-Src. De façon classique, le ligand riche en proline contient une séquence PxxP (prolines avec au centre n'importe lequel acide aminé) qui sera reconnue par les 2 poches adjacentes formées au sein du domaine SH3 et liant chacune une séquence xP. Les résidus adjacents au PxxP permettront d'effectuer des liaisons supplémentaires avec les boucles RT et n-Src. La liaison entre le domaine SH3 et la séquence riche en prolines fera en sorte que cette dernière adopte une conformation en hélice PPII (polyproline type II) interagissant avec le domaine SH3 de façon très sélective sans pour autant être de très grande affinité. Cette particularité est essentielle aux interactions impliquées dans la signalisation où des changements rapides sont nécessaires (Zarrinpar et al, 2003; Li, 2005). On classe les domaines SH3 en 5 familles distinctes selon les séquences riches en prolines qu'elles seront en mesure de reconnaître, soit les SH3\_1 à 5 (Finn et al, 2008). Les SH3\_1 et 2 sont les plus connues et permettent de reconnaître respectivement des séquences proches du consensus (R/K)xxPxxP contenues dans les ligands de classe I et PxxPx(R/K) pour les ligands de classe II (Li, 2005). Les protéines endocytiques contenant un domaine SH3 décrites jusqu'à maintenant appartiennent toutes à ces deux grandes familles. Ainsi, le SH3 de pacsine et certains domaines SH3 de l'intersectine (le 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup>) appartiennent à la première classe de ligands tandis que les autres domaines de l'intersectine (3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup>) et le SH3 de l'endophiline et de l'amphiphysine appartiennent au second groupe (Finn et al,

2008). Cette classification générale ne tient toutefois pas compte d'exceptions dans la reconnaissance de séquences spécifiques. Ainsi, l'endophiline appartient à la classe II et l'on devrait s'attendre à ce qu'elle lie la synaptojanine sur une séquence identique au consensus alors qu'elle présente un site de liaison légèrement différent composé de PxRPPxPR (Cestra et al, 1999). De plus, l'exemple de la liaison de l'endophiline sur la dynamine présente aussi des irrégularités par rapport à la classification. L'endophiline lie une séquence de la dynamine contenant deux motifs classiques PxxP répétés en tandem sans toutefois correspondre au consensus. Finalement, la liaison de pacsine sur la dynamine présente ce même phénomène. Pacsine lie de la même façon un motif PxxP suivi d'une autre séquence non-PxxP (Anggono et al, 2007). On constate donc que le modèle classique de liaison des ligands sur des séquences consensus peut servir d'indications sur les sites possibles pouvant être liés par les domaines SH3. Toutefois, on ne peut prédire avec certitude la séquence site de liaison en fonction de la classification des SH3 tout comme on ne peut prédire la liaison d'une protéine contenant un tel domaine sur une séquence riche en proline contenant l'une ou l'autre des séquences consensus.

### **1.5. Objectifs et hypothèses**

Comme nous avons pu le voir précédemment, la ligase Itch est une protéine régulée de façon étroite et dont les rôles sont très variés. Cette protéine est impliquée de plusieurs manières dans l'endocytose des récepteurs RTKs. Cette action se fait via l'ubiquitylation des protéines Cbl et endophiline nécessaire à l'endocytose. Itch serait donc en mesure de contrôler le niveau cellulaire de ces protéines en induisant leur dégradation protéasomale, ce qui permettrait de limiter leur participation dans le

phénomène d'internalisation (Azakir et Angers, 2009). De plus, le fait qu'Itch soit le seul membre de sa famille à posséder un domaine PRD lui confère la possibilité d'interagir avec des protéines à domaines SH3, comme ce fut déterminé dans le cas de l'endophiline. Cette séquence est composée des acides aminés PSRPPRPSRPPPPTPRRP et contient les séquences consensus (R/K)xxPxxP et PxxPx(R/K) permettant son interaction avec les 2 principales classes de domaines SH3 (SH3\_1 et 2). Cette capacité tout comme la localisation endosomale d'Itch suggèrent une fois de plus son implication dans l'endocytose (Angers et al, 2004; Li, 2005).

Le but de la présente recherche est d'évaluer si Itch est capable d'interagir avec d'autres protéines endocytiques à domaines SH3. Nous nous sommes donc basés sur l'étude effectuée par Simpson afin de sélectionner des protéines SH3 intéressantes et jouant un rôle majeur dans l'internalisation par vésicules de clathrine (Simpson et al, 1999). C'est ainsi que nous avons entrepris d'évaluer l'interaction entre Itch et les protéines suivantes : endophiline, pacsine, amphiphysine et intersectine. Pour ce faire, nous avons tout d'abord employé la technique du BRET (bioluminescence resonance energy transfer) afin de déterminer si des interactions pouvaient être décelées.

La technique du BRET est une technique polyvalente permettant d'étudier l'interaction entre protéines tant chez les plantes, les bactéries et même les cellules de mammifères. Plusieurs études ont ainsi profité de cette technique pour observer la dimérisation de protéines ou encore l'interaction entre protéines membranaires ou cytosoliques. De plus, cette technique permet d'étudier de façon sensible et spécifique l'interaction entre protéines suite à l'addition d'un ligand. Le BRET permet aussi l'étude dans un modèle vivant puisque les substances nécessaires sont non-toxiques et que la

prise des mesures peut se faire sans lyser les cellules. Cette technique permet donc de suivre l'évolution de phénomènes biologiques *in vivo* et en temps réel (Pfleger et Eidne, 2003).

Nous avons donc entrepris de déterminer à l'aide du BRET l'interaction entre la ligase Itch et les protéines endophiline, pacsine, amphiphysine et intersectine. Étant donné les résultats obtenus dans le cas de l'endophiline ainsi que les résultats préliminaires réalisés par Dre Annie Angers, nous sommes en mesure de croire que la ligase pourra interagir avec ces différentes protéines (Angers et al, 2004). De plus, un autre objectif de nos travaux est de mettre en évidence les implications cellulaires d'une telle interaction avec la ligase. Une fois de plus, les résultats confirmant l'ubiquitylation d'endophiline par Itch et sa dégradation protéasomale laissent croire qu'il en sera de même pour l'intersectine, l'amphiphysine et pacsine (Azakir et Angers, 2009). Finalement, nous allons compléter les données obtenues par BRET à l'aide de techniques classiques telles que la chromatographie d'affinité ainsi que par immunobuvardage de type Western ou Far-Western (aussi nommé Overlay).

Cette étude nous a permis de constater l'interaction entre Itch et les protéines à domaines SH3 suivantes : endophiline, amphiphysine, pacsine et intersectine. De plus, sauf pour intersectine, nous avons été en mesure de déterminer que l'interaction était directe et menait à l'ubiquitylation des substrats. Nous avons aussi constaté que les domaines WW d'Itch n'avaient aucune influence sur ces interactions qui reposent toutes sur la présence du domaine PRD d'Itch. Finalement, nous avons pu déterminer que l'ubiquitylation de l'endophiline et de l'amphiphysine avait lieu sur le domaine responsable de leur interaction avec Itch, soit le domaine SH3.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. BRET

Le principe du BRET repose sur l'expression de deux protéines d'intérêt, l'une couplée à l'enzyme Renilla luciférase (rLuc) et l'autre à la Green Fluorescent Protein (GFP). Pour prendre les mesures, des cellules transfectées comme décrit à la section 2.2 sont traitées avec un substrat très perméable, la coelenterazine, qui est dégradée par les rLuc et émet de l'énergie (luminescence à 465-505 nm). Si GFP est située à moins de 100 Å de l'enzyme, l'énergie provenant de cette réaction induira la réémission d'énergie par GFP (fluorescence d'interaction), qui est mesurée à une longueur d'onde supérieure (505-555 nm). Cette technique permet donc d'évaluer différentes interactions protéiques *in vivo* en se basant sur la très grande proximité entre deux protéines (Pfleger et Eidne, 2003).

Dans cette étude, nous avons utilisé le BRET afin d'évaluer la capacité de la ligase Itch à lier certaines cibles potentielles. Pour ce faire, on utilise des cellules exprimant un niveau stable de protéine de fusion rLuc-Itch avec une concentration croissante de protéines d'intérêt fusionnées à la GFP. Afin de déterminer le niveau d'expression de ces protéines GFP, on mesure tout d'abord la fluorescence maximale émise à 530 nm lorsque toutes les GFP des cellules sont stimulées à l'aide d'un laser à 485 nm.

Ensuite, on ajoute aux cellules la coelenterazine, qui va être dégradée en présence de luciférases et ainsi émettra de l'énergie. La quantité d'énergie produite suite à l'addition de la coelenterazine est quantifiée en mesurant la luminescence à 465-505 nm, ce qui reflète le niveau d'expression des luciférases. En calculant le ratio entre la

fluorescence maximale, obtenue par la stimulation directe de GFP, et la luminescence des cellules, on évalue l'expression relative des protéines rLuc par rapport aux GFP. Cette valeur est rapportée sur l'axe des abscisses. Cette représentation permet de tenir compte des variations d'expression de la rLuc dans les différentes transfections, car même si la quantité de plasmide transfecté demeure fixe, l'expression réelle peut varier.

Le ratio BRET, quant à lui, représente le niveau d'interaction entre les protéines rLuc et GFP. Ce dernier est calculé en évaluant la quantité de fluorescence émise suite au transfert d'énergie par la luciférase en présence de coelenterazine (fluorescence d'interaction) et en divisant cette valeur par la quantité d'énergie émise par les luciférases pour tenir compte de la superposition des spectres. Cette valeur est rapportée sur l'axe des ordonnées. La mise en relation du ratio BRET avec le ratio d'expression fluorescence/luminescence permet d'obtenir une courbe logarithmique saturable dans le cas d'une interaction spécifique alors que les interactions non spécifiques auront plutôt l'allure d'une droite à faible pente (Pfleger et Eidne, 2003).

D'un point de vue plus technique, les différents essais de BRET ont été réalisés en transfectant des puits contenant  $2 \times 10^6$  cellules avec les ADN codant pour rLuc-Itch et les différentes protéines de fusion avec la GFP. 48 heures après la transfection, les cellules sont lavées dans du PBS (phosphate-buffered saline) puis resuspendues dans une solution Tyrode contenant 5 mM EDTA pour atteindre une concentration finale de  $10^6$  cellules/mL. La lecture de la fluorescence maximale est effectuée à 530 nm suite à l'excitation des GFP par un laser à 485 nm (FlexStation, Molecular Devices). On ajoute ensuite à ces cellules la coelenterazine (Biotium) à une concentration finale de 5  $\mu$ M avant de mesurer la luminescence (465-505 nm) et la fluorescence (505-555 nm) émise



en présence du substrat à l'aide d'un deuxième appareil (Mithras-LB-940, Berthold Technologies).

## 2.2. Plasmides et transfection cellulaire

Le plasmide encodant rLuc-Itch a été réalisé à l'aide des amorces suivantes : Itch, 5'-GAGAGGTACCAATGGGTAGCCTCACCATG-3' (Sens) et 5'-GAGAGGATCCTTACTCTTGTCCAAATCCTTC-3' (Antisens). La séquence est amplifiée par PCR à partir de la séquence codante d'Itch contenue dans le plasmide FLAG-Itch décrit précédemment (Angers et al, 2004) et est clonée dans le vecteur pHrLuc C1 à l'aide des enzymes KpnI et BamHI (Invitrogen). FLAG-Itch CA et les différentes constructions d'Itch clonées dans le vecteur pGEX-4T-1 (Amersham Bioscience) ont aussi été décrits auparavant (Angers et al, 2004). Ha-Ubiquitine (hemagglutinine) fut donné généreusement par Ted Dawson (John Hopkins University) tandis que His-Myc-Ubiquitine provient d'une étude antérieure (Ward et al, 1995). Finalement, les plasmides pcDNA3-Amphiphysine II et GFP-Amphiphysine II SH3 proviennent aussi d'études précédentes (Ramjaun et al, 1999; Simpson et al, 1999) tout comme les différentes constructions GFP : GFP-endophiline A1, GFP-endophiline SH3, GFP-intersectine 11, GFP-intersectine SH3 et GFP-Pacsine 1 (Angers et al, 2004; Ramjaun et al, 2001; Hussain et al, 2001; Tong et al, 2000; Simpson et al, 1999). Les différents plasmides furent transfectés dans des cellules HEK293T (human embryonic kidney 293T) à l'aide de la technique du calcium/phosphate avec 10 µg de plasmide/pétris de 10 cm tandis que les protéines de fusion GST furent toutes exprimées dans la lignée BL21 d'*Escherichia Coli* puis purifiées à l'aide de billes de glutathion-sépharose (Bio-World) (Kingston et al, 2003).

### **2.3. Anticorps**

Les anticorps polyclonaux dirigés contre l'amphiphysine (1874), l'endophiline (1903), l'intersectine (2173) et la GST ont été fournis par Dr McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University) et décrits précédemment (Ramjaun et al, 1997; Micheva et al, 1997; Hussain et al, 1999; McPherson et al, 1994). L'anticorps polyclonal contre la GFP provient d'Invitrogen. Les anticorps monoclonaux reconnaissant l'amphiphysine I/II et l'épitope Myc ont été achetés chez SantaCruz Biotechnology. Finalement, les anticorps monoclonaux anti Ha, FLAG et Itch proviennent respectivement de Biovision inc, Sigma-Aldrich et BD Biosciences.

### **2.4. Immunoprécipitation et chromatographie d'affinité**

L'extraction des pétris (10 cm) de cellules en culture surexprimant les différentes protéines nécessaires à notre étude s'effectue dans une solution A (20mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl et inhibiteurs de protéases) suite à leur lavage dans une solution de PBS. Les cellules sont ensuite lysées par sonication et on y ajoute du triton X-100 à une concentration finale de 1%. Les extraits obtenus sont agités à 4°C pendant 30 minutes avant d'être centrifugés à 45 000 rpm. Le surnageant recueilli constitue les échantillons protéiques prêts à être utilisés. L'extraction de protéines de cerveaux de rats adultes s'effectue en homogénéisant les tissus dans la solution A pour ensuite les centrifuger à 1000g pendant 10 minutes. Puis, on ajoute du triton X-100 à une concentration finale de 1% et on incube sous agitation à 4°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 150 000 rpm pendant 30 minutes avant de récupérer les surnageants obtenus. Ces différents extraits protéiques sont ensuite divisés en 2 parties. Tout d'abord, 10% du volume extrait est mis de côté pour être migré directement sur gel et ainsi

constituer le lysat cellulaire initial. L'autre fraction est plutôt utilisée pour la chromatographie d'affinité et va être quant à elle incubée avec des billes de glutathion-sépharose préalablement couplées avec 20 µg des différentes protéines de fusion entre Itch et GST produites chez des bactéries. De cette façon, les protéines surexprimées des cellules en cultures vont pouvoir se lier aux billes pendant l'incubation (environ 16 heures à 4°C) si celles-ci sont en mesure d'interagir avec les protéines de fusion fixées sur les billes. On effectue trois lavages des billes avec la solution A afin de ne conserver que les protéines présentant une interaction spécifique puis on sépare ces dernières sur gel de polyacrylamide en même temps que les lysats cellulaires initiaux. On transfère ensuite les protéines sur des membranes de nitrocellulose avant de procéder à l'immunobuvardage de type Western.

De façon similaire, les extraits utilisés pour l'expérience d'immunoprécipitation ont été préincubés avec les billes de protéines-A-sépharose afin d'enlever auparavant les protéines interagissant avec les billes de manière non spécifique. Par la suite, ces extraits sont incubés en présence de protéines-A-sépharose et d'anticorps tel que recommandé par le fabricant à 4°C pendant environ 16 heures. Les billes sont ensuite lavées dans une solution A contenant 1% de triton X-100 avant d'être préparées pour l'immunobuvardage de type Western.

## **2.5. Immunobuvardage de type Far Western**

Environ 200 µg d'extraits de cellules HEK293T non transfectées ou transfectées avec les différentes protéines SH3 sont séparées sur gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) de façon identique dans 3 séries de pistes différentes. Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose permet de

marquer la première série de pistes sera avec l'anticorps anti-GFP ou anti-amphiphysine, selon la protéine transfectée, afin d'en montrer la présence sur la membrane. Les deux autres séries de pistes sont auparavant incubées avec une solution contenant soit 50 pMol/mL de GST ou de GST-Itch PRD avant d'être lavées avec de la solution A pour ne laisser sur les membranes que les protéines de fusion GST s'étant fixées de manière spécifique. Puis, on marque les protéines immobilisées sur les membranes avec l'anticorps anti-GST, ce qui permet de vérifier la fixation de ces protéines à la membrane. Ainsi, une interaction entre les protéines GST et la protéine SH3 aura pour conséquence l'obtention d'un signal anti-GST spécifique et ce, à l'endroit même où avait eu lieu la détection de la protéine SH3 (avec anti-GFP ou anti-amphiphysine).

### 3. Résultats

#### 3.1. Identification des protéines à domaines SH3 impliquées dans l'endocytose et interagissant avec Itch

L'implication de la ligase Itch dans les mécanismes d'internalisation des récepteurs à l'EGF via son interaction avec les protéines endocytiques Cbl et endophiline est bien connue. Ces interactions sont responsables de l'ubiquitylation des substrats d'Itch menant ainsi à leur dégradation protéasomale. Itch possède ainsi la capacité de réguler la quantité de ces protéines présentes au sein des cellules, ce qui pourrait limiter leur participation au phénomène d'endocytose (Azakir et Angers, 2009). Cette caractéristique, tout comme la localisation endosomale d'Itch, suggère un rôle de cette protéine dans les mécanismes d'internalisation. Ceux-ci sont des événements hautement régulés qui nécessitent l'établissement d'un réseau d'interactions reposant sur la présence de divers domaines protéiques. Parmi ces domaines, on retrouve les SH3 qui jouent un rôle important dans la mise en place des divers acteurs endocytiques. Itch interagit justement via ce domaine avec l'endophiline, ce qui nous a amenés à nous interroger sur la possibilité d'interaction entre d'autres protéines possédant un tel domaine et la ligase.

Nous avons donc entrepris de comparer par BRET le niveau d'interaction dans des cellules vivantes entre la ligase Itch et les protéines suivantes : endophiline, pacsine, amphiphysine et intersectine. Nous avons utilisé pour ces essais des cellules HEK293T transfectées avec des plasmides codant d'une part pour la ligase fusionnée avec rLuc et d'autre part avec une des différentes protéines d'intérêt fusionnée avec la GFP. L'addition de coelenterazine aux cellules permet sa dégradation par rLuc et l'émission subséquente d'énergie non radiative pouvant être transférée aux GFP lorsque celles-ci sont situées à une très grande proximité ( $\leq 100\text{\AA}$ ) de rLuc, suivant l'interaction entre les

protéines de fusion. Le ratio BRET calculé pour chacune des conditions de transfection permet alors d'évaluer le niveau d'interaction entre les protéines d'intérêt. De plus, nous avons utilisé dans ces essais une quantité constante d'ADN pour la ligase en fusion avec rLuc mis en présence d'une quantité croissante d'ADN codant pour les protéines à domaine SH3 en fusion avec GFP. Certaines fusions GFP codaient la protéine entière tandis que d'autres ne contenaient que le domaine SH3. Cette façon de faire permet alors d'obtenir des données précises d'interaction dans différentes conditions allant de la seule présence de la ligase à l'expression d'Itch en présence d'une surexpression d'un de ses substrats. On obtient alors différentes valeurs de BRET selon le ratio de fluorescence/luminescence qui représente l'abondance relative des protéines l'une par rapport à l'autre.

La figure 8 résume les données obtenues pour les différentes protéines évaluées. Chacun des points de ces graphiques représente une lecture faite sur des populations de cellules transfectées de façon indépendante et présentant des taux quasi constants d'expression de rLuc-Itch avec un niveau variable de protéines-GFP. Ceci permet de suivre l'augmentation du signal BRET selon la variation du ratio fluorescence/luminescence. Cette technique nous a permis de confirmer *in vivo* l'interaction établie précédemment entre Itch et endophiline (Angers et al, 2004; Azakir et Angers, 2009). Nous observons en effet une augmentation du signal BRET entre ces protéines présentant la forme d'une courbe logarithmique saturable (Figure 8A). Ceci indique de façon typique une interaction spécifique entre les deux protéines. À l'inverse, un transfert d'énergie non spécifique apparaissant selon l'augmentation de l'expression des protéines l'une par rapport à l'autre devrait plutôt donner une allure de droite

possédant une pente faible. Ceci est représenté sur les différents graphiques par le contrôle présentant l'augmentation du ratio BRET en l'absence d'interaction entre Itch et la protéine GFP. De plus, le ratio de fluorescence/luminescence auquel la valeur du BRET atteint 50% de son maximum ( $BRET_{50}$ ) est un indice de l'affinité entre les protéines. Plus l'affinité entre les protéines est grande, plus le  $BRET_{50}$  est atteint à un faible ratio fluorescence/bioluminescence. La valeur maximale de BRET atteinte, quant à elle, est influencée par la quantité d'interactions présentes au sein de la cellule ainsi que la distance séparant les protéines de fusion GFP et rLuc (Perroy et al, 2004; Mercier et al, 2002). Nous pouvons aussi confirmer par BRET l'interaction entre Itch et pacsine, qui présente elle aussi une courbe semblable atteignant toutefois de niveaux beaucoup plus faibles, mais tout de même appréciables. On constate que l'affinité d'Itch pour l'endophiline est plus grande puisque la courbe augmente de façon plus prononcée permettant ainsi d'atteindre la valeur de  $BRET_{50}$  à un ratio de fluorescence/luminescence plus faible. De plus, le niveau d'interaction entre Itch et l'endophiline est significativement supérieur à celui observé dans le cas de pacsine, comme le représentent les valeurs maximales de BRET atteinte près de la saturation (Figure 8A).

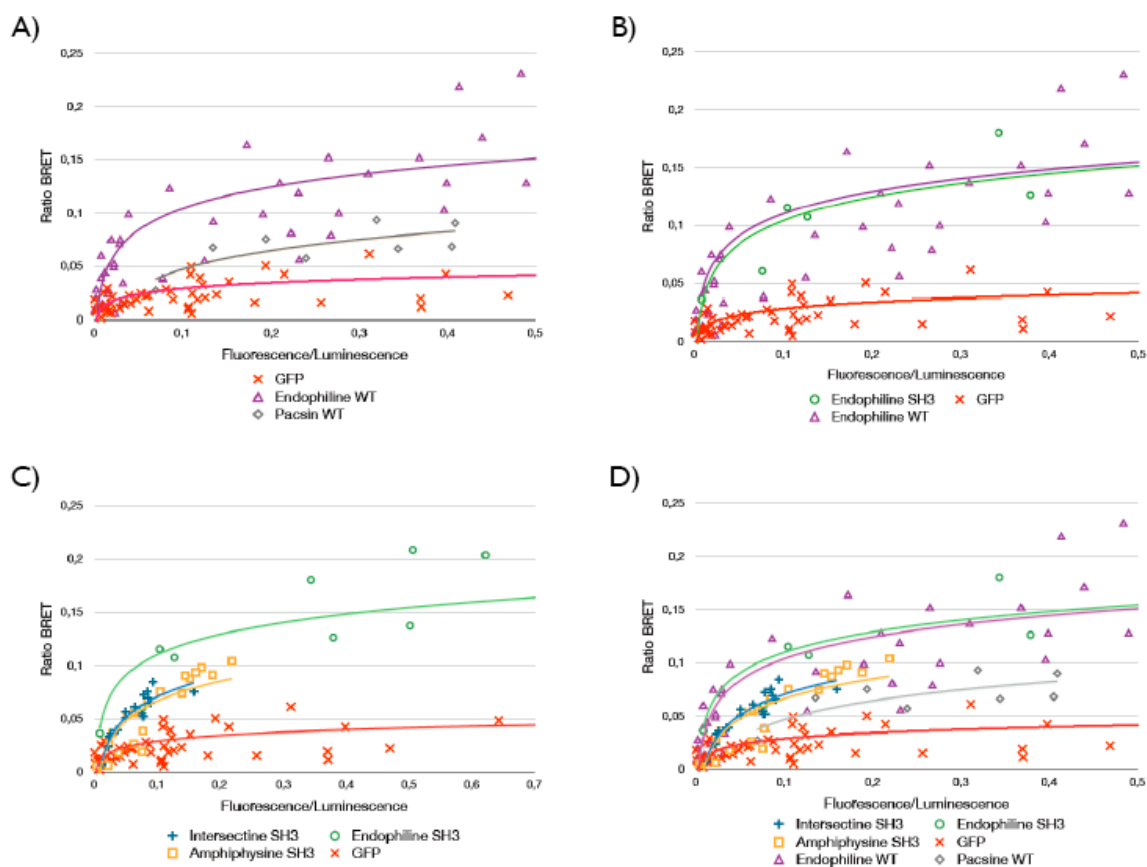
Nous avons ensuite voulu appliquer cette technique afin de déterminer le rôle joué par le domaine SH3 dans l'interaction entre Itch et l'endophiline pour voir si d'autres parties de la protéine pouvaient y contribuer. Nous avons donc mis en relation les données obtenues avec l'endophiline WT (wild-type - forme complète) avec celle provenant d'expériences utilisant seulement le domaine SH3 de l'endophiline fusionnée avec GFP. Nous pouvons ainsi confirmer que le domaine SH3 semble être le seul responsable puisque les deux courbes se superposent presque parfaitement. Ceci indique

une affinité et un niveau d'interaction similaire entre la ligase et le domaine SH3 isolé de l'endophiline ou celui contenu dans la protéine complète (Figure 8B). Cette constatation pourrait signifier que l'interaction entre Itch et ses substrats à domaines SH3 repose essentiellement sur la présence de ces derniers ou du moins qu'ils jouent un rôle majeur dans l'interaction.

Nous avons ensuite entrepris de tester directement l'interaction entre la ligase et les domaines SH3 provenant des autres protéines : l'intersectine et l'amphiphysine. Ces valeurs sont représentées avec celles provenant des essais sur le domaine SH3 de l'endophiline à la figure 8C. On peut ainsi facilement comparer le comportement de la ligase interagissant avec les différents domaines testés. On constate tout d'abord qu'Itch est en mesure d'interagir avec les domaines SH3 provenant de l'amphiphysine et de l'intersectine. De plus, le BRET nous permet de comparer les différentes valeurs obtenues et de constater que l'affinité et l'interaction de la ligase pour le SH3 de l'endophiline est supérieure à celles des autres domaines SH3, comme c'était le cas lors de la comparaison entre l'endophiline WT et la protéine pacsine. On peut donc présumer que l'interaction entre Itch et ces protéines serait inférieure à celle observée dans le cas de l'endophiline. Il faut toutefois tenir compte du fait que les domaines SH3 des protéines complètes peuvent adopter une conformation particulière in vivo les rendant plus ou moins accessibles. Des essais impliquant les formes WT des protéines demeurent donc nécessaires afin de pouvoir comparer les différentes interactions entre elles. On peut cependant conclure que l'interaction avec les domaines SH3 isolés de l'amphiphysine et l'intersectine est similaire, tel que démontré par la ressemblance des courbes. On peut aussi confirmer que ces domaines présentent une affinité et un niveau d'interaction



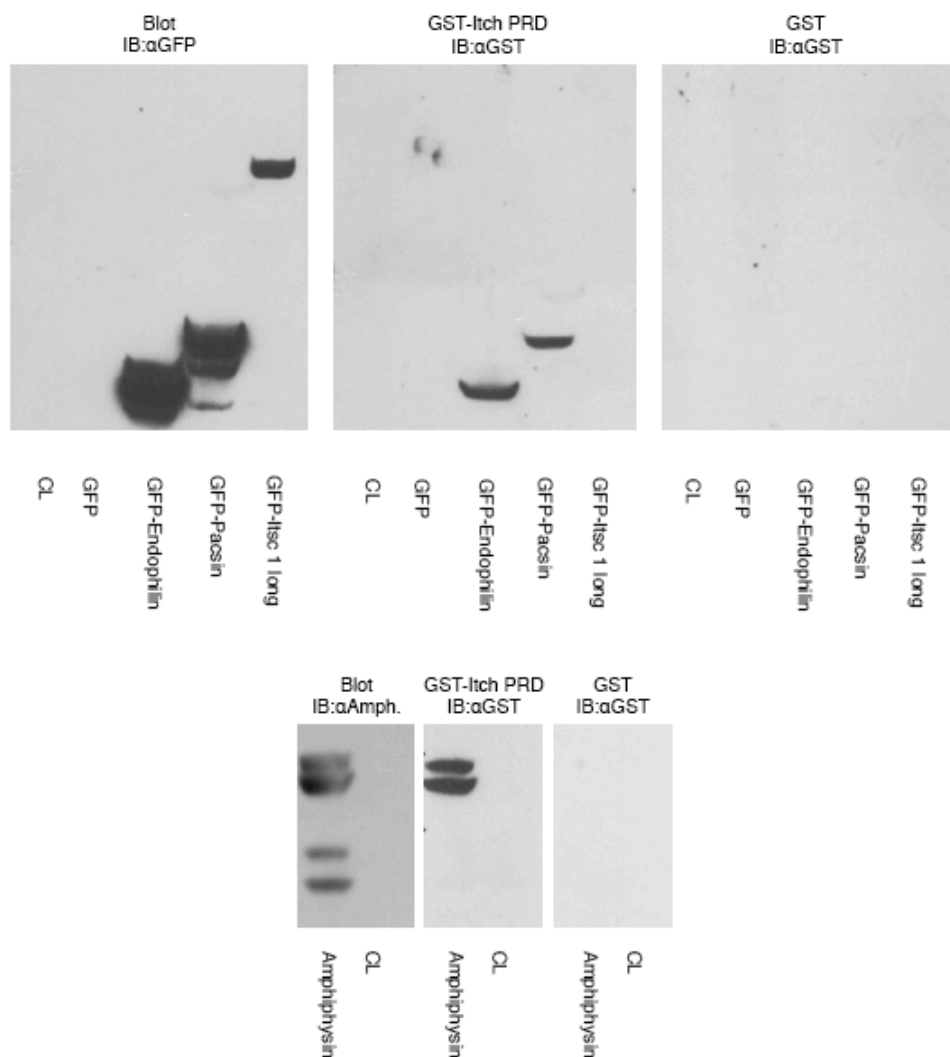
moindres par rapport à l'endophiline SH3. De plus, la comparaison de toutes ces données permet de voir que l'endophiline est le substrat principal d'Itch parmi les différentes protéines et domaines utilisés et que pacsine est la protéine montrant les valeurs les plus faibles (Figure 8D).



**Figure 8. Vérification de l'interaction entre Itch et différentes protéines à domaine SH3 par BRET.** Des cellules HEK-293T sont transfectées avec des quantités constantes de rLuc-Itch et différentes concentrations pour les protéines marquées à la GFP. (A) Ceci permet de confirmer et de comparer l'interaction entre Itch et endophiline ou pacsine par l'obtention de courbes saturables typiques d'une interaction spécifique. (B) L'interaction entre le domaine SH3 isolé ou l'endophiline complète montre un comportement similaire. (C) Itch interagit avec différents domaines SH3 de façon différentielle avec des niveaux plus élevés pour le domaine SH3 de l'endophiline. (D) La superposition des différentes données obtenues.

### **3.2. Confirmation de l'interaction directe entre Itch et les différentes protéines à domaines SH3 par immunobuvardage de type Far-Western**

Les résultats précédents confirment la très grande proximité entre Itch et les différentes protéines évaluées, ce qui suggère fortement leur interaction au sein des cellules. Nous avons donc voulu confirmer que ces résultats provenaient d'une interaction directe entre les protéines, ce qui ne peut être démontré que par des essais *in vitro*. Pour ce faire, nous avons utilisé des extraits de cellules HEK293T exprimant les différentes protéines testées que nous avons migrés sur gel SDS-PAGE puis immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière fut alors incubée avec des extraits de GST et de GST-Itch PRD, le domaine contenant les séquences reconnues par les SH3 (figure 9). Les protéines s'étant liées à la membrane furent par la suite détectées à l'aide d'anticorps anti-GST. Cette expérience nous a permis de confirmer l'interaction directe entre le domaine PRD d'Itch et les protéines suivantes : endophiline, pacsine et amphiphysine. Nous n'avons toutefois pas été en mesure de détecter l'interaction entre Itch et l'intersectine. Cette constatation nous surprend puisque les résultats obtenus par BRET montraient une interaction entre les domaines SH3 de l'intersectine et la ligase Itch. Ceci pourrait s'expliquer en partie par la plus faible expression de l'intersectine par rapport aux autres protéines étudiées. Ces dernières présentent des niveaux de surexpression beaucoup plus élevés (panneau anti-GFP) permettant de détecter des bandes d'intensité plus faible dans le cas de la membrane incubée avec GST-Itch PRD. Le niveau d'intersectine tel qu'il est visible sur le panneau révélé avec l'anti-GFP ne permettrait donc pas la fixation suffisante de protéines nécessaires à leur détection. De plus, cette différence au niveau de l'expression relative proviendrait de la très grande taille de

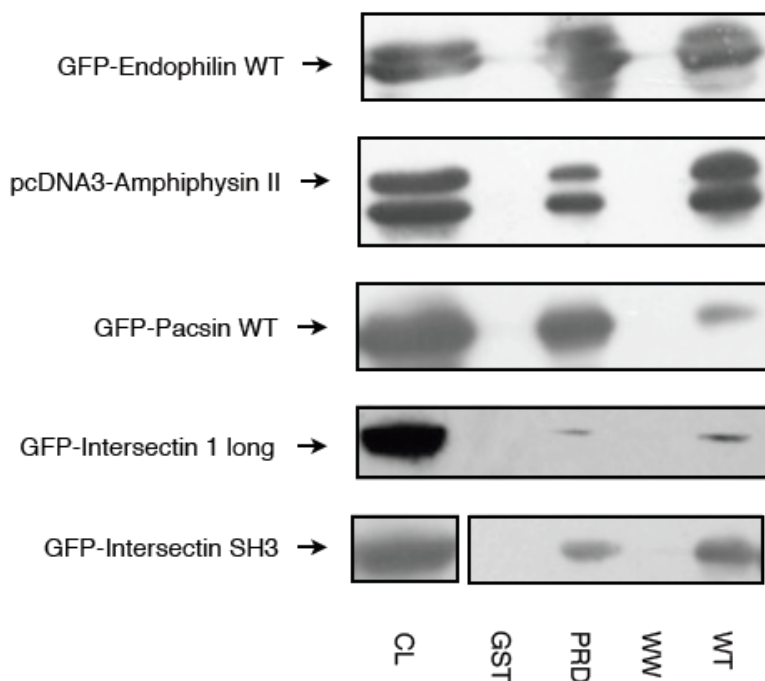


**Figure 9. Itch interagit de façon directe avec l'endophiline, l'amphiphysine et paccine.** Un immunomarquage de type Far-Western a été effectué avec les protéines de fusion GST et GST-Itch PRD sur des extraits de cellules HEK293T non transfectées (CL) ou transfectées avec GFP, GFP-endophiline, GFP-paccine, GFP-intersectine ou pcDNA3-amphiphysine. Les extraits réalisés en triplicats ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. La première série fut directement marquée (IB) avec l'anticorps anti-GFP (panneau du haut) ou anti-amphiphysine (panneau du bas) pour montrer l'expression des différentes protéines (Blot). Les autres membranes furent incubées préalablement avec 50 pmol/ml de protéine de fusion GST-Itch PRD ou GST avant d'être marquées avec l'anticorps contre GST afin de montrer la liaison des protéines de fusion. Les pistes des extraits non transfectés servent ici de contrôle pour montrer la spécificité de la liaison.

l'intersectine, ce qui rendrait son expression plus difficile. Finalement, l'absence d'un niveau appréciable d'interaction directe de l'intersectine pourrait aussi provenir d'une conformation particulière de la protéine rendant ses domaines SH3 moins accessibles. En effet, la renaturation de l'intersectine lors de son transfert sur la membrane pourrait nuire à sa liaison avec Itch lorsqu'elle présente sa conformation native (Wu et al, 2007). Ceci permettrait en plus d'expliquer les résultats obtenus par BRET démontrant une interaction avec les domaines isolés. D'autres essais de BRET avec la forme complète d'intersectine seront donc nécessaires pour conclure si une interaction directe est possible *in vivo* entre Itch et l'intersectine par rapport à l'interaction observée avec les domaines SH3 isolés de cette protéine.

### **3.3. Identification des domaines de la ligase Itch impliqués dans l'interaction avec les protéines SH3.**

Nos résultats de BRET nous permettent de conclure jusqu'à maintenant qu'Itch est en mesure d'interagir avec les domaines SH3 isolés ou les formes complètes de l'endophiline, l'amphiphysine, l'intersectine et pacsine. Ces interactions sont confirmées par immunobuvardage de type Far-Western démontrant le lien direct établi entre Itch et ces différentes protéines SH3. Qu'en est-il cependant quant aux domaines d'Itch impliqués dans ces interactions? Nos résultats démontrent que le domaine PRD d'Itch peut reconnaître l'endophiline, l'amphiphysine et pacsine immobilisées sur des membranes de nitrocellulose. Par contre, nous ne savons toujours pas si d'autres domaines peuvent contribuer à cette liaison. Nous avons donc voulu tester l'interaction entre différents domaines d'Itch et les protéines SH3 par chromatographie d'affinité. Nous avons ainsi comparé l'interaction entre ces protéines et la forme complète d'Itch,



**Figure 10. Itch interagit avec les différentes protéines à domaines SH3 via son domaine PRD.** Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide des anticorps anti-amphiphysine ou anti-GFP. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Les autres pistes représentent les protéines de ces mêmes extraits s'étant liées suite à leur incubation avec des billes de glutathionosépharose couplées aux protéines de fusion GST, GST-Itch PRD, GST-Itch WW ou GST-Itch WT.

son domaine PRD isolé ou encore ses 4 domaines WW isolés (figure 3). Le choix du domaine PRD était évident étant donné les résultats obtenus précédemment. Les domaines WW pouvaient aussi constituer des candidats potentiels étant donné qu'ils permettent à Itch et aux autres membres de sa famille d'établir une foule d'interactions avec des protéines contenant généralement de petits motifs PPXY (Otte et al, 2003). Nous avons donc incubé différentes protéines de fusion avec des billes de glutathionosépharose afin de fixer ces dernières aux billes. Puis, nous avons extrait les protéines de cellules HEK293T transfectées au préalable avec les différentes protéines dont nous

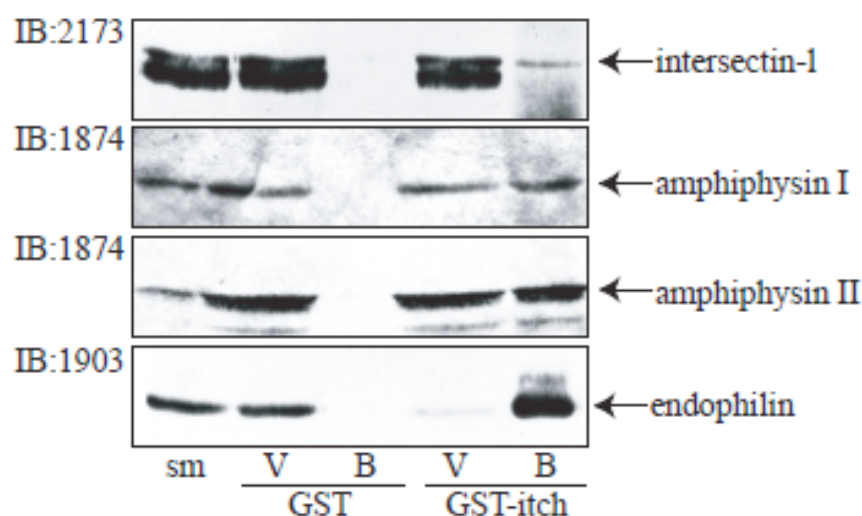
vouliions tester l'interaction. Ces extraits ont ensuite été incubés avec les différentes billes obtenues et les protéines s'y étant liées ont été résolues sur gel SDS-PAGE. La figure 10 résume les résultats obtenus pour les différentes protéines. On constate ainsi l'interaction entre la forme complète d'Itch et de son domaine PRD isolé avec chacune des protéines étudiées. Tandis que le contrôle GST et les domaines WW isolés ne montrent aucune interaction. Ce résultat confirme que les différentes protéines à l'étude interagissent avec la ligase Itch via une interaction médiée par leurs domaines SH3 avec la région PRD d'Itch.

De plus, il est intéressant de noter que le taux de récupération des protéines par les billes est très élevé dans le cas de l'endophiline, l'amphiphysine et de pacsine. Par comparaison, la quantité d'intersectine immobilisée par les billes GST-Itch est très faible. Nous avons évoqué précédemment la possibilité que l'intersectine adopte une conformation particulière rendant ses domaines SH3 moins disponibles pour leur interaction avec la ligase Itch. En effet, on observe un niveau très faible de récupération de l'intersectine par les protéines de fusion, et ce, malgré un niveau adéquat d'expression. Nous avons donc voulu vérifier l'interaction entre les protéines de fusion et les domaines SH3 isolés de l'intersectine. Ces résultats montrent un taux appréciable de récupération de ces domaines isolés, ce qui confirme les résultats obtenus par BRET pour ces domaines et l'absence de détection d'interaction directe avec la protéine complète par Far-Western. Il sera nécessaire de vérifier par Far-Western si l'interaction entre les domaines SH3 d'intersectine et Itch est bel et bien directe.

### **3.4. Identification d'interactions entre la ligase Itch et différentes protéines SH3 provenant d'extraits de cerveau de rat par chromatographie d'affinité**

Nous avons vu suite aux différents essais de chromatographie d'affinité que la ligase Itch est en mesure d'interagir avec les différentes protéines SH3 produites suite à la transfection de cellules en culture. Nous avons maintenant voulu déterminer si de telles interactions pouvaient être détectées de la même façon en utilisant cette fois comme produit de départ des extraits de cerveau de rat. Ceux-ci présentent l'avantage que les protéines qu'ils contiennent sont telles qu'on les retrouve au sein des tissus et sont présentes dans les extraits à des niveaux physiologiques. Nous avons donc placé ces extraits avec des billes préalablement incubées avec les protéines de fusion GST ou GST-Itch afin de récupérer les protéines s'y étant liées. La figure 11 représente les données obtenues suite à la séparation des protéines sur gel SDS-PAGE et leur détection à l'aide d'anticorps spécifiques. Nous pouvons ainsi conclure qu'Itch interagit avec l'intersectine-1, l'endophiline de même qu'avec les deux isoformes d'amphiphysine présentes dans les extraits de cerveau. De plus, on constate que les protéines de fusion GST-Itch sont très efficaces pour récupérer l'endophiline ainsi que les deux amphiphysines. Ceci est confirmé par la piste correspondant aux protéines liées par les billes (B) qui montre un niveau supérieur ou égal de protéines récupérées par rapport à la piste correspondant aux protéines résiduelles contenues dans les extraits suite à leur incubation avec les billes (V). De plus, on observe un faible taux d'interaction entre Itch et l'intersectine-1, ce qui confirme les résultats obtenus dans le cas de la chromatographie d'affinité réalisée auparavant sur les extraits de cellules. En effet, la piste B a été en mesure de lier une faible quantité de protéines par rapport à ce qui était contenu dans l'extrait de cerveau

mis à incuber avec les billes. Ceci pourrait provenir de la faible affinité de la ligase Itch pour l'intersectine de par son adoption d'une conformation limitant l'interaction ou encore suggérer que le lien entre Itch et intersectine serait indirect. Le complexe protéique permettant leur relation serait alors trop faible pour permettre la récupération satisfaisante d'intersectine à l'aide de cette technique et ainsi expliquer la nature des résultats obtenus.



**Figure 11.** La ligase Itch est en mesure de lier les différentes protéines à domaines SH3 exprimées de façon endogène dans le cerveau de rats. Des extraits de cerveaux présentant des niveaux variables d'expression des protéines endogènes (sm) ont été incubés avec des billes de gutathion-sépharose liées aux protéines de fusion GST ou GST-Itch afin de vérifier leur liaison. La fraction des protéines liées aux billes (B) montre leur interaction avec les protéines de fusion GST-Itch alors que les protéines non récupérées par les billes sont représentées dans une autre piste (V). Les différentes protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis détectées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques.

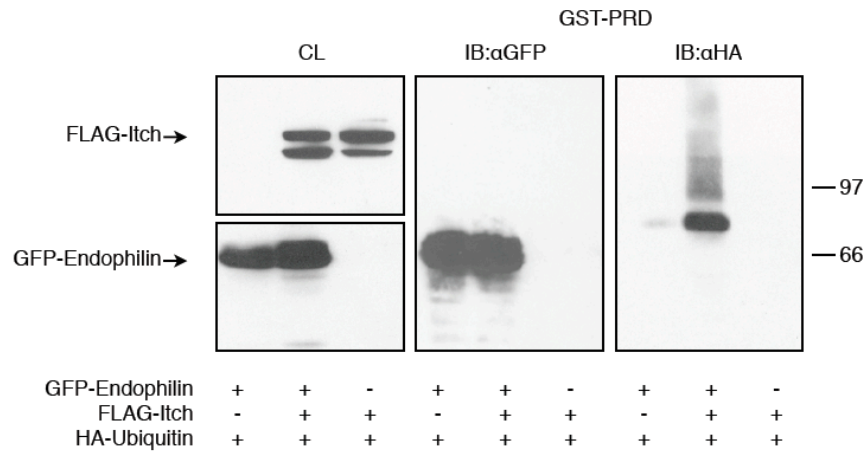


### **3.5. La ligase Itch est responsable de l'ubiquitylation des protéines SH3 interagissant avec elle**

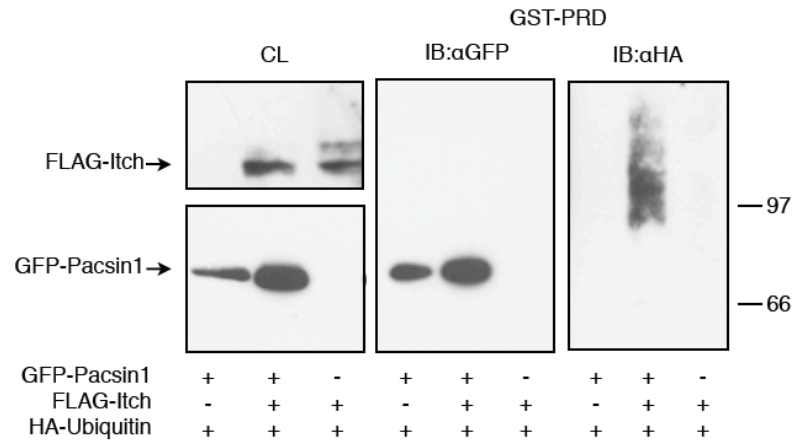
Les données présentées jusqu'à maintenant permettent de conclure à des interactions entre la ligase Itch et les différentes protéines à domaine SH3; endophiline, pacsine, amphiphysine et, dans une moindre mesure, intersectine. Nous avons donc voulu en savoir plus sur l'effet d'une telle interaction sur les substrats de la ligase. Des travaux ayant démontré la capacité d'Itch à ubiquityler endophiline et Cbl (Azakir et Angers, 2009), deux de ses substrats impliqués dans l'endocytose, nous avons voulu déterminer si des essais de chromatographie d'affinité permettraient de détecter un tel effet sur les nouveaux substrats découverts dans la présente étude. Nous avons utilisé ici des extraits de cellules HEK293T transfectées avec des combinaisons de FLAG-Itch, Ha-Ub et GFP-endophiline ou GFP-pacsine. Ces extraits ont été placés avec des billes incubées au préalable avec les protéines de fusion GST-Itch PRD afin de lier les protéines interagissant avec elles. Cette technique permet donc de récupérer les protéines marquées par GFP pour ensuite vérifier la présence d'ubiquitine sur ces protéines dans les pistes surexprimant Itch. La figure 12A montre ainsi l'ubiquitylation de l'endophiline seulement dans la piste surexprimant l'endophiline en combinaison avec l'ubiquitine et la ligase. Cette ubiquitylation n'est pas visible lorsque l'on ne surexprime pas la ligase ou encore l'endophiline, confirmant la spécificité de la réaction et le rôle d'Itch dans ce phénomène. La figure 12B montre elle aussi un tel phénomène. On constate là encore l'ubiquitylation de pacsine seulement lorsque l'ubiquitine, la ligase et pacsine sont surexprimées. La figure 12C fut réalisée de manière un peu différente. Cette fois, les extraits de cellules HEK293T surexprimant les différentes protéines étaient incubés avec des billes de protéine A Sépharose couplées à des anticorps spécifiques pour

l'amphiphysine afin de lier cette protéine et vérifier son ubiquitylation. De cette façon, nous avons été en mesure de récupérer l'amphiphysine à partir de cellules surexprimant l'ubiquitine en présence ou non de surexpression de la ligase. Ceci permet d'observer que l'amphiphysine immunoprécipitée ne montre une ubiquitylation que lorsque la ligase est présente, ce qui confirme le rôle d'Itch dans ce phénomène. La figure 12 nous renseigne donc sur l'effet de l'interaction entre Itch et endophiline, amphiphysine et pacsine. Nous pouvons alors conclure que ces protéines sont spécifiquement ubiquitylées par la ligase suite à leur interaction avec celle-ci. Nous ne pouvons toutefois pas déterminer l'effet d'une telle ubiquitylation, à savoir si elle cause la dégradation protéasomale de ces substrats comme ce fut déterminé pour Cbl et endophiline dans l'étude réalisée par Azakir et Angers en 2009. On peut cependant présumer que l'effet sur pacsine et amphiphysine serait similaire et qu'Itch serait en mesure de réguler l'expression de protéines jouant un rôle majeur dans l'endocytose et ainsi d'affecter indirectement la signalisation cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous procéderons à des essais de chromatographie d'affinité entre les protéines de fusion GST-Itch PRD et des extraits cellulaires surexprimant ou non la ligase Itch. L'utilisation dans cette expérience d'un inhibiteur des protéasomes, la lactacystine, permettra d'inhiber la dégradation des protéines ubiquitylées par Itch. De cette façon, nous serons en mesure de conclure à la dégradation des protéines SH3 si l'on observe l'accumulation de la forme ubiquitylées de ces protéines en présence de l'inhibiteur, et ce, seulement si la ligase Itch est surexprimée.

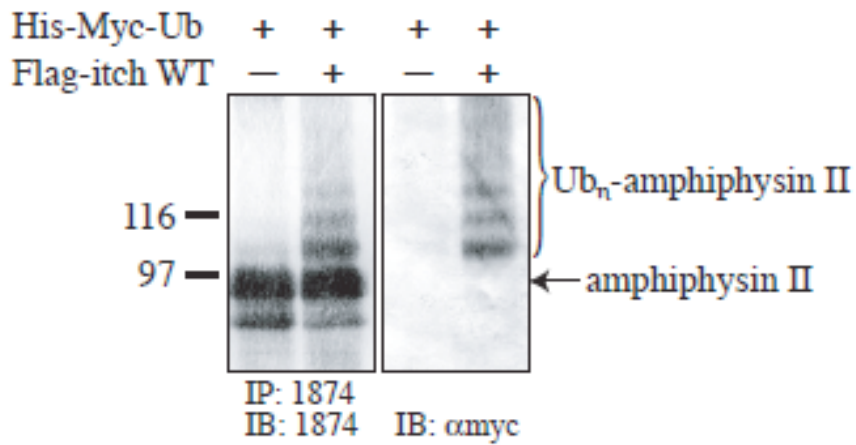
A)



B)



C)

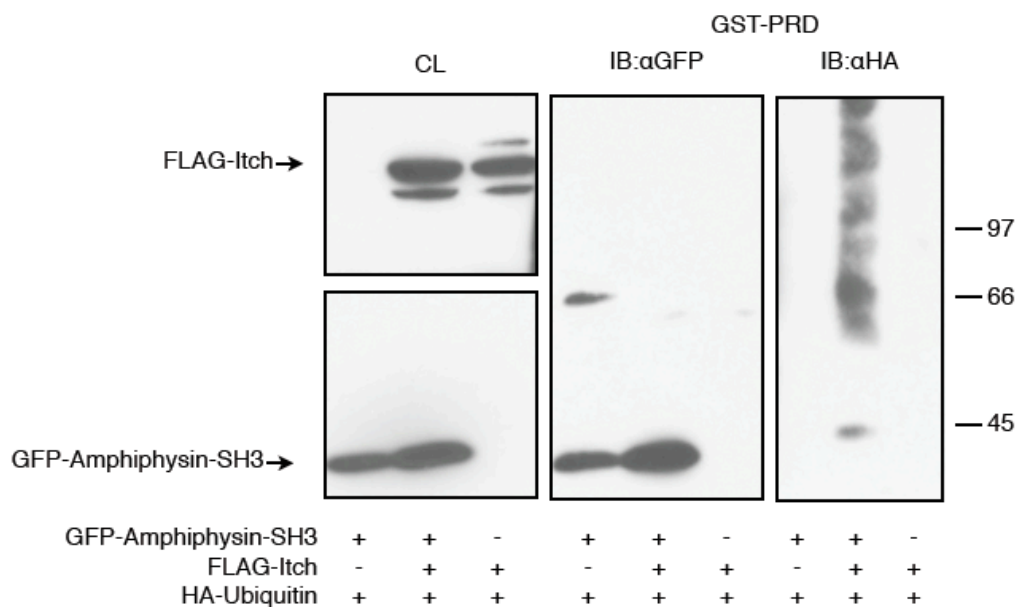


**Figure 12. La ligase Itch est responsable de l'ubiquitylation de plusieurs protéines à domaine SH3.** Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide d'anticorps spécifiques. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Le panneau du centre (anti-GFP) montre la récupération de ces protéines par des billes de glutathion-sépharose couplées à GST-Itch PRD. Le marquage anti HA montre finalement l'ubiquitylation de l'endophiline (A) et de pacsine (B) en présence de la ligase. (C) Des extraits cellulaires surexprimant l'amphiphysine ont été immunoprécipités puis séparés sur gel SDS-PAGE et marqués à l'aide d'anticorps contre cette protéine (1874) (panneau de gauche) pour en montrer la récupération. Le panneau de droite représente l'ubiquitylation des protéines récupérées à l'aide de billes de protéine-A-sépharose couplées à 1874 et marquées sur la membrane à l'aide d'anti-myc.

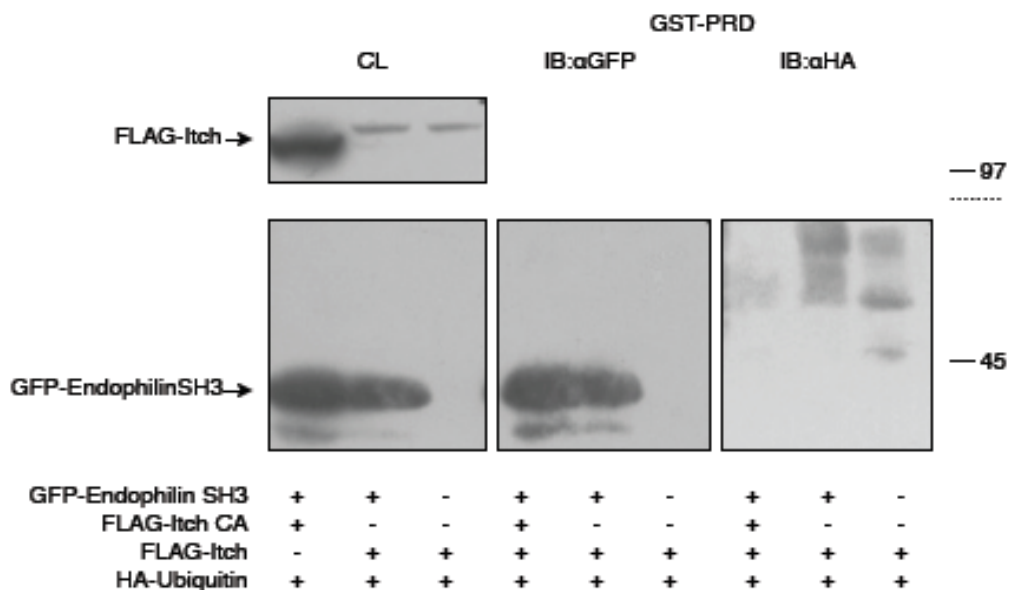
### 3.6. Identification des domaines ubiquitylés par la ligase Itch

L'orthologue de l'amphiphysine/endophiline chez la levure, Rvs167, est ubiquitylé par une ligase homologue à Itch, Rsp5p (Stamenova et al, 2004). Ces travaux avaient permis de déterminer que le site accepteur de l'ubiquitine sur Rvs167 est localisé sur son domaine SH3. Pour déterminer s'il en est de même pour endophiline et amphiphysine chez les mammifères, nous avons utilisé des extraits de cellules HEK-293T surexprimant une combinaison de protéines FLAG-Itch, Ha-Ub et GFP-Endophiline SH3 ou GFP-Amphiphysine SH3. De la même façon que pour les expériences décrites à la section 3.5, nous avons placé ces extraits avec des billes pré incubées avec des protéines de fusion GST-Itch PRD afin de récupérer les protéines s'y liant. Nous sommes ainsi en mesure de récupérer les domaines SH3 isolés afin de vérifier leur ubiquitylation. La figure 13A montre ainsi l'ubiquitylation du domaine SH3 d'amphiphysine en présence d'Itch et d'ubiquitine. Ceci n'est pas observable lorsque la ligase ou l'amphiphysine ne sont pas surexprimées, confirmant que l'ubiquitylation est causée par Itch et est spécifique pour la protéine étudiée. La figure 13B est réalisée sensiblement de la même

A)



B)



**Figure 13.** La ligase Itch ubiquityle l'endophiline et l'amphiphysine sur leur domaine SH3. Des extraits de cellules transfectées avec les protéines indiquées ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis marqués à l'aide d'anticorps spécifiques. Les extraits cellulaires non traités (CL) montrent l'expression des différentes protéines surexprimées. Le panneau du centre (anti-GFP) montre la récupération de ces protéines par des billes de glutathion-sépharose couplées à GST-Itch PRD. Le marquage anti HA montre finalement l'ubiquitylation de l'amphiphysine SH3 (A) et de l'endophiline SH3 (B) en présence de la ligase.

façon, avec pour seule différence que la première piste est transfectée cette fois avec FLAG-Itch CA, une forme mutée de la ligase ne présentant pas d'activité catalytique et donc incapable d'ubiquityler ses substrats. Cette figure montre l'ubiquitylation de l'endophiline SH3 en présence de la ligase intacte (WT) et d'ubiquitine, ce qui n'est pas visible lorsque la forme mutée d'Itch est présente. La piste surexprimant la ligase WT et l'ubiquitine seules montre elle aussi un certain degré d'ubiquitylation ce qui pourrait laisser planer un doute sur l'ubiquitylation spécifique de l'endophiline SH3. On peut toutefois présumer que ce marquage est jusqu'à un certain point un artefact puisque le même contrôle fut employé dans plusieurs autres expériences sans jamais démontrer un tel comportement. De plus, on constate que la surexpression d'Itch dans cette expérience est très faible si on la compare au niveau de FLAG-Itch CA de la première piste. On peut donc présumer qu'une expression plus forte de la ligase permettrait d'augmenter le contraste et ainsi augmenter la fiabilité de nos résultats. La figure 13 permet donc de conclure à l'ubiquitylation du domaine SH3 de l'amphiphysine par Itch et suggère aussi fortement un tel comportement en ce qui concerne l'endophiline.

## 4. Discussion

### 4.1. Itch interagit avec endophiline, CIN85 et $\beta$ -PIX via leur domaine SH3

La protéine Itch joue un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires importantes. Son activité ligase lui permet de modifier ses substrats en leur ajoutant de l'ubiquitine, menant ainsi à leur dégradation protéasomale. Itch est donc en mesure de réguler l'expression de plusieurs protéines, et ainsi d'affecter les fonctions accomplies par celles-ci. Ce rôle de régulateur repose sur les capacités d'Itch à interagir avec ses différents partenaires. La grande majorité de ces protéines établissent des liens avec Itch de façon classique via l'un de ses 4 domaines WW. C'est le cas notamment de Cbl, une autre ligase responsable de l'ubiquitylation des récepteurs à l'EGF nécessaire à leur internalisation (Azakir et Angers, 2009). Itch possède aussi une caractéristique intéressante par rapport aux autres membres de sa famille. En effet, Itch est la seule ligase faisant partie des Nedd4 qui possède un domaine PRD. Ce dernier lui permet d'interagir avec le domaine SH3 et confère donc à Itch la possibilité d'interagir avec une gamme plus vaste de partenaires. Ce type de liaison est toutefois peu étudié pour l'instant. Il fut observé pour la première fois entre Itch et l'endophiline, une protéine impliquée dans la courbure de la membrane plasmique via l'action de son domaine BAR (Angers et al, 2004). Itch est aussi en mesure d'interagir via son domaine PRD avec le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX ( $\beta$ -p21-activated kinase-interactive exchange factor). Cette protéine est impliquée dans l'activation de la protéine Rac, une petite GTPase permettant l'activation de différentes voies de signalisation. Il est intéressant de noter que le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX est phylogénétiquement similaire aux 3 domaines SH3 de CIN85 (Janz et al, 2007). Cette protéine est impliquée dans l'endocytose des récepteurs à l'EGF via la formation du complexe Cbl-CIN85-

endophiline nécessaire pour leur internalisation (Soubeyran et al, 2002). En plus de  $\beta$ -PIX, Itch est aussi en mesure d'interagir avec CIN85 tel que démontré par des essais de chromatographie d'affinité entre ces protéines (Janz et al, 2007). Il est intéressant de noter qu'il existe aussi une interaction entre Rsp5p, l'homologue d'Itch chez la levure, et les protéines Sla1 ainsi que Rvs167, ces dernières reconnues comme étant elle-mêmes les homologues respectifs de CIN85 et d'endophiline (Stamenova et al, 2004). Toutefois, Rsp5p ne possède pas de motif PR (proline rich) et interagit avec ces ligands via ses domaines WW.

#### **4.2. D'autres interactions Itch-SH3 sont elles possibles au sein de l'endocytose?**

Le lien entre Itch et différentes protéines participant à l'endocytose de même que sa capacité à interagir avec certains domaines SH3 nous amène à nous questionner sur la capacité d'interagir avec d'autres protéines possédant ces caractéristiques. Cette recherche a donc pour but de tester différentes protéines potentielles à l'aide de la technique du BRET afin de déterminer les interactions possibles, et par la suite confirmer les résultats obtenus par chromatographie d'affinité. Les protéines ayant retenu notre attention possèdent toutes au moins un domaine SH3 et sont impliquées dans le réseau protéique responsable de l'endocytose (Simpson et al, 1999). Il s'agit des protéines pacsine, amphiphysine, intersectine et endophiline. Dans un deuxième temps, nous voulons aussi déterminer l'effet des différentes interactions établies afin de vérifier si Itch est en mesure de modifier ces substrats en les ubiquitylant.

#### **4.3. Prédiction théorique**

Tout d'abord, il est intéressant de noter qu'il existe des outils bio-informatiques permettant d'évaluer les probabilités d'interactions entre différents domaines SH3 et les



peptides potentiels contenus par leur ligand. Ainsi, *SH3 Hunter* permet de soumettre une séquence d'acides aminés composant un certain domaine SH3 et de chercher les différents motifs (R/K)xxPxxP (classe I) ou PxxPx(R/K) (classe II) présents sur le ligand et potentiellement responsables de l'interaction (Ferraro et al, 2007). Cet outil se base sur un modèle de réseau neuronal intégrant différentes composantes dont les peptides généralement reconnus par les SH3 de même que les informations structurales obtenues à partir d'interactions peptides/SH3 connues. Ceci permet d'obtenir un score représentant la probabilité qu'une interaction survienne et met cette valeur en relation avec un indice de précision et de sensibilité. Ces derniers permettent d'évaluer la fiabilité du résultat obtenu. Ainsi, une sensibilité plus élevée est associée à un plus grand nombre de vrais positifs avec aussi un plus grand nombre de faux positifs. Une grande précision permet plutôt de réduire le nombre de faux positifs excluant possiblement par le fait même une fraction de vrais positifs. Ces analyses permettent de mieux orienter notre choix quant aux cibles potentielles lors de tests visant à établir de nouvelles interactions avec le domaine PRD d'Itch. Les résultats obtenus avec les différentes interactions connues de même qu'avec les protéines évaluées au cours de cette étude sont représentées dans le tableau I. Nous remarquons que les différents domaines SH3 présentent tous un score plutôt élevé variant entre 0,906 et 0,999 selon le peptide et le domaine SH3 à l'étude. De plus, différentes valeurs de précision et de sensibilité leur sont associées permettant de mettre en contexte le résultat obtenu. Ainsi, une protéine interagissant avec Itch comme CIN-85 présente une probabilité d'interaction pour un même peptide de classe I très élevée pour ses domaines SH3-2 et 3 ayant respectivement des valeurs de 0,971 et 0,975 associés à une très grande précision de 95%, ce qui réduit le risque de faux positifs. On

**TABLEAU I.** Probabilités de liaisons de séquences du PRD d'Itch prédites par SH3 Hunter

Protéine humaine	# UniProt KnowledgeBase	Site de liaison possible du SH3 sur Itch	Score	Précision, $p$ (%)	Sensibilité, $s$ (%)	Graph $p/s$
		Peptides de classe I Peptides de classe II				
CIN-85	Q96B97	Pas de résultats significatifs				
		RPPPPTP PSRPPR	0,971 0,906	95 98	60 50	
		RPPPPTP	0,975	95	60	
B-PIX	Q14155	PPTPRR	0,987	81	80	
Endophiline A1	Q99962	PSRPPR PPTPRR	0,999 0,99	54 81	95 80	
Amphiphysine II	O00499	PPTPRR	0,941	93	60	
Pacsine1	Q9BY11	RPPPPTP PPTPRR PSRPPR	0,976 0,972 0,943	95 57 93	60 70 60	
Intersectine-1	Q15811	PSRPPR RPPPPTP PPTPRR	0,995 0,983 0,961	64 92 57	90 70 70	
		PSRPPR	0,976	57	70	
		PSRPPR PPTPRR RPPPPTP	0,999 0,992 0,985	50 81 92	97 80 70	
		PPTPRR RPPPPTP	0,978 0,951	57 98	70 50	
		RPPPPTP	0,973	95	60	

constate le même genre de résultats pour les deux autres interactions établies entre le PRD d'Itch et les domaines SH3 de  $\beta$ -PIX et d'endophiline. Ces dernières présentent des probabilités d'interactions très élevées oscillant entre 0,987 et 0,999 et associées à des valeurs de précision et/ou de sensibilité significatives. De la même façon, on constate de très bonnes probabilités d'interaction entre Itch et les domaines SH3 des protéines sélectionnées pour notre étude. Ainsi, la valeur la plus faible est obtenue dans le cas de l'amphiphysine avec un score de 0,941 présentant tout de même une précision de 93%. Les valeurs obtenues dans le cas de pacsine sont légèrement supérieures et celles présentant le niveau le plus élevé sont associées à l'intersectine, dont les valeurs s'approchent de celles de l'endophiline. Les protéines à l'étude présentent donc chacune une probabilité d'interaction intéressante méritant d'être approfondie.

#### **4.4. Confirmation de l'interaction entre Itch et endophiline *in vivo* par BRET**

Nous avons utilisé la technique du BRET afin de vérifier l'existence de ces différentes interactions *in vivo*. Ces résultats nous ont permis de confirmer l'interaction entre le PRD d'Itch et le domaine SH3 de l'endophiline tel qu'établi précédemment (Angers et al, 2004; Azakir et Angers, 2009) (Figure 8). Cette protéine à domaine SH3 est en mesure d'interagir avec certains domaines PRD, notamment ceux de la dynamine et de la synaptojanine. Ces dernières jouent un rôle respectivement dans la fission des vésicules de la membrane plasmique ainsi que dans le désassemblage du manteau de clathrine. En plus de son domaine BAR participant à la courbure de la membrane plasmique, l'endophiline permettrait ainsi de recruter d'autres protéines participant activement à l'endocytose. La technique du BRET nous a aussi permis de mettre en évidence le rôle majeur du domaine SH3 de l'endophiline dans l'établissement de

l'interaction étant donné la superposition des courbes obtenues (Figure 8). Ceci indique que la protéine interagit spécifiquement via ce domaine puisque ce dernier présente la même affinité et le même niveau d'interaction avec Itch que la protéine complète. Cette technique semble donc constituer un moyen efficace et rapide d'évaluer les interactions protéiques.

#### **4.5. Utilisation du BRET dans la découverte et la confirmation de nouvelles interactions**

Nous avons également établi de cette façon différentes interactions n'ayant pas fait l'objet d'études auparavant. Ainsi, nous avons observé un signal BRET significatif entre Itch et le domaine SH3 isolé de l'amphiphysine de même qu'avec ceux isolés à partir de l'intersectine (Figure 8). Aussi, nous avons déterminé l'interaction entre Itch et la protéine pacsine entière. Les résultats obtenus avec ces différentes constructions témoignent cependant une affinité et un niveau d'interaction inférieur par rapport à l'endophiline (Figure 8). Ces résultats supportent ceux obtenus à partir d'extraits de cerveaux en chromatographie d'affinité montrant que l'endophiline est la protéine majeure interagissant avec le domaine PRD d'Itch (Angers et al, 2004).

Par la suite, nous avons voulu comparer les résultats obtenus par BRET avec ceux provenant de techniques éprouvées telles la chromatographie d'affinité et l'immunobuvardage de type Far Western. Avec cette dernière technique, nous avons été en mesure de confirmer l'interaction directe entre Itch et les protéines endophiline, pacsine et amphiphysine (Figure 9). Nous n'avons toutefois pas observé d'interaction directe entre Itch et l'intersectine, ce qui est surprenant étant donné les résultats de BRET montrant l'interaction avec les domaines SH3 isolés à partir de cette protéine. Ceci

pourrait s'expliquer par la difficulté à obtenir des niveaux satisfaisants de surexpression de l'intersectine comparables à ceux obtenus avec les autres protéines étudiées. D'autres facteurs tels que la conformation de l'intersectine peuvent expliquer ces résultats. Les domaines SH3 de cette protéine pourraient être difficilement accessibles et ainsi limiter leur interaction avec Itch. Des essais de chromatographie d'affinité montrent en effet une interaction très faible entre Itch et la forme complète de l'intersectine par rapport à ses domaines SH3 isolés (Figure 10). Ces résultats confirment aussi le rôle essentiel du PRD d'Itch afin d'établir ces différentes interactions puisque seul ce domaine, et non les domaines WW, est responsable de l'interaction. Il existe donc, comme le démontraient les données de BRET, une affinité différente entre Itch et ses différents substrats à domaines SH3. Nos résultats obtenus à partir d'extraits de cerveaux en chromatographie d'affinité abondent aussi en ce sens (Figure 11). En effet, Itch interagit de façon très forte avec l'endophiline tandis qu'elle montre une affinité intermédiaire avec les différentes formes d'amphiphysine exprimées dans le cerveau. Finalement, l'intersectine montre encore une fois l'interaction la plus faible parmi les protéines étudiées.

#### **4.6. Différents SH3 impliquent différentes capacités d'interactions?**

Une telle variation de l'interaction entre le PRD d'Itch et ses différents substrats pourrait refléter la préférence de ces derniers pour des séquences d'acides aminés particulières. En effet, les différentes protéines avec un domaine SH3 reconnaissent des séquences spécifiques contenues dans le PRD de leurs partenaires. La conformation que vont prendre ces acides aminés et leur nature vont alors dicter la force de leur affinité. Cette situation pourrait alors expliquer la variation de l'interaction avec Itch observée selon le substrat étudié. D'autres protéines montrent effectivement de telles

caractéristiques. Ainsi, l'amphiphysine est en mesure de lier à la fois le PRD de la dynamine et celui de la synaptojanine, cependant avec des dynamiques différentes. On constate que la synaptojanine possède une plus grande affinité pour l'amphiphysine que la dynamine (De Heuvel et al, 1997). Le SH3 de l'amphiphysine lie pourtant chez ces deux protéines des séquences de classe II présentant des similitudes. En effet, l'amphiphysine lie deux séquences précises de la synaptojanine soient les séquences **PIRPSR** et **PTIPPR** tandis que la séquence reconnue chez la dynamine est **PSRPNR**. Cette dernière est semblable au premier site reconnu chez la synaptojanine en ce sens qu'elles présentent toutes deux la forme  $PxxPx(R/K)$  avec en plus des résidus arginines disposés de façon identique (Owen et al, 1998; Cestra et al, 1999). Des résultats obtenus par cristallographie ont permis de montrer l'importance de ces résidus dans l'interaction entre la dynamine et l'amphiphysine. Ces chaînes latérales de ces acides aminés placés à la surface d'une même hélice de polyproline vont alors faire contact avec la surface du domaine SH3 et ainsi définir la spécificité de l'interaction (Owen et al, 1998). Étant donné qu'il existe des différences au niveau de l'interaction entre l'amphiphysine et deux domaines PRD présentant des similitudes de séquences, il doit donc exister d'autres facteurs pouvant influencer la force du lien SH3-PRD. Parmi ceux-ci, il y a notamment l'accessibilité des séquences reconnues dans le PRD au sein de la protéine de même que l'accessibilité du domaine SH3 présent sur le substrat. Une autre possibilité serait un effet de compétition entre les différentes protéines à domaine SH3 pour un même PRD. Le cas de la liaison de la dynamine par la syndapine et l'endophiline illustre bien ce phénomène. Ces dernières vont en effet lier des séquences précises se chevauchant au sein du PRD de la dynamine. Cette situation fait en sorte que la liaison de l'une des protéines empêche la

liaison de la seconde. Il fut proposé que ce mécanisme puisse servir à réguler de façon temporelle l'endocytose en modifiant les acteurs protéiques selon le stade de formation des vésicules ou encore que cela puisse permettre d'accomplir de façon différente deux types d'internalisation (Anggono et Robinson, 2007). Cet exemple de compétition ne s'applique cependant pas à toutes les protéines à domaine SH3. Ainsi, la liaison de l'amphiphysine et de l'endophiline par la synaptojanine se fait sur des sites distincts de son PRD pouvant possiblement admettre leur liaison simultanée sur celle-ci (Cestra et al, 1999; Micheva et al, 1997). Toutes ces caractéristiques peuvent donc expliquer les différences d'interactions observées dans nos expériences de BRET tout comme dans nos essais de chromatographie d'affinité et d'immunobuvardage de type Far Western. Ainsi, la présence dans le PRD d'Itch de deux séquences similaires à la séquence consensus de liaison du domaine SH3 de l'endophiline (PxRPPxPR) pourrait permettre d'expliquer la force de l'interaction observée. À l'inverse, la faible interaction observée dans le cas de l'intersectine pourrait plutôt s'expliquer par la conformation spécifique adoptée par cette protéine qui rend son domaine SH3 peu accessible pour établir des liaisons. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi on observe une interaction entre Itch et le domaine SH3 isolé de cette protéine alors qu'il n'y en a pas avec la forme complète.

#### **4.7. Rôle d'Itch dans l'endocytose et la signalisation via l'ubiquitylation de protéines SH3**

Suite à la confirmation de ces différentes interactions et après avoir déterminé de façon grossière leur abondance relative au sein de la cellule, nous avons voulu en savoir plus sur le destin des protéines interagissant avec Itch. La nature de cette ligase lui confère la possibilité de modifier ses substrats en les ubiquitylant comme c'est le cas pour

certaines protéines impliquées dans l'endocytose telles l'endophiline et Cbl. Nous avons donc voulu vérifier si une telle ubiquitylation pouvait s'appliquer à nos protéines d'intérêt. Nos essais de chromatographie d'affinité sur des extraits de cellules surexprimant l'ubiquitine en présence ou non de la ligase nous ont permis de confirmer l'ubiquitylation de l'endophiline tel qu'établie précédemment (Angers et al, 2004; Azakir et Angers, 2009). De façon similaire, nous avons pu confirmer l'ubiquitylation de pacsine et de l'amphiphysine par Itch. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'observer l'ubiquitylation de l'intersectine. Cette dernière présentant un niveau d'interaction beaucoup plus faible par rapport aux autres protéines étudiées et étant plus difficile à surexprimer dans notre modèle cellulaire, ceci complique l'interprétation de nos résultats. Ainsi, nous ne pouvons confirmer l'absence d'ubiquitylation de l'intersectine hors de tout doute à l'aide des techniques employées, puisqu'elles dépendent en grande partie de la purification du substrat (intersectine) grâce à son affinité pour le domaine PRD d'Itch. Il serait donc nécessaire d'effectuer des tests plus poussés afin d'établir la conséquence de son interaction avec Itch. Toutefois, l'ubiquitylation de pacsine et de l'amphiphysine soulève tout de même la question du destin de ces différentes protéines ubiquitylées. La plupart des partenaires d'Itch, excepté ceux liés à sa régulation, présentent une ubiquitylation menant à une dégradation protéasomale. C'est le cas notamment de c-FLIP, t-Bid, cbl et endophiline (Chang et al, 2006; Azakir et al, 2010; Azakir et Angers, 2009). Cette situation confère à Itch la capacité de contrôler plusieurs processus cellulaires en affectant l'expression de protéines impliquées dans ces différentes voies. Ainsi, l'activité d'Itch menant à la dégradation de c-FLIP et t-Bid permet d'influencer le destin cellulaire en affectant différemment la mort cellulaire induite par TNF $\alpha$  (tumor



necrosis factor alpha) (Chang et al, 2006; Azakir et Angers, 2009). De plus, l'activité d'Itch serait impliquée dans l'endocytose des récepteurs à l'EGF via son effet sur les protéines Cbl et endophiline. Il fut en effet démontré que suite à une stimulation de ces récepteurs, il y a activation JNK-dépendante d'Itch menant à l'ubiquitylation et la dégradation de Cbl et d'endophiline. Ceci pourrait ainsi permettre une sorte de boucle de rétroaction entre la signalisation des récepteurs et leur internalisation en limitant la présence du complexe Cbl-CIN85-Endophiline nécessaire à l'endocytose (Azakir et Angers, 2009; Soubeyran et al, 2002). Ces observations nous amènent à penser que pacsine et l'amphiphysine puissent subir le même sort et que l'activation d'Itch pourrait possiblement modifier l'expression de ces protéines et limiter leur participation au phénomène d'endocytose. Itch pourrait ainsi constituer un régulateur important agissant sur plusieurs des molécules formant le complexe d'internalisation et donc être en mesure de stabiliser l'expression de certains récepteurs membranaires et de contribuer à accentuer leur signalisation. Ceci est particulièrement intéressant notamment dans le cas des récepteurs à l'EGF, étant donné que leur surexpression est observée dans plusieurs types de cancers et est associée à un taux de survie plus faible des patients atteints (Nicholson et al, 2001). De plus, on constate la surexpression d'Itch dans plusieurs lignées cancéreuses, ce qui porte aussi à penser qu'il existe un lien entre les effets d'Itch et la tumorigenèse (Ishihara et al, 2008).

#### **4.8. Ubiquitylation sur le SH3 d'endophiline et de l'amphiphysine**

De plus, cette étude nous a aussi permis de découvrir que l'endophiline et l'amphiphysine sont ubiquitylées spécifiquement sur leur domaine SH3. Cette caractéristique est similaire à la situation retrouvée chez la levure avec l'homologue

d'Itch, la ligase Rsp5p. Cette dernière est en effet responsable de l'ubiquitylation de l'homologue de l'endophiline/amphiphysine chez la levure, soit Rvs167. L'ajout d'une ubiquitine s'effectue sur la lysine 481 située dans le domaine SH3 de Rvs167. Cette modification se fait à l'endroit même où le domaine SH3 lie habituellement ses ligands. De plus, il y a compétition entre les ligands liant le domaine SH3 via leur séquence PXXP et l'ubiquitine. Il fut donc proposé que ce type d'ubiquitylation serve de mécanisme de régulation des interactions établies par le domaine SH3 de Rvs167 (Stamenova et al, 2004; Stamenova et al, 2007). L'ubiquitylation de l'endophiline sur son domaine SH3 semble donc être un trait conservé, même si dans ce cas il s'agit de l'ajout de chaînes d'ubiquitine menant plutôt à la dégradation.

## 5. Conclusion et perspectives

Lors de ce projet de recherche, nous avons voulu établir une façon rapide et efficace de tester différentes interactions entre la ligase Itch et certains de ses substrats potentiels. Ainsi, nous avons entrepris d'appliquer la technique du BRET à notre modèle d'étude, soit la recherche de protéines impliquées dans l'endocytose et interagissant avec Itch via leur domaine SH3. La mise au point de cette technique s'est avérée utile pour obtenir des données nous renseignant sur ces différentes interactions. En plus de confirmer celles-ci *in vivo*, nous obtenons des indications quant à leur niveau d'interaction de même que l'affinité relative des protéines l'une envers l'autre. De cette façon, nous avons été en mesure de confirmer l'interaction établie précédemment entre Itch et l'endophiline (Angers et al, 2004; Azakir et Angers, 2009). Ces résultats nous ont aussi permis de découvrir l'interaction entre Itch et pacsine. Finalement, nous avons observé le lien entre Itch et les domaines SH3 isolés de l'amphiphysine, l'endophiline et l'intersectine. Ces informations s'avèrent utiles afin d'orienter nos efforts dans la recherche de substrats potentiels puisque nous avons été en mesure de confirmer les résultats obtenus par BRET à l'aide de techniques conventionnelles comme la chromatographie d'affinité et l'immunobuvardage de type Far Western. Ces expériences nous ont permis de démontrer un lien plutôt faible et possiblement indirect avec l'intersectine. Nous avons aussi observé un lien direct avec l'endophiline, l'amphiphysine et pacsine. Cette interaction est responsable de leur ubiquitylation par la ligase Itch. De plus, nous avons déterminé que cette ubiquitylation se produisait sur le domaine SH3 de l'endophiline et de l'amphiphysine. Tous ces résultats confirment que la mise au point du BRET pour notre étude s'est avérée particulièrement efficace pour déterminer la présence

d'interactions spécifiques. Il serait maintenant intéressant d'appliquer cette méthode afin d'effectuer des analyses plus diverses. On pourrait ainsi comparer rapidement l'interaction entre Itch et différentes classes de domaines SH3 afin de déterminer si certains types de domaines sont favorisés. De plus, nous pourrions facilement tester de nouvelles cibles potentielles impliquées dans les autres sphères d'activité d'Itch soit la mort cellulaire ou encore la différenciation (voir Annexe 1 et 2). Bref, les capacités de cette technique sont innombrables et il reste fort à parier que bien d'autres chercheurs sauront tirer profit des informations qu'elle procure.

## 6. Références

- Adams, A, J M Thorn, M Yamabhai, B K Kay, et J P O'Bryan. 2000. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 275, no. 35 (Septembre 1): 27414-27420.
- Angers, Annie, Antoine R Ramjaun, et Peter S McPherson. 2004. The HECT domain ligase Itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem* 279, no. 12 (Mars): 11471-9.
- Anggono, Victor, et Phillip J. Robinson. 2007. Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Neurochemistry* 102, no. 3: 931-943.
- Azakhir, Bilal A, et Annie Angers. 2009. Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cell Signal* 21, no. 8 (Août): 1326-36.
- Azakhir, Bilal A., Guillaume Desrochers, et Annie Angers. 2010. The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *FEBS Journal* 277, no. 5 (3): 1319-1330.
- Benmerah, Alexandre, et Christophe Lamaze. 2002. Endocytose : chaque voie compte ! *M/S : médecine sciences* 18, no. 11: 1126-1136.
- Cadwell, Ken, et Laurent Coscoy. 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science (New York, N.Y.)* 309, no. 5731 (Juillet 1): 127-130.
- Cestra, G, L Castagnoli, L Dente, O Minenkova, A Petrelli, N Migone, U Hoffmüller, J Schneider-Mergener, et G Cesareni. 1999. The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 45 (Novembre 5): 32001-32007.
- Chang, Lufen, Hideaki Kamata, Giovanni Solinas, Jun-Li Luo, Shin Maeda, K. Venuprasad, Yun-Cai Liu, et Michael Karin. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124, no. 3 (Février): 601-13.
- Chang, Xing, Li Chen, Jing Wen, Virginia L Godfrey, Guilin Qiao, Yassir Hussien, Jian Zhang, et Jian-Xin Gao. 2006. Foxp3 controls autoreactive T cell activation through transcriptional regulation of early growth response genes and E3

- ubiquitin ligase genes, independently of thymic selection. *Clin Immunol* 121, no. 3 (Décembre): 274–85.
- Chen, Hong, Silvia Fre, Vladimir I. Slepnev, Maria Rosaria Capua, Kohji Takei, Margaret H. Butler, Pier Paolo Di Fiore, et Pietro De Camilli. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394, no. 6695: 793-797.
- Cremona, O, G Di Paolo, M R Wenk, A Lüthi, W T Kim, K Takei, L Daniell, et al. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, no. 2 (Octobre 15): 179-188.
- Czech, Michael P. 2000. PIP2 and PIP3: Complex Roles at the Cell Surface. *Cell* 100, no. 6 (Mars 17): 603-606.
- Doherty, Gary J, et Harvey T McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 78: 857-902.
- Drake, Matthew T., et Linton M. Traub. 2001. Interaction of Two Structurally Distinct Sequence Types with the Clathrin Terminal Domain  $\beta$ -Propeller. *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 31: 28700-28709.
- Dunn, R., et L. Hicke. 2001. Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem* 276, no. 28 (Juillet): 25974–81.
- Engqvist-Goldstein, A E, R A Warren, M M Kessels, J H Keen, J Heuser, et D G Drubin. 2001. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *The Journal of Cell Biology* 154, no. 6 (Septembre 17): 1209-1223.
- Engqvist-Goldstein, Asa E.Y., Michael M. Kessels, Vikramjit S. Chopra, Michael R. Hayden, et David G. Drubin. 1999. An Actin-Binding Protein of the Sla2/Huntingtin Interacting Protein 1 Family Is a Novel Component of Clathrin-Coated Pits and Vesicles. *J. Cell Biol.* 147, no. 7 (Décembre 27): 1503-1518.
- Fang, Deyu, Chris Elly, Baixue Gao, Nan Fang, Yoav Altman, Claudio Joazeiro, Tony Hunter, Neal Copeland, Nancy Jenkins, et Yun-Cai Liu. 2002. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* 3, no. 3 (Mars): 281–7.
- Ferraro, Enrico, Daniele Peluso, Allegra Via, Gabriele Ausiello, et Manuela Helmer-Citterich. 2007. SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins. *Nucleic Acids Research* 35, no. Web Server issue (Juillet): W451-454.
- Finn, Robert D., John Tate, Jaina Mistry, Penny C. Coghill, Stephen John Sammut, Hans-

- Rudolf Hotz, Goran Ceric, et al. 2008. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* 36, no. suppl\_1 (Janvier 11): D281-288.
- Ford, Marijn G. J., Ian G. Mills, Brian J. Peter, Yvonne Vallis, Gerrit J. K. Praefcke, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, no. 6905: 361-366.
- Gad, H, N Ringstad, P Löw, O Kjaerulff, J Gustafsson, M Wenk, G Di Paolo, et al. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* 27, no. 2 (Août): 301-312.
- Gallagher, Ewen, Min Gao, Yun-Cai Liu, et Michael Karin. 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, no. 6 (Février): 1717-22.
- Gao, Min, Tord Labuda, Ying Xia, Ewen Gallagher, Deyu Fang, Yun-Cai Liu, et Michael Karin. 2004. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306, no. 5694 (Octobre): 271-5.
- Gasman, Stéphane, Sylvette Chasserot-Golaz, Magali Malacombe, Michael Way, et Marie-France Bader. 2004. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Molecular Biology of the Cell* 15, no. 2 (Février): 520-531.
- Guipponi, M, H S Scott, H Chen, A Schebesta, C Rossier, et S E Antonarakis. 1998. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. *Genomics* 53, no. 3 (Novembre 1): 369-376.
- Haffner, Christof, Kohji Takei, Hong Chen, Niels Ringstad, Amy Hudson, Margaret Husta Butler, Anna Elisabetta Salcini, Pier Paolo Di Fiore, et Pietro De Camilli. 1997. Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Letters* 419, no. 2-3 (Décembre 15): 175-180.
- Hall, Alan. 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279, no. 5350 (Janvier 23): 509-514.
- Han, Seung Jin, Jung Hyun Lee, Seung Hwan Hong, Sang Dai Park, Chul Geun Kim, Min Dong Song, Tae Kyu Park, et Chan Gil Kim. 2002. AP180 binds to the C-terminal SH2 domain of phospholipase C-gamma1 and inhibits its enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, no. 1 (Janvier 11): 35-41.

- Hershko, A, et A Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67: 425-479.
- de Heuvel, E, A W Bell, A R Ramjaun, K Wong, W S Sossin, et P S McPherson. 1997. Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *The Journal of Biological Chemistry* 272, no. 13 (Mars 28): 8710-8716.
- Higgs, Henry N., et Thomas D. Pollard. 2001. REGULATION OF ACTIN FILAMENT NETWORK FORMATION THROUGH ARP2/3 COMPLEX: Activation by a Diverse Array of Proteins1. *Annual Review of Biochemistry* 70, no. 1 (7): 649-676.
- Hurley, James H., et Beverly Wendland. 2002. Endocytosis: Driving Membranes around the Bend. *Cell* 111, no. 2 (Octobre 18): 143-146.
- Hussain, N K, S Jenna, M Glogauer, C C Quinn, S Wasiak, M Guipponi, S E Antonarakis, et al. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nature Cell Biology* 3, no. 10 (Octobre): 927-932.
- Hussain, Natasha K., Montarop Yamabhai, Antoine R. Ramjaun, A. Michelle Guy, Danny Baranes, John P. O'Bryan, Channing J. Der, Brian K. Kay, et Peter S. McPherson. 1999. Splice Variants of Intersectin Are Components of the Endocytic Machinery in Neurons and Nonneuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 22 (Mai 28): 15671-15677.
- Hussain, Natasha K., Montarop Yamabhai, Asha L. Bhakar, Martina Metzler, Stephen S. G. Ferguson, Michael R. Hayden, Peter S. McPherson, et Brian K. Kay. 2003. A Role for Epsin N-terminal Homology/AP180 N-terminal Homology (ENTH/ANTH) Domains in Tubulin Binding. *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 31: 28823-28830.
- Hynes, Nancy E, et Heidi A Lane. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews. Cancer* 5, no. 5 (Mai): 341-354.
- Ingham, Robert J, Gerald Gish, et Tony Pawson. 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, no. 11 (Mars 15): 1972-1984.
- Ishihara, Takaya, Hitoshi Tsuda, Akiko Hotta, Ken-ichi Kozaki, Akira Yoshida, Jaeduk Yoshimura Noh, Koichi Ito, Issei Imoto, et Johji Inazawa. 2008. ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Science* (10):1940-9.



- Janz, Jay M., Thomas P. Sakmar, et K. Christopher Min. 2007. A Novel Interaction between Atrophin-interacting Protein 4 and  $\beta$ -p21-activated Kinase-interactive Exchange Factor Is Mediated by an SH3 Domain. *Journal of Biological Chemistry* 282, no. 39: 28893-28903.
- Kelly, R B. 1999. Deconstructing membrane traffic. *Trends in Cell Biology* 9, no. 12 (Décembre): M29-33.
- Kerscher, Oliver, Rachael Felberbaum, et Mark Hochstrasser. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 159-180.
- Kessels, Michael M, et Britta Qualmann. 2002. Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal* 21, no. 22 (Novembre 15): 6083-6094.
- Kessels, Michael M, et Britta Qualmann. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 117, no. Pt 15 (Juillet 1): 3077-3086.
- Kingston, Robert E., Claudia Chen, et John Rose, éd. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://www.currentprotocols.com/protocol/mb0901>.
- Ladanyi, Marc, et William Pao. 2008. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol* 21, no. S2: S16-S22.
- Legendre-Guillemain, Valerie, Martina Metzler, Jean-Francois Lemaire, Jacynthe Philie, Lu Gan, Michael R Hayden, et Peter S McPherson. 2005. Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 7 (Février 18): 6101-6108.
- Li, Shawn S.-C. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochemical Journal* 390, no. 3 (9): 641.
- Macias, Maria J, Silke Wiesner, et Marius Sudol. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Letters* 513, no. 1 (Février 20): 30-37.
- Malacombe, Magali, Mara Ceridono, Valérie Calco, Sylvette Chasserot-Golaz, Peter S McPherson, Marie-France Bader, et Stéphane Gasman. 2006. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating

- Cdc42. *The EMBO Journal* 25, no. 15 (Août 9): 3494-3503.
- Maldonado-Báez, Lymarie, et Beverly Wendland. 2006. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends in Cell Biology* 16, no. 10 (Octobre): 505-513.
- Mani, Meera, Sang Yoon Lee, Louise Lucast, Ottavio Cremona, Gilbert Di Paolo, Pietro De Camilli, et Timothy A Ryan. 2007. The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56, no. 6 (Décembre 20): 1004-1018.
- Martin, Negin P, Robert P Mohny, Sara Dunn, Margaret Das, Erica Scappini, et John P O'Bryan. 2006. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Molecular Pharmacology* 70, no. 5 (Novembre): 1643-1653.
- McGavin, M K, K Badour, L A Hardy, T J Kubiseski, J Zhang, et K A Siminovitch. 2001. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine* 194, no. 12 (Décembre 17): 1777-1787.
- McPherson, A J Czernik, T J Chilcote, F Onofri, F Benfenati, P Greengard, J Schlessinger, et P De Camilli. 1994. Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 14 (Juillet 5): 6486-6490.
- McPherson, Peter S., Brian K. Kay, et Natasha K. Hussain. 2001. Signaling on the Endocytic Pathway. *Traffic* 2, no. 6: 375-384.
- Mercier, Jean-François, Ali Salahpour, Stéphane Angers, Andreas Breit, et Michel Bouvier. 2002. Quantitative Assessment of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 47 (Novembre 22): 44925-44931.
- Metzler, M, V Legendre-Guillemain, L Gan, V Chopra, A Kwok, P S McPherson, et M R Hayden. 2001. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 42 (Octobre 19): 39271-39276.
- Micheva, K D, A R Ramjaun, B K Kay, et P S McPherson. 1997. SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Letters* 414, no. 2 (Septembre 8): 308-312.

- Micheva, K D, B K Kay, et P S McPherson. 1997. Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *The Journal of Biological Chemistry* 272, no. 43 (Octobre 24): 27239-27245.
- Modregger, J, B Ritter, B Witter, M Paulsson, et M Plomann. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of Cell Science* 113 Pt 24 (Décembre): 4511-4521.
- Modregger, Jan, Nicholas A DiProspero, Vinod Charles, Danilo A Tagle, et Markus Plomann. 2002. PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Human Molecular Genetics* 11, no. 21 (Octobre 1): 2547-2558.
- Mohney, Robert P, Margaret Das, Trever G Bivona, Richard Hanes, Anthony G Adams, Mark R Philips, et John P O'Bryan. 2003. Intersectin activates Ras but stimulates transcription through an independent pathway involving JNK. *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 47 (Novembre 21): 47038-47045.
- Morgan, Jennifer R, Kondury Prasad, Suping Jin, George J Augustine, et Eileen M Lafer. 2003. Eps15 homology domain-NPF motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic vesicle recycling. *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 35 (Août 29): 33583-33592.
- Mouchantaf, Rania, Bilal A. Azakir, Peter S. McPherson, Susan M. Millard, Stephen A. Wood, et Annie Angers. 2006. The Ubiquitin Ligase Itch Is Auto-ubiquitylated in Vivo and in Vitro but Is Protected from Degradation by Interacting with the Deubiquitylating Enzyme FAM/USP9X. *Journal of Biological Chemistry* 281, no. 50 (Décembre 15): 38738-38747.
- Mousavi, Seyed Ali, Lene Malerød, Trond Berg, et Rune Kjekken. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical Journal* 377, no. Pt 1 (Janvier 1): 1-16.
- Nalefski, E A, et J J Falke. 1996. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 5, no. 12 (Décembre): 2375-2390.
- Nandi, Dipankar, Pankaj Tahiliani, Anujith Kumar, et Dilip Chandu. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences* 31, no. 1 (Mars): 137-155.
- Nicholson, R I, J M Gee, et M E Harper. 2001. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 37 Suppl 4 (Septembre): S9-15.
- Ohta, Tomohiko, et Mamoru Fukuda. 2004. Ubiquitin and breast cancer. *Oncogene* 23, no. 11: 2079-2088.

- Okamoto, M, S Schoch, et T C Südhof. 1999. ESH1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 26 (Juin 25): 18446-18454.
- Omerovic, Jasminka, Laura Santangelo, Eleonora Maria-Rosaria Puggioni, Jordan Marrocco, Claudia Dall'Armi, Camilla Palumbo, Francesca Belleudi, et al. 2007. The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation. *FASEB J.* 21, no. 11 (Septembre 1): 2849-2862.
- Otte, Livia, Urs Wiedemann, Brigitte Schlegel, José Ricardo Pires, Michael Beyermann, Peter Schmieder, Gerd Krause, Rudolf Volkmer-Engert, Jens Schneider-Mergener, et Hartmut Oschkinat. 2003. WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 12, no. 3 (Mars): 491-500.
- Owen, D J, Y Vallis, B M Pearse, H T McMahon, et P R Evans. 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *The EMBO Journal* 19, no. 16 (Août 15): 4216-4227.
- Owen, D.J., P. Wigge, Y. Vallis, J.D.A. Moore, P.R. Evans, et H.T. McMahon. 1998. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* 17, no. 18: 5273-5285.
- Owen, David J., Yvonne Vallis, Martin E. M. Noble, Jack B. Hunter, Tim R. Dafforn, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 1999. A Structural Explanation for the Binding of Multiple Ligands by the [alpha]-Adaptin Appendage Domain. *Cell* 97, no. 6 (Juin 11): 805-815.
- Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, no. 6515 (Février 16): 573-580.
- Perroy, Julie, Stephanie Pontier, Pascale G Charest, Muriel Aubry, et Michel Bouvier. 2004. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Meth* 1, no. 3 (Décembre): 203-208.
- Perry, William L., Carolyn M. Hustad, Debra A. Swing, T. Norene O'Sullivan, Nancy A. Jenkins, et Neal G. Copeland. 1998. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet* 18, no. 2 (Février): 143-146.
- Peter, Brian J, Helen M Kent, Ian G Mills, Yvonne Vallis, P Jonathan G Butler, Philip R Evans, et Harvey T McMahon. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science (New York, N.Y.)* 303, no.

5657 (Janvier 23): 495-499.

- Petsko, Gregory A., Dagmar Ringe, Chrystelle Sanlavielle, et Dominique Charmot-Bensimon. 2008. *Structure et fonction des protéines*. De Boeck Université.
- Pfleger, Kevin Donald George, et Karin Ann Eidne. 2003. New Technologies: Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) for the Detection of Real Time Interactions Involving G-Protein Coupled Receptors. *Pituitary* 6, no. 3: 141-151.
- Pickart, C M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 70: 503-533.
- Pickart, C M. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Molecular Cell* 8, no. 3 (Septembre): 499-504.
- Pickart, Cecile M, et Michael J Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1695, no. 1-3 (Novembre 29): 55-72.
- Pickart, Cecile M, et David Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, no. 6 (Décembre): 610-616.
- Pucharcos, C, X Estivill, et S de la Luna. 2000. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Letters* 478, no. 1-2 (Juillet 28): 43-51.
- Qiu, Ling, Claudio Joazeiro, Nan Fang, Hong-Ying Wang, Chris Elly, Yoav Altman, Deyu Fang, Tony Hunter, et Yun-Cai Liu. 2000. Recognition and Ubiquitination of Notch by Itch, a Hect-type E3 Ubiquitin Ligase. *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 46 (Novembre 17): 35734-35737.
- Quesnelle, Kelly M, Amanda L Boehm, et Jennifer R Grandis. 2007. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, no. 2 (Octobre 1): 311-319.
- Ramjaun, A R, A Angers, V Legendre-Guillemain, X K Tong, et P S McPherson. 2001. Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 31 (Août 3): 28913-28919.
- Ramjaun, A R, et P S McPherson. 1998. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* 70, no. 6 (Juin): 2369-76.
- Ramjaun, A R, J Philie, E de Heuvel, et P S McPherson. 1999. The N terminus of

- amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 28 (Juillet 9): 19785-19791.
- Ramjaun, A R, K D Micheva, I Bouchelet, et P S McPherson. 1997. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *The Journal of Biological Chemistry* 272, no. 26 (Juin 27): 16700-16706
- Rohatgi, Rajat, Hsin-yi Henry Ho, et Marc W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-Wasp Activation by Cdc42 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Cell Biol.* 150, no. 6 (Septembre 18): 1299-1310.
- Rotin, D, O Staub, et R Haguenaer-Tsapis. 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of Membrane Biology* 176, no. 1 (Juillet 1): 1-17.
- Scheele, Urte, Jürgen Alves, Ronald Frank, Michael Düwel, Christoph Kalthoff, et Ernst Ungewickell. 2003. Molecular and Functional Characterization of Clathrin- and AP-2-binding Determinants within a Disordered Domain of Auxilin. *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 28 (Juillet 11): 25357-25368.
- Scheffner, M, U Nuber, et J M Huibregtse. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, no. 6509 (Janvier 5): 81-83.
- Seifert, Markus, Christina Ampofo, Yasmin Mehraein, Jörg Reichrath, et Cornelius Welter. 2007. Expression analysis of human intersectin 2 gene (ITSN2) minor splice variants showing differential expression in normal human brain. *Oncology Reports* 17, no. 5 (Mai): 1207-1211.
- Sengar, Ameet S., Wei Wang, Joseph Bishay, Samuel Cohen, et Sean E. Egan. 1999. The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J* 18, no. 5 (Mars 1): 1159-1171.
- Shupliakov, O, P Löw, D Grabs, H Gad, H Chen, C David, K Takei, P De Camilli, et L Brodin. 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science (New York, N.Y.)* 276, no. 5310 (Avril 11): 259-263.
- Simpson, F, N K Hussain, B Qualmann, R B Kelly, B K Kay, P S McPherson, et S L Schmid. 1999. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature Cell Biology* 1, no. 2 (Juin): 119-124.
- Slepnev, Vladimir I., Gian-Carlo Ochoa, Margaret H. Butler, et Pietro De Camilli. 2000. Tandem Arrangement of the Clathrin and AP-2 Binding Domains in Amphiphysin

- 1 and Disruption of Clathrin Coat Function by Amphiphysin Fragments Comprising These Sites. *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 23 (Jun 9): 17583-17589.
- Sorkin, A. 2000. The endocytosis machinery. *J Cell Sci* 113, no. 24 (Décembre 15): 4375-4376.
- Soubeyran, Philippe, Katarzyna Kowanetz, Iwona Szymkiewicz, Wallace Y. Langdon, et Ivan Dikic. 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, no. 6877 (Mars 14): 183-187.
- Stahelin, Robert V, Fei Long, Brian J Peter, Diana Murray, Pietro De Camilli, Harvey T McMahon, et Wonhwa Cho. 2003. Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains. *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 31 (Ao t 1): 28993-28999.
- Stamenova, Svetoslava D, Michael E French, Yuan He, Smitha A Francis, Zachary B Kramer, et Linda Hicke. 2007. Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. *Molecular Cell* 25, no. 2 (Janvier 26): 273-284.
- Stamenova, Svetoslava D., Rebecca Dunn, Adam S. Adler, et Linda Hicke. 2004. The Rsp5 Ubiquitin Ligase Binds to and Ubiquitinates Members of the Yeast CIN85-Endophilin Complex, Sla1-Rvs167. *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 16 (Avril 16): 16017-16025.
- Swaminathan, Gayathri, et Alexander Y Tsygankov. 2006. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *Journal of Cellular Physiology* 209, no. 1 (Octobre): 21-43.
- Tebar, F, S K Bohlander, et A Sorkin. 1999. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Molecular Biology of the Cell* 10, no. 8 (Ao t): 2687-2702.
- Tong, X K, N K Hussain, A G Adams, J P O'Bryan, et P S McPherson. 2000. Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 275, no. 38 (Septembre 22): 29894-29899.
- Tong, X K, N K Hussain, E de Heuvel, A Kurakin, E Abi-Jaoude, C C Quinn, M F Olson, et al. 2000. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *The EMBO Journal* 19, no. 6 (Mars 15): 1263-1271.

- Traweger, Andreas, Deyu Fang, Yun-Cai Liu, Wolfgang Stelzhammer, István A. Krizbai, Fritz Fresser, Hans-Christian Bauer, et Hannelore Bauer. 2002. The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 12 (Mars 22): 10201-10208.
- Verstreken, Patrik, Tong-Wey Koh, Karen L Schulze, R Grace Zhai, P Robin Hiesinger, Yi Zhou, Sunil Q Mehta, Yu Cao, Jack Roos, et Hugo J Bellen. 2003. Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* 40, no. 4 (Novembre 13): 733-748.
- Waelter, Stephanie, Eberhard Scherzinger, Renate Hasenbank, Eckhard Nordhoff, Rudi Lurz, Heike Goehler, Christine Gauss, et al. 2001. The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and (alpha)-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 10, no. 17 (Août 1): 1807-1817.
- Ward, C L, S Omura, et R R Kopito. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, no. 1 (Octobre 6): 121-127.
- Wasiak, S, C C Quinn, B Ritter, E de Heuvel, D Baranes, M Plomann, et P S McPherson. 2001. The Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor mammalian Son-of-sevenless interacts with PACSIN 1/syndapin I, a regulator of endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 28 (Juillet 13): 26622-26628.
- Weissman, A M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2, no. 3 (Mars): 169-178.
- Whisstock, J C, et A M Lesk. 1999. SH3 domains in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 24, no. 4 (Avril): 132-133.
- Wu, Chenggang, Mike Haiting Ma, Kevin R. Brown, Matt Geisler, Lei Li, Eve Tzeng, Christina Y. H. Jia, Igor Jurisica, et Shawn S.-C. Li. 2007. Systematic identification of SH3 domain-mediated human protein-protein interactions by peptide array target screening. *PROTEOMICS* 7, no. 11: 1775-1785.
- Wu, Yuliang, Qiang Li, et Xing-Zhen Chen. 2007. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nature Protocols* 2, no. 12: 3278-3284.
- Yamabhai, Montarop, Noah G. Hoffman, Nancy L. Hardison, Peter S. McPherson, Luisa Castagnoli, Gianni Cesareni, et Brian K. Kay. 1998. Intersectin, a Novel Adaptor Protein with Two Eps15 Homology and Five Src Homology 3 Domains. *Journal of Biological Chemistry* 273, no. 47 (Novembre 20): 31401-31407.



- Yang, Chun, Weidong Zhou, Myung-shin Jeon, Dmytro Demydenko, Yohsuke Harada, Huilin Zhou, et Yun-Cai Liu. 2006. Negative Regulation of the E3 Ubiquitin Ligase Itch via Fyn-Mediated Tyrosine Phosphorylation. *Molecular Cell* 21, no. 1 (Janvier 6): 135-141.
- Yarden, Y, et M X Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2, no. 2 (Février): 127-137.
- Ye, W, et E M Lafer. 1995. Bacterially expressed F1-20/AP-3 assembles clathrin into cages with a narrow size distribution: implications for the regulation of quantal size during neurotransmission. *Journal of Neuroscience Research* 41, no. 1 (Mai 1): 15-26.
- Yoshida, Yumi, et Kohji Takei. 2005. Stimulation of dynamin GTPase activity by amphiphysin. *Methods in Enzymology* 404: 528-537.
- Zarrinpar, Ali, Roby P. Bhattacharyya, et Wendell A. Lim. 2003. The Structure and Function of Proline Recognition Domains. *Sci. STKE* 2003, no. 179 (Avril 22): re8.
- Zhang, B, Y H Koh, R B Beckstead, V Budnik, B Ganetzky, et H J Bellen. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21, no. 6 (Décembre): 1465-1475.
- Zhang, Xuewu, Jodi Gureasko, Kui Shen, Philip A Cole, et John Kuriyan. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, no. 6 (Juin 16): 1137-1149.

## ANNEXE 1.

### **The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid**

Cet article pour lequel je suis second auteur porte sur le projet de recherche d'un étudiant au doctorat du laboratoire (Bilal A. Azakir). Cette étude avait pour but de caractériser l'interaction entre la protéine proapoptotique t-Bid et la ligase Itch en plus de définir l'effet d'une telle interaction au niveau cellulaire. La mise au point de la technique du BRET et son application à mon sujet de recherche m'ayant amené à tester diverses interactions avec la ligase Itch *in vivo*, j'ai donc entrepris d'évaluer cette interaction avec t-Bid afin de confirmer les résultats obtenus par mon collègue par immunobuvardage. Ma participation se limite donc à la planification de cette expérience de même que sa réalisation et son analyse subséquentes en plus d'écrire les sections s'y rapportant.

#### Résumé :

La forme tronquée de la protéine Bid (t-Bid) est un intermédiaire important de l'apoptose induite par des ligands. Cette protéine fut démontrée comme étant sensible aux inhibiteurs de protéasomes et son expression diminue suite à l'activation des voies de signalisation induite par l'EGF (epidermal growth factor). Ici, nous démontrons que la protéine t-Bid est un substrat de la ligase Itch qui interagit spécifiquement avec la forme tronquée de Bid et l'ubiquityle, mais n'affecte pas la forme intacte de Bid. De cette façon, la surexpression d'Itch augmente la survie cellulaire en inhibant l'activité de la caspase 3. À l'inverse, si on inhibe Itch par ARN d'interférence on induit la mort des cellules et l'apoptose. Le traitement des cellules avec l'EGF entraîne la phosphorylation et l'augmentation de l'activité de la ligase d'Itch. De plus, l'EGF augmente la survie des cellules lorsqu'on les traite aussi avec du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) qui induit la mort cellulaire, et ce dans un mécanisme dépendant de l'expression d'Itch. Nos travaux identifient Itch comme étant une molécule cruciale faisant le lien entre la signalisation de l'EGF et la résistance à l'apoptose par la diminution de l'expression de t-Bid, ce qui permet de spéculer sur le rôle des récepteurs à l'EGF et des inhibiteurs de protéasomes dans l'induction de l'apoptose et le traitement du cancer.



# The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid

Bilal A. Azakir, Guillaume Desrochers and Annie Angers

Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Québec, Canada

## Keywords

apoptosis; Bid; c-Jun N-terminal kinase; epidermal growth factor; HECT domain; ubiquitin

## Correspondence

(Received 2 November 2009, revised 21 December 2009, accepted 24 December 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07562.x

The truncated C-terminal portion of Bid (tBid) is an important intermediate in ligand-induced apoptosis. tBid has been shown to be sensitive to proteasomal inhibitors and downregulated by activation of the epidermal growth factor (EGF) pathway. Here, we provide evidence that tBid is a substrate of the ubiquitin ligase Itch, which can specifically interact with and ubiquitinate tBid, but not intact Bid. Consistently, overexpression of Itch increases cell survival and inhibits caspase 3 activity, whereas downregulation of Itch by RNA interference has the opposite effect, increasing cell death and apoptosis. Treatment with EGF increases Itch phosphorylation and activity, and Itch expression is important for the ability of EGF to increase cell survival after tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand treatment. Our findings identify Itch as a key molecule between EGF signalling and resistance to apoptosis through downregulation of tBid, providing further details on how EGF receptor and proteasome inhibitors can contribute to the induction of apoptosis and the treatment of cancer.

## Structural digital abstract

- [MINT-7542954](#): *ITCH* (uniprotkb:[Q96J02](#)) physically interacts ([MI:0915](#)) with *tBid* (uniprotkb:[P70444](#)) by anti tag coimmunoprecipitation ([MI:0007](#))
- [MINT-7542970](#): *tBid* (uniprotkb:[P70444](#)) physically interacts ([MI:0915](#)) with *Ubiquitin* (uniprotkb:[P62988](#)) by anti tag coimmunoprecipitation ([MI:0007](#))
- [MINT-7542986](#): *ITCH* (uniprotkb:[Q96J02](#)) physically interacts ([MI:0915](#)) with *tBid* (uniprotkb:[P70444](#)) by bioluminescence resonance energy transfer ([MI:0012](#))

## Introduction

Itch is a HECT domain ubiquitin ligase of the Nedd4 family, characterized by an N-terminal C2 domain responsible for guiding intracellular localization to internal membranes, four WW domains involved in substrate recognition and a C-terminal catalytic domain [1]. Itch is best known for its role in immune system development through regulation of the level of its target substrates, c-jun and junB [2,3]. However,

other substrates have been identified, and Itch action is not limited to the immune system [4–10].

Epidermal growth factor (EGF) is well known for its ability to promote cell growth [11]. It is also a key regulator of cell survival [12]. Maintaining the balance between cell survival and apoptosis is critical in the maintenance of a healthy organism, and tipping the equilibrium in one or another direction results in either

## Abbreviations

ATC, anaplastic thyroid carcinoma; BH3, Bcl-2-homology domain-3; BRET, bioluminescent resonance energy transfer; EGF, epidermal growth factor; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; rLuc, Renilla luciferase; tBid, truncated C-terminal portion of Bid; TRAIL, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

degenerative diseases or malignant cell development. EGF activates several receptors and a very complex signalling network with multiple cross-talks with the apoptotic pathways [12]. One specific influence of EGF on cell survival is through the downregulation of the proapoptotic protein Bid in hepatocytes [13]. Bid and its truncated active form (tBid) are both reported as targets of the ubiquitin/proteasome system, and their proteasomal degradation has a major influence on cell sensitivity to apoptotic signals [14,15].

The Bcl-2-homology domain-3 (BH3)-only protein Bid is an abundant proapoptotic protein of the Bcl-2 family that is crucial for death receptor-mediated apoptosis in many cell systems [16,17]. The BH3 domain-only proteins are a subfamily of the Bcl-2 family involved in the initiation of apoptosis through the mitochondrial pathway. The key event in the mitochondrial pathway is the release of proapoptotic factors from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol, resulting in the downstream activation of a family of cytosolic cysteine proteases, caspases, which are required for many of the morphological changes that occur during apoptosis. The mitochondrial release of cytochrome *c* and second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) allows for the formation of the apoptosome, a complex that enables the activation of caspases within the cell [18,19].

In this pathway, Bid is activated by caspase 8-mediated cleavage to produce tBid [15,17,20]. This cleavage unmask the BH3 domain, facilitating its accessibility for protein–protein interactions. tBid is subsequently myristoylated and translocates to mitochondria [21], where it oligomerizes with Bax or Bak to alter membrane integrity and promote cytochrome *c* release [22,23]. The subsequent release of caspase-activating factors strongly amplifies caspase 3 activation through the cleavage of its precursor, the pro-caspase 3, and results in cell apoptosis [18].

We have previously shown that Itch's ability to ubiquitylate one of its target, endophilin, augments following the treatment of cells with EGF [4]. We have since shown that this effect is specifically due to the activation by the EGF receptor of a signalling pathway dependent on c-Jun N-terminal kinase (JNK), but independent of Erk [24]. JNK-dependent phosphorylation of Itch is known to increase its catalytic activity, resulting in increased substrate ubiquitylation and degradation [25]. We therefore sought to determine if there could be a link between EGF-induced reduction in Bid and tBid levels and the ubiquitin ligase activity of Itch.

In this study, we first examined the ability of Itch to interact with Bid and tBid. We found that Itch specifically interacts with tBid, but not with Bid. Itch ubiquitylates

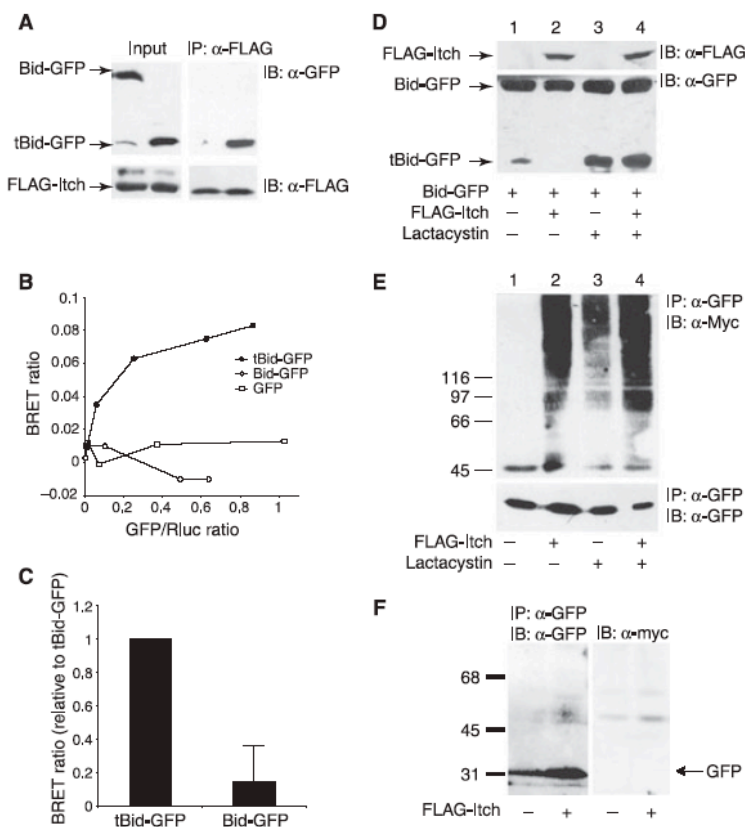
tBid and promotes its proteasomal degradation. We then demonstrated that Itch has an antiapoptotic effect in cells, apparently through the induction of tBid proteasomal degradation. Itch also prevents tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis, and is necessary for the antiapoptotic response following EGF treatment. In fact, Itch activity is increased by treatment with EGF, promoting further tBid degradation. Together, our results provide a clear link between the regulation of a ubiquitin ligase and apoptosis and provide a crucial pathway linking EGF stimulation to apoptosis.

## Results

### Itch interacts with tBid

HECT domain ubiquitin ligases of the C2-WW-HECT family are known to interact with their substrates through their WW domains [1,26]. If Itch is involved in Bid regulation, then one would expect that both proteins will bind to one another. We thus coexpressed a FLAG-tagged version of Itch together with Bid or tBid fused to green fluorescent protein (GFP) at the C-terminus. We then immunoprecipitated FLAG–Itch and looked for the presence of GFP fusions in the immunoprecipitated fractions. Although no Bid–GFP was visible in the immunoprecipitated fractions, tBid–GFP was readily detectable when both Itch and tBid were present in the extracts, showing that the truncated active form of Bid can indeed bind to Itch (Fig. 1A), whereas the full-length protein is prevented to do so.

To determine if the interaction also occurred in living cells, we used bioluminescence resonance energy transfer (BRET) using HEK-293T cells cotransfected with Renilla luciferase (rLuc)–Itch and Bid–GFP or tBid–GFP. Coelenterazine degradation by rLuc generates nonradiative resonance energy that is transferred from the emitting rLuc to GFP, which becomes excited and in turn emits fluorescence when rLuc and GFP are in close proximity ( $\leq 100$  Å) as a consequence of fusion protein interaction. A BRET ratio is calculated for each transfection condition, as detailed in Materials and Methods. Significant interaction was obtained only in cells cotransfected with rLuc–Itch and tBid–GFP, whereas only a background-level signal was obtained in cells cotransfected with rLuc–Itch and Bid–GFP (Fig. 1B). Figure 1B shows a representative example of an increasing BRET ratio with increased GFP fusion expression, whereas rLuc was kept relatively constant; the average ratios of BRET signal obtained for a constant fluorescence/luminescence ratio are represented in the bar graph ( $n = 5$ , Fig. 1C).



**Fig. 1.** tBid, the active, apoptotic form of Bid, interacts with the ubiquitin ligase Itch, which leads to its degradation and proteasome-dependent degradation. (A) HEK-293T cells were cotransfected with either Bid-GFP or tBid-GFP in the presence of FLAG-Itch. Total cell lysates were blotted with anti-GFP and anti-FLAG to show protein expression, immunoprecipitated with anti-FLAG and blotted with anti-GFP to reveal Bid and tBid coimmunoprecipitation. (B) 293T cells were cotransfected with constant amounts of rLuc-Itch and various amounts of either Bid-GFP or tBid-GFP. The graph is a representative example of the saturation studies performed to provide evidence for a specific interaction between the proteins. BRET ratios were plotted as a function of the excited GFP activity to total rLuc activity ratio, allowing comparison of BRET ratios between Bid-GFP and tBid-GFP when expressed at the same levels. (C) The bar graph represents average BRET ratios at identical total YFP/rLuc ratios of four different experiments. The corrected BRET ratio for rLuc-Itch and tBid-GFP coexpression was arbitrarily set to 100%. (D) HEK-293T cells were transfected with Bid-GFP with or without FLAG-Itch. Cells were treated when indicated with 20  $\mu$ M lactacystin for 24 h. Total cell lysates were then immunoblotted for GFP to reveal Bid-GFP and tBid-GFP. (E) HEK-293T cells were transfected with tBid-GFP and Myc-ubiquitin in the presence or absence of FLAG-Itch and treated for 24 h with 20  $\mu$ M lactacystine or vehicle. The total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-GFP IgG and blotted with a monoclonal anti-Myc IgG to reveal tBid ubiquitylation. Cell lysates were further blotted with anti-GFP to assess for tBid-GFP expression, and anti-FLAG to assess FLAG-Itch expression. (F) HEK-293T cells were transfected with GFP and Myc-ubiquitin in the presence or absence of FLAG-Itch. The total cell lysates were immunoprecipitated with an anti-GFP IgG and blotted with a polyclonal anti-GFP IgG and a monoclonal anti-Myc IgG to reveal GFP ubiquitylation.

When HEK-293T cells were transfected with Bid-GFP, we consistently observed the appearance of a smaller relative molecular mass band, comigrating with tBid-GFP (Fig. 1A). Noting that this band was less abundant in cells also expressing FLAG-Itch, we wondered if this could be due to proteasomal degradation. Transfected tBid has previously been reported as sensitive to proteasomal degradation [14]. We thus used

lactacystin to treat HEK-293T cells cotransfected with FLAG-Itch and Bid-GFP, or transfected with Bid-GFP alone (Fig. 1D). When Itch was coexpressed with Bid-GFP, little or no tBid-GFP was produced (Fig. 1D, lane 2). In the presence of lactacystin, a significant increase in the amount of tBid-GFP present in the extract, both in control conditions and in the presence of FLAG-Itch, was observed (Fig. 1D, lanes 3,

4). These results together confirm that Itch and tBid are interacting proteins, and that Itch induces increased proteasomal degradation of tBid. On the contrary, the full-length form of Bid does not interact with Itch and is not subject to proteasomal degradation whether Itch is present or not.

#### tBid is a substrate of Itch

Because Itch expression appears to promote proteasomal degradation of tBid, we sought to demonstrate Itch-induced tBid ubiquitylation. We thus transfected HEK-293T cells with Myc-ubiquitin and tBid-GFP, with or without FLAG-Itch. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and tBid-GFP immunoprecipitated from the cell extracts with an anti-GFP IgG. Western blotting with anti-GFP IgG revealed approximately equal levels of tBid-GFP in all immunoprecipitates (Fig. 1E). We then immunoblotted the proteins with a monoclonal anti-Myc IgG to detect ubiquitylation. Bands corresponding to mono- and poly-ubiquitylated tBid-GFP were only detected in cells expressing FLAG-Itch (Fig. 1E, lanes 1, 2). Treating the cells with lactacystin prior to immunoprecipitation increased the level of detectable ubiquitylated tBid-GFP, both in cells expressing Itch and in control cells (Fig. 1E, lanes 3, 4), demonstrating further that ubiquitylated tBid is degraded in the proteasome, and that there is an appreciable ubiquitylation level of tBid, even without overexpression of Itch. Note that Itch is present in nontransfected HEK-293T cells [27]. Full-length Bid-GFP ubiquitylation could not be detected in these conditions, consistent with earlier reports (not shown)[14].

#### Itch influences cell survival

Because Itch expression promotes tBid ubiquitylation and decreases tBid, we wondered if Itch expression could procure protection from apoptosis and increase cell survival. To verify this, we compared cell survival and caspase 3 activity in control HEK-293T cells, cells overexpressing GFP-Itch and cells in which Itch expression was decreased by small interfering RNA (siRNA) (Fig. 2A) without any other treatment. Overexpression of Itch caused a small, but significant, ( $10.0 \pm$  standard error 4.0%;  $P = 0.043$ ) increase in cell survival as compared with the control. In contrast, cells in which Itch was reduced showed a large decrease in cell survival ( $73.0 \pm$  standard error 1.9%;  $P < 0.001$ ) (Fig. 2A, left panel).

Apoptosis was also influenced by Itch expression, as demonstrated by measuring caspase 3 activity. In cells expressing GFP-Itch, caspase 3 activity was reduced

to  $0.56 \pm 0.07$ -fold of control ( $P = 0.003$ ), whereas Itch downregulation by siRNA increased caspase 3 activity to  $1.50 \pm 0.06$ -fold of control ( $P = 0.004$ ; Fig. 2A, right panel). Itch expression in these experiments was shown by western blot (Fig. 2A, bottom panel).

Together, these results show that Itch expression itself influences the balance between cell survival and apoptosis in normal cell culture conditions.

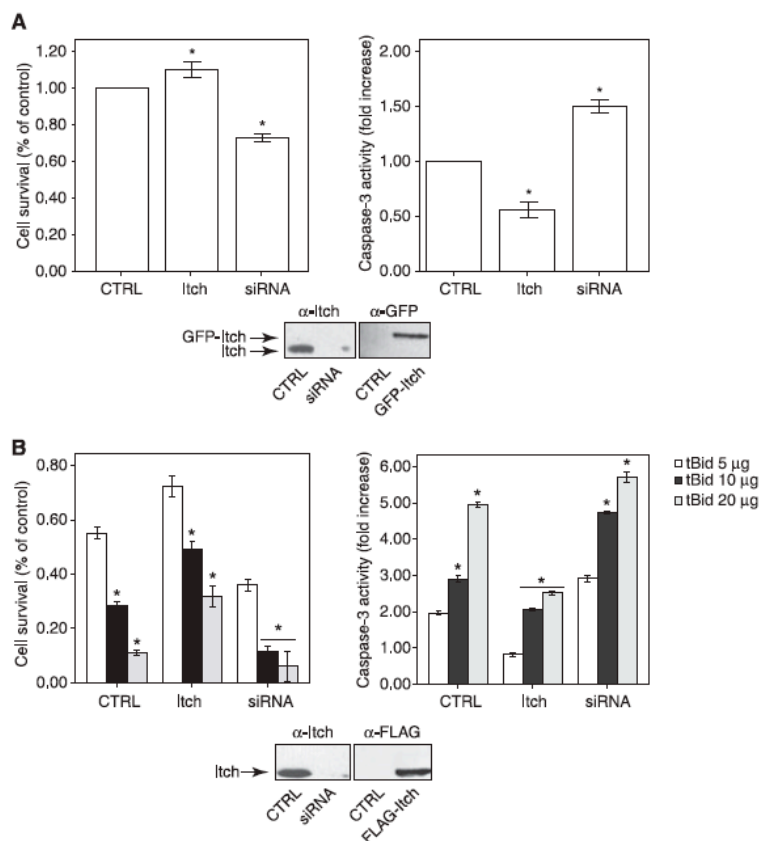
#### Itch protects cells from tBid-induced apoptosis

The cleaved form of Bid, tBid, directly induces cell apoptosis by triggering the aggregation of Bax and Bak on mitochondrial membranes, which liberates cytochrome *c* and activates caspase 3 and the apoptosome [23]. Transfection of tBid directly triggers mitochondrial-dependent apoptosis and caspase 3 activation [17]. Because Itch overexpression induces tBid degradation, we examined tBid-induced apoptosis in HEK-293T cells, in HEK-293T cells overexpressing Itch and in HEK-293T cells where Itch expression was reduced by siRNA (Fig. 2B, bottom panel). In cell survival assays, transfection of increasing amounts of tBid led to reciprocally lower cell survival (Fig. 2B, left panel, CTRL). Cell survival was significantly increased at all levels of tBid expression when cells were also transfected with GFP-Itch (Fig. 2B, left panel, Itch), consistent with reduced tBid levels in response to Itch presence. A reduction of Itch levels by siRNA had the opposite effect, further decreasing cell survival over transfection of tBid alone (Fig. 2B, left panel, siRNA), suggesting that more tBid was present in these cells.

Because tBid directly leads to cytochrome *c* release and caspase 3 activation, we looked at the effect of Itch levels on caspase 3 activity in response to tBid expression. The right panel in Fig. 2B demonstrates that increasing the amount of tBid-GFP transfected in HEK-293T cells led to increased caspase 3 activity. When GFP-Itch was cotransfected with tBid, caspase 3 activity was dramatically reduced (Fig. 2B, right panel, Itch). In contrast, reducing Itch expression by siRNA led to an additional increase in caspase 3 activity triggered by tBid overexpression. Together, these results show that Itch can significantly reduce cell apoptosis directly induced by tBid.

#### Itch protects cells from TRAIL-induced apoptosis

In living cells, tBid-dependent apoptosis occurs in response to ligands of the tumour necrosis factor- $\alpha$  family [28]. We thus examined if Itch protects cells from apoptosis induced by treatment with recombinant TRAIL, a key proapoptotic ligand under physiological



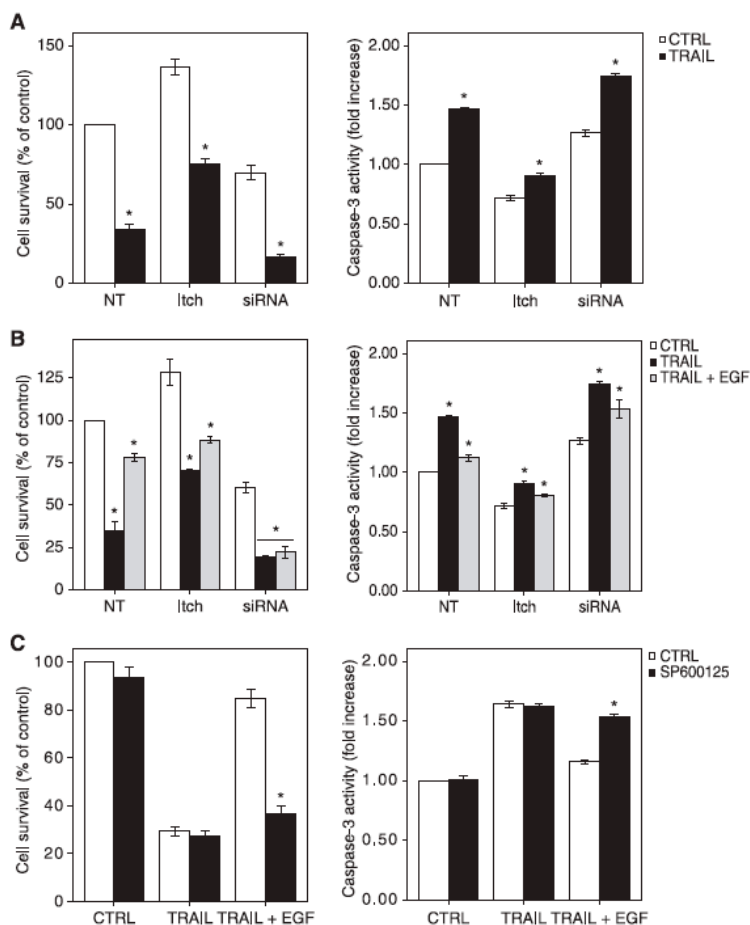
**Fig. 2.** Itch expression reduces tBid-dependent apoptosis and increases cell survival. (A) HEK-293T cells were transfected with GFP-Itch or plasmids encoding hairpin sequences targeted against Itch sequence (siRNA) and analysed for survival using the MTT method (left panel) or lysed and analysed for caspase 3 activity by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide (right panel). The graphs represent average cell survival as a percentage of the control and the average fold increase of caspase 3 activity relative to control cells, respectively. Error bars represent the standard deviation; the asterisk indicates  $P < 0.05$  in a Tukey test performed within groups. Some of the cells were lysed and immunoblotted with anti-Itch or anti-GFP to reveal endogenous Itch or GFP-Itch overexpression (bottom inset).  $n = 4$ . (B) HEK-293T cells were transfected with increasing concentrations of tBid-GFP alone (CTRL), with FLAG-Itch (Itch) or with plasmids encoding a small hairpin shRNA sequence targeted against Itch (siRNA). Cells were then analysed for cell survival (left) or caspase 3 activity (right). The bars represent the average percentage cell survival or average fold caspase 3 activity increase relative to the control, untransfected cells (not shown). Error bars represent the standard deviation; the asterisk indicates  $P < 0.05$  in a Tukey test performed within groups. Some of the cells were lysed and immunoblotted with anti-Itch or anti-FLAG to reveal endogenous Itch or FLAG-Itch overexpression (bottom inset).  $n = 4$ .

conditions [29]. Treatment of HEK-293T cells with TRAIL is known to induce caspase 8 activity and cleavage of Bid in tBid [30]. In our hands, treatment of HEK-293T cells with  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  TRAIL for 4 h led to a significant loss of cell viability ( $33.1 \pm 3.3\%$  of control;  $P < 0.001$ ) and increased caspase 3 activity ( $1.46 \pm 0.01$ -fold increase;  $P < 0.001$ ; Fig. 3A, NT). In cells expressing GFP-Itch, treatment with TRAIL led to a significantly smaller decrease in cell survival ( $75.4 \pm 3.3\%$  of control;  $P < 0.001$ ) and a significantly smaller increase in caspase 3 activity ( $0.9 \pm 0.02$ -fold increase;  $P = 0.01$ ; Fig. 3A, Itch). In

contrast, reducing Itch significantly increased TRAIL-induced cell death, as measured in the cell survival assay ( $16.3 \pm 1.7\%$  of control;  $P < 0.001$ ) and caspase 3 activation ( $1.74 \pm 0.02$ -fold increase;  $P < 0.001$ ; Fig. 3A, siRNA). Itch activity can thus protect cells from TRAIL-induced apoptosis.

#### The antiapoptotic effect of EGF stimulation depends in part on the function of Itch

Treatment of cells with EGF has been variously reported to protect cells from TRAIL-induced apoptosis



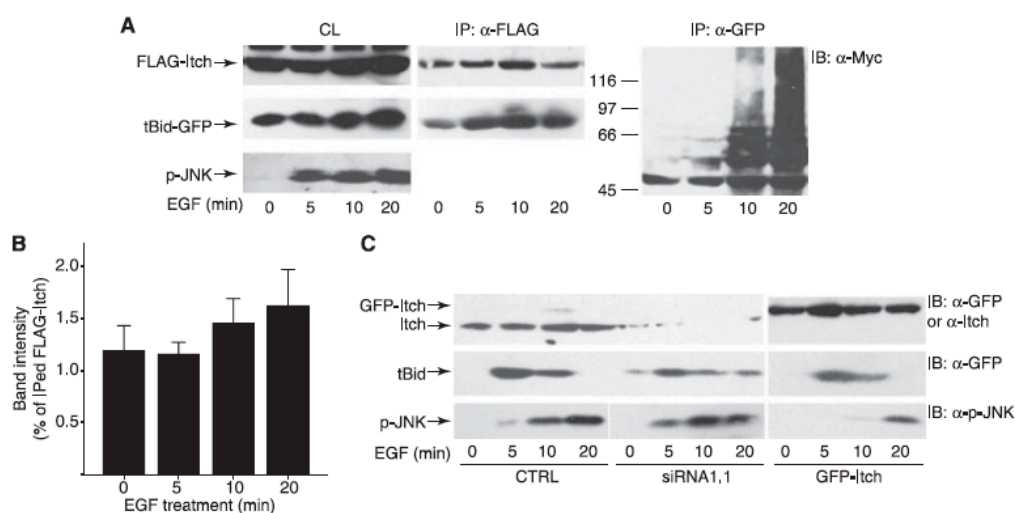
**Fig. 3.** Itch expression reduces TRAIL-induced cell death and is required for EGF protection against TRAIL-induced cell death. (A) HEK-293T cells transfected as indicated were treated with recombinant human TRAIL for 4 h and cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: control cells; filled bars: TRAIL-treated cells. (B) HEK-293T cells transfected as above were treated with 250 ng·mL<sup>-1</sup> recombinant human TRAIL for 4 h in combination or not with 100 ng·mL<sup>-1</sup> EGF. Cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: control cells; filled bars: TRAIL-treated cells; shaded bars: TRAIL- and EGF-treated cells. (C) Nontransfected HEK-293T cells were treated with TRAIL or TRAIL and EGF as above in the presence of 20  $\mu$ M SP600125 or vehicle (dimethylsulfoxide). Cell survival was assessed using the MTT assay. Caspase 3 activity was assessed by measuring degradation of the Ac-DEVD-pNA peptide. Open bars: control cells; filled bars: SP600125-treated cells. For all experiments, error bars represent one standard deviation; the asterisk indicates  $P \leq 0.05$  in a Tukey test performed within groups;  $n = 3$ .

[13,30–33], notably through a reduction of Bid expression [13]. EGF treatment triggers an intricate signalling network, which leads to the activation of several kinases [34]. In HEK-293T cells, EGF triggers robust activation of JNK (see Fig. 4), which was recently shown to phosphorylate and activate Itch [24,25,35]. Previously, we have shown that treatment of HEK-293T cells with EGF increased ubiquitylation of some substrates of Itch [4,24]. We thus examined the effect of Itch on

EGF's capacity to protect cells from TRAIL-induced apoptosis.

To address this, we examined cell survival and caspase 3 activity after the treatment of cells with TRAIL or TRAIL and EGF in control cells, cells expressing GFP–Itch or cells with reduced Itch expression (Fig. 3B). The treatment of cells with EGF significantly reduced TRAIL-induced apoptosis as assessed by cell survival measurement ( $78.1 \pm 4.0\%$  of con-





**Fig. 4.** Treatment with EGF increases Itch activity and influences tBid ubiquitylation and degradation. (A) HEK-293T cells were transfected with tBid-GFP, FLAG-Itch and Myc-ubiquitin plasmids. Cells were treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> EGF for the indicated time. Total cell lysates were divided into two; one half was immunoprecipitated with anti-FLAG and blotted with anti-FLAG and anti-GFP to show total protein coimmunoprecipitation of Itch and tBid (middle panels). The second half was immunoprecipitated with anti-GFP and blotted with anti-Myc to reveal tBid ubiquitylation (right panel). One twentieth of the original cell lysate was blotted with anti-GFP and anti-FLAG to reveal tBid and Itch expression, as well as anti-phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) to show JNK activation (left panels). (B) Densitometry analysis of tBid-GFP coimmunoprecipitated by FLAG-Itch immunoprecipitation after treatment of HEK-293T cells with EGF. Bars represent the ratio of immunoprecipitated tBid-GFP on FLAG-Itch; average value of three different experiments, error bars represent one standard deviation. (C) HEK-293T cells were transfected with a control vector, GFP-Itch, or plasmids encoding hairpin sequences targeted against the Itch sequence. Cells were then treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> EGF for the indicated time, and protein extracts blotted with anti-Itch to detect endogenous Itch expression or anti-FLAG to detect overexpressed FLAG-Itch. Protein extracts were also immunoblotted with anti-GFP to detect tBid, as well as with monoclonal antibody against phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) to show JNK activity.

tro;  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ ) and caspase 3 activity ( $1.12 \pm 0.03$ -fold increase;  $P = 0.312$ ;  $n = 3$ ), recapitulating results reported by several other investigators [13,30–33] (Fig. 3B, NT groups). As in previous experiments, cells transfected with Itch were protected from TRAIL-induced apoptosis ( $70.29 \pm 0.02\%$  of control;  $P = 0.001$  for cell survival and  $0.94 \pm 0.03$  of control for caspase activity), and treatment with EGF slightly increased this effect on cell survival ( $88.4 \pm 2.0\%$  of control;  $P = 0.001$ ) and caspase 3 activity ( $0.80 \pm 0.01$ -fold increase;  $P = 0.023$ ), demonstrating a slightly additive effect of Itch expression and EGF treatment. Importantly, a reduction of Itch expression by siRNA treatment significantly altered the capacity of EGF to protect cells from apoptosis. Cell survival of Itch-downregulated cells after treatment with TRAIL and EGF was reduced to  $22.4 \pm 3.6\%$  of control ( $P < 0.001$ ) and caspase 3 activity increased by  $1.53 \pm 0.08$ -fold ( $P < 0.001$ ; Fig. 3B). Together, these results clearly demonstrate that Itch activation in response to EGF significantly contributes to improved cell survival in the presence of EGF.

Our previous results [24] and reports from others [25,35] suggest that the increased activity of Itch after treatment with EGF is at least partly due to JNK activation. If this is the case, then the protective effect of EGF on TRAIL-induced apoptosis should also depend on JNK activity. To test this hypothesis, we treated HEK-293T cells with TRAIL and EGF in the presence of the JNK inhibitor SP600125 or in control conditions (Fig. 3C). Although the presence of the inhibitor had no significant effect on cell survival or caspase activity in control cells or after induction of apoptosis with TRAIL, it significantly impaired the ability of EGF to protect cells from TRAIL-induced apoptosis [ $P < 0.001$  for both the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and caspase 3 activity assays,  $n = 6$ ].

Together, these results indicate that Itch can efficiently induce tBid degradation after activation of caspase 8 by activation of tumour necrosis factor family receptors. Second, Itch also lies on the pathway activated by EGF to block some apoptotic stimuli, a process that involves JNK activation, at least in HEK-293T cells.

### EGF treatment influences tBid ubiquitylation and degradation

The EGF effect on TRAIL-induced apoptosis depends in part on Itch activity, which is influenced by JNK activity. We have previously shown that in HEK-293T cells, EGF treatment induced Itch JNK-dependent phosphorylation, which influenced the ability of Itch to interact with its substrates and to ubiquitylate them [24]. We thus tested the effect of treatment with EGF on Itch and tBid binding, as well as on Itch-induced tBid ubiquitylation. Figure 4A shows that when HEK-293T cells transfected with tBid-GFP and FLAG-Itch were treated with EGF, immunoprecipitation of FLAG-Itch coimmunoprecipitated increasing amounts of tBid-GFP. However, when adjusted for differences in protein expression between samples, a densitometry study of different gels showed that the difference was not statistically significant (Fig. 4B). Nevertheless, more ubiquitylated tBid-GFP was detected by GFP immunoprecipitation after incubation of the transfected cells with EGF (Fig. 4A). Ubiquitylated tBid-GFP was detected by blotting immunoprecipitated proteins with an anti-Myc IgG. In the same conditions, neither interaction with Bid-GFP nor ubiquitylation of Bid-GFP could be detected, showing once again that only the truncated active form tBid interacts with Itch and is susceptible to ubiquitylation by the ligase (data not shown).

We also examined whether treatment of cells with EGF affected the level of tBid produced upon overexpression of Bid-GFP. In control cells, transfected only with Bid-GFP, spontaneously produced tBid-GFP decreased slightly after treatment with EGF (Fig. 4C, first panel). When Itch expression was reduced by siRNA, the amount of tBid-GFP remained stable, and when Itch was overexpressed, much less tBid accumulated (Fig. 4C, panels 2, 3).

### Discussion

The present study has identified Itch as a ubiquitin ligase responsible for tBid ubiquitylation and proteasomal degradation, and suggests that Itch could be an important intermediate in EGF-induced resistance to apoptosis, at least in certain cell types. We have demonstrated an interaction between Itch and the proapoptotic protein, tBid. Itch activation decreases tBid by causing tBid degradation in proteasomes. Furthermore, we have demonstrated that Itch protects cells from the apoptotic effect of tBid. Itch overexpression decreases tBid-induced caspase 3 activity, increasing cell viability. Importantly, when endogenous Itch is downregulated by siRNA, cell viability is decreased.

These results are consistent with earlier reports stating that tBid, but not Bid, is ubiquitylated in cells, and that inhibition of the proteasome increases apoptosis by increasing tBid levels [14]. Thus, we have identified the ligase responsible for limiting the extent of tBid-induced apoptosis. This conclusion is strengthened by our observation that reducing the basal level of Itch reduces cell survival and increases caspase 3 activity, consistent with increased tBid levels in these cells.

Interestingly, Itch interacts specifically with tBid, and not with Bid. This is also consistent with observations from Breitschopf *et al.* [14], who showed that only tBid is ubiquitylated and stabilized by proteasome inhibition, not Bid. Similarly, it was recently reported that the N-terminal portion of Bid needs to be cleaved and degraded to allow tBid to interact with its partners [15]. Removal of the N-terminal portion also seems to be necessary to allow the interaction of tBid with Itch. The molecular basis of this interaction is currently unknown, as tBid does not contain any of the usually recognized interaction motifs with Itch. However, this is not unprecedented, as several recognized substrate of Itch do not contain any such motifs [6,9].

Consistent with its capacity to induce tBid ubiquitylation and degradation, we have found that Itch can protect cells from apoptosis, probably through a direct reduction of tBid levels. Interestingly, our results suggest that Itch is at least partly necessary as an intermediate between EGF treatment and cell survival in the context of TRAIL-induced apoptosis. Our results are in general agreement with others that EGF reduction of the TRAIL apoptotic effect does not involve a reduction of caspase 8 activity [13,30], as cleavage of Bid is not affected by Itch overexpression; nevertheless, treatment with EGF has been shown to reduce caspase 8 activity through Src phosphorylation of caspase 8 in HeLa cells [36]. We base the conclusion that caspase 8 is not inactivated in our system on the observation that expressed Bid-GFP was consistently reduced after treatment with EGF in cells expressing Itch compared with cells where Itch was downregulated or maintained inactive by blockade of JNK (not shown). This reduction in Bid-GFP was consistent between experiments and probably not due to uneven transfection levels, as very consistent expression levels were obtained in untreated cells. Intriguingly, it is directly correlated with the disappearance of tBid-GFP, which can be accounted for by Itch ubiquitylating activity. However, we could not demonstrate a direct interaction nor ubiquitylation of intact Bid by Itch. This leads to the suggestion that removal of tBid by proteasomal degradation leads to an increase in Bid cleavage, resulting in the disappearance of both Bid and tBid. Similarly,

Ethier *et al.* [13] observed that a constant ratio of Bid/tBid protein was maintained over time with EGF treatment, resulting in a loss of both proteins.

Although it is clear that EGF receptor activation induces an antiapoptotic response in several cell lines, many downstream signalling mechanisms have been proposed to mediate this effect, none of them mutually exclusive. Activation of Akt by treatment with EGF has been shown to protect cells from TRAIL-induced apoptosis by increasing the phosphorylation of Bad, which impairs Bax and Bak recruitment to mitochondria and inhibits cytochrome *c* release [30]. In addition, Akt stimulation activates the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) pathway, inducing expression of Mcl-1, which also blocks recruitment of Bax and Bak to the mitochondria [31]. We have shown here that EGF treatment also activates JNK, and that this activation is required for the protective effect of EGF, at least in HEK-293T cells. We propose that it is through JNK activation that EGF treatment can induce Itch activity and increase tBid proteasomal degradation, which is an efficient way to protect cells from apoptosis. Because tBid, Bax and Bak all co-operate to induce cytochrome *c* release from the mitochondria, both pathways are thus converging towards the same end goal.

Phosphorylation of Itch by JNK increases its activity and ability to interact with its substrates [25,35]. Here we have shown that the ability of Itch to interact with and ubiquitylate tBid significantly increases following treatment with EGF, consistent with our previous findings [24]. This observation sheds new light on the mechanism by which EGF treatment could induce a dose-dependent reduction of Bid, but not affect Bid mRNA levels [13]. We have demonstrated here that Itch activity is necessary for the EGF protective effect, at least in HEK-293T cells, an effect probably due to JNK or another kinase activation. Interestingly, constitutive JNK activation is correlated with EGF receptor expression in numerous diffuse gliomas [37]. Moreover, inhibition of the EGF receptor is largely used to increase proapoptotic treatment of cancer [12,38] and proteasomal inhibitors are emerging as efficient cancer therapies [39]. Our findings provide a potential direct link between EGF signalling, JNK activation and antiapoptotic reaction through the downregulation of tBid by Itch and proteasomal degradation. They also provide a more detailed mechanism towards the possible means of action of popular cancer therapy, providing cues as how to refine further those treatments.

The relationship of Itch to apoptosis is not restricted to tBid. Itch is known for its ability to ubiquitylate and induce degradation of cFLIP, a caspase 8 inhibi-

tor, which promotes caspase 8 activity and cell death in mice models [40]. Itch itself is also a substrate of caspases 6 and 7, which have been reported to cleave Itch at Asp242, a reaction that will remove Itch C2 and proline-rich domains, but will leave WW and catalytic domains intact, presumably increasing Itch activity [41]. Moreover, mouse embryonic fibroblasts obtained from *Itch*<sup>-/-</sup> are more susceptible to apoptosis induced by DNA-damaging agents [42]. Clearly, Itch activity is intricately linked to several apoptotic reactions, and may play a very important regulatory role at several levels. It will therefore be very important to decipher its role, and under what circumstances certain targets of Itch are more susceptible to be ubiquitylated. Likewise, a close examination of Itch expression during development and in different cell types is needed. Recently, the *Itch* gene has been reported to be amplified in anaplastic thyroid carcinoma (ATC) cells, one of the most potent tumour types in humans [43]. Compared with the normal thyroid epithelia, overexpression of Itch protein in primary thyroid tumours, including ATC, was observed. Knockdown of Itch by siRNA suppressed the growth of ATC cells highly expressing Itch, whereas ectopic overexpression of Itch promoted the growth of ATC cells with relatively weak expression [43]. Together, these results demonstrate that, like many other molecules, Itch can be both pro- and antiapoptotic. Given the fact that Itch activity can be regulated by cell signalling, its relationship to cell survival and apoptosis is undeniable, and Itch could be an important signalling gateway.

Several apoptotic molecules are the target of ubiquitin ligases and are downregulated by proteasomal degradation. These include the inhibitory Bcl-2 family members Bcl-2, Mcl-1, the proapoptotic proteins Bax, BH3-only proteins Bim and Bak and the C-terminal fragment of Bid. The ubiquitin ligases responsible for the ubiquitylation are in most cases not known [44]. Here, we have identified Itch as the ubiquitin ligase responsible for the ubiquitylation and downregulation of tBid. More importantly, we have shown how this ubiquitylation reaction can be modulated by EGF signalling and have provided cues towards a more general mechanism of control of apoptosis by ubiquitin ligases.

## Materials and methods

### Plasmids, antibodies and reagents

All plasmids encoding Itch and Myc-ubiquitin have been described previously [4]. Small hairpin RNA (ShRNA) sequences directed against Itch sequences 5'-GACGTT

TGTGGGTGATTTT-3' (Itch siRNA 1.1) and 5'-GGAG CAACATCTGGATTAA-3' (Itch siRNA 1.2) were inserted into pSilencer4.1-cytomegalovirus neovector (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's recommendations. The results shown were obtained with Itch siRNA 1.1 vector. Bid-GFP and tBid-GFP plasmids were a kind gift from D. Du Pasquier (Université Paris-Sud, Orsay, France) [45].

Monoclonal antibodies against the FLAG and Myc epitopes were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), respectively. The polyclonal antibody against GFP was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The monoclonal antibody against phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) was purchased from GenScript (Piscataway, NJ, USA). MTT reagents and the recombinant human TRAIL/APO 2 ligand were purchased from Invitrogen and Feldan Bio (St-Laurent, QC, Canada), respectively. The caspase 3 substrate (Ac-DEVD-pNA) and the inhibitor substrate (Ac-DEVD-CHO) were purchased from Biomol International (Farmingdale, NY, USA).

### Cell transfection and treatments

All cells were transfected with the indicated plasmids using calcium/phosphate [46] and 10 µg plasmid/10 cm plate, unless otherwise stated. For treatment with EGF, cells were serum starved overnight in serum-free media and treated at 37 °C with 100 ng·mL<sup>-1</sup> recombinant EGF for the indicated time. For treatment with TRAIL, cells were similarly serum starved and treated with 250 ng·mL<sup>-1</sup> recombinant TRAIL for 4 h. For inhibition experiments, lactacystin and SP600125 were used overnight at 20 and 30 µg·mL<sup>-1</sup>, respectively.

### Immunoprecipitation and ubiquitylation assays

Dishes (10 cm) of transfected HEK-293T cells were washed in phosphate-buffered saline and resuspended in 1 mL buffer A (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl) plus protease inhibitors. The cells were lysed by sonication and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. Extracts were incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged at 18 000 *g* in a microcentrifuge at 4 °C. For immunoprecipitation assays, extracts of transfected cells were immunoprecipitated using protein A-Sepharose beads and antibodies against the target proteins for 16 h at 4 °C. Beads were washed extensively with buffer A/1% Triton X-100 and prepared for western blot analysis.

### BRET analysis

For BRET analysis, HEK-293T cells ( $2 \times 10^6$ ) were cotransfected with cDNAs coding for rLuc-Itch and different GFP fusion proteins. Forty hours post-transfection, the cells were

washed in phosphate-buffered saline, collected in 1 mL Tyrode's solution containing 5 mM EDTA, and then diluted to 10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup>. Coelenterazine (Biotium, Hayward, CA, USA) was added at a final concentration of 5 µM. Total fluorescence was measured in a FlexStation apparatus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Luminescence and fluorescence were quantitated with a Mithras LB 940 apparatus (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). Three measures were obtained: first, light emitted at 485 ± 20 nm by rLuc; second, emission fluorescence at 530 ± 25 nm without excitation due to energy transfer from rLuc to GFP; third, emission fluorescence at 530 nm after excitation at 485 nm to measure total expression of GFP fusion proteins. The BRET ratio was defined as [(emission at 510–590 nm) – (emission at 440–500 nm) × *Cf*]/(emission at 440–500 nm), where *Cf* corresponds to (emission at 510–590 nm)/(emission at 440–500 nm) for rLuc-fused Itch expressed alone in the same experiments [47].

### Cell survival assay

HEK-293T cells were plated in six-well plates and transfected with the indicated vectors. Cells were then plated in 96-well plates at a concentration of 10 000 cells·well<sup>-1</sup> with 100 µL medium. After 24 h incubation, 15 µL MTT reagent at a final concentration of 100 mg·mL<sup>-1</sup> was added to the cultured cells and incubated for 1 h at 37 °C or until the blue formazane product became visible to the naked eye. The reaction was ended by adding 115 µL solubilization buffer to each well (20% SDS, 20% acetic acid, pH 4) for 1 h at 37 °C. Absorbance was read at 540 and 690 nm in a microplate reader. The specific MTT signal =  $A_{540} - A_{690}$ .

### Caspase 3 activity

To measure caspase 3 activity, variously transfected and treated HEK-293T cells were lysed by sonication in buffer A and centrifuged at 18 000 *g* for 15 min. Caspase 3 activity was measured by the cleavage of Ac-DEVD-pNA substrate (100 µM) in a reaction mixture containing 100 µg protein from extracted cells for a period of 1 h at 37 °C. The absorbance of the sample was measured in a microplate reader at 405 nm. Background activity was determined by preincubating cells with 0.1 µM caspase 3 inhibitor Ac-DEVD-CHO for 10 min at room temperature prior to treatment with the caspase 3 substrate. Background readings were subtracted from all samples and caspase 3 activity expressed as a fold increase over nontransfected and nontreated control cells.

### Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SPSS 16.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA). The statistical significance of the differ-

ences was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) and posthoc Tukey's test. The densitometry analysis was carried out in ADOBE PHOTOSHOP CS (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

### Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant 288238 to AA. AA is supported by a FQRNT young investigator award. We thank D. Du Pasquier for the kind gift of the Bid vectors, and P. S. McPherson and P. A. Barker for useful discussion and advice. We are also extremely grateful to Michel Bouvier and Billy Breton for guidance and assistance in our BRET experiments.

### References

- Rotin D, Staub O & Haguenauer-Tsapis R (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**, 1–17.
- Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, Hunter T, Copeland N, Jenkins N & Liu YC (2002) Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol* **3**, 281–287.
- Parravicini V, Field AC, Tomlinson PD, Basson MA & Zamoyska R (2008) Itch<sup>-/-</sup> alpha-beta and gammadelta T cells independently contribute to autoimmunity in Itchy mice. *Blood* **111**, 4273–4282.
- Angers A, Ramjaun A & McPherson P (2004) The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem* **279**, 11471–11479.
- Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C & Liu Y (2004) Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell* **15**, 825–831.
- Chastagner P, Israel A & Brou C (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **7**, 1147–1153.
- Feng L, Guedes S & Wang T (2004) Atrophin-1-interacting protein 4/human Itch is a ubiquitin E3 ligase for human enhancer of filamentation 1 in transforming growth factor-beta signaling pathways. *J Biol Chem* **279**, 29681–29690.
- Ikeda A, Caldwell RG, Longnecker R & Ikeda M (2003) Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol* **77**, 5529–5534.
- Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T & Liu YC (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **275**, 35734–35737.
- Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G & Melino G (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J* **24**, 836–848.
- Xian CJ (2007) Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev* **28**, 284–296.
- Henson ES & Gibson SB (2006) Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* **18**, 2089–2097.
- Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R & Bilodeau M (2003) Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G298–G308.
- Breitschopf K, Zeiher AM & Dimmeler S (2000) Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem* **275**, 21648–21652.
- Tait SW, de Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS & Borst J (2007) Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol* **179**, 1453–1466.
- Esposti MD (2002) The roles of Bid. *Apoptosis* **7**, 433–440.
- Li H, Zhu H, Xu CJ & Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491–501.
- Deng Y, Lin Y & Wu X (2002) TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* **16**, 33–45.
- Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA & Latchman DS (2002) Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **90**, 745–748.
- Zhai D, Huang X, Han X & Yang F (2000) Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes. *FEBS Lett* **472**, 293–296.
- Degli Esposti M, Ferry G, Masdehors P, Boutin JA, Hickman JA & Dive C (2003) Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* **278**, 15749–15757.
- Epand RF, Martinou JC, Fornallaz-Mulhauser M, Hughes DW & Epand RM (2002) The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* **277**, 32632–32639.
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E & Gross A (2002) tBID Homooligomerizes in the mitochondrial

- membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 12237–12245.
- 24 Azakir BA & Angers A (2009) Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cell Signal* **21**, 1326–1336.
  - 25 Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC & Karin M (2004) Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* **306**, 271–275.
  - 26 Dupre S, Urban-Grimal D & Haguenaer-Tsapis R (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 89–111.
  - 27 Mouchantaf R, Azakir B, McPherson P, Millard S, Wood S & Angers A (2006) The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem* **281**, 38738–38747.
  - 28 Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* **274**, 1156–1163.
  - 29 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA *et al.* (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673–682.
  - 30 Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J & Gibson SB (2002) Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* **62**, 488–496.
  - 31 Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N & Gibson SB (2003) Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* **89**, 1177–1192.
  - 32 Park SY & Seol DW (2002) Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 515–518.
  - 33 Teraishi F, Kagawa S, Watanabe T, Tango Y, Kawashima T, Umeoka T, Nisizaki M, Tanaka N & Fujiwara T (2005) ZD1839 (Gefitinib, 'Iressa'), an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, enhances the anti-cancer effects of TRAIL in human esophageal squamous cell carcinoma. *FEBS Lett* **579**, 4069–4075.
  - 34 Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A & Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* **1**, 2005.0010.
  - 35 Gallagher E, Gao M, Liu YC & Karin M (2006) Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 1717–1722.
  - 36 Cursi S, Rufini A, Stagni V, Condo I, Matafora V, Bachi A, Bonifazi AP, Coppola L, Superti-Furga G, Testi R *et al.* (2006) Src kinase phosphorylates caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J* **25**, 1895–1905.
  - 37 Li JY, Wang H, May S, Song X, Fueyo J & Fuller GN (2008) Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase correlates with histologic grade and EGFR expression in diffuse gliomas. *J Neurooncol* **88**, 11–17.
  - 38 Astsaturou I, Cohen RB & Harari P (2007) EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **7**, 650–665.
  - 39 Orłowski RZ & Kuhn DJ (2008) Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* **14**, 1649–1657.
  - 40 Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC & Karin M (2006) The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* **124**, 601–613.
  - 41 Rossi M, Inoue S, Walewska R, Knight RA, Dyer MJ, Cohen GM & Melino G (2009) Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 659–664.
  - 42 Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, Mathon N, Knight RA & Melino G (2007) Itch inhibition regulates chemosensitivity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 33–36.
  - 43 Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Noh JY, Ito K, Imoto I & Inazawa J (2008) ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* **99**, 1940–1949.
  - 44 Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD & Meller R (2008) Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 90–95.
  - 45 Du Pasquier D, Rincheval V, Sinzelle L, Chesneau A, Ballagny C, Sachs LM, Demeneix B & Mazabraud A (2006) Developmental cell death during *Xenopus* metamorphosis involves BID cleavage and caspase 2 and 8 activation. *Dev Dyn* **235**, 2083–2094.
  - 46 Kingston RE, Chen CA & Rose JK (2003) Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 9, Unit 9.1.
  - 47 Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, Mascle XH, Dianoux L, Estephan P, Chelbi-Alix MK & Aubry M (2009) Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* **284**, 16595–16608.

## ANNEXE 2.

### Utilisation du BRET pour évaluer l'interaction entre la ligase de l'ubiquitine Itch et LITAF

La mise au point du BRET afin de tester les interactions avec la ligase Itch permet son application à une foule de protéines potentielles, tel que démontré ici avec LITAF. Des résultats obtenus par notre laboratoire montrent un changement de localisation de la ligase Itch suite à sa coexpression avec LITAF. Cette petite protéine lysosomale est peu étudiée à ce jour. On sait toutefois que la mutation du gène codant pour cette protéine est associée à la maladie de Charcot-Marie-Tooth. L'intérêt de cette protéine pour notre laboratoire est son effet sur Itch via sa relocalisation des endosomes vers les lysosomes. Nous avons donc entrepris d'évaluer l'interaction entre ces protéines afin de déterminer si une interaction directe est à la base du phénomène observé. Les résultats ci-dessous représentent la confirmation de l'interaction obtenue par BRET dans le cadre des travaux préliminaires effectués pour mes études doctorales avec Dre Annie Angers.

