

Université de Montréal

**Importance de la phosphorylation de la ligase Itch dans la reconnaissance et
l'ubiquitylation des protéines à domaine SH3**

Par
Rachel Forget

Département de Sciences Biologiques
Faculté des Arts et Sciences

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

Février, 2012

© Rachel Forget, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et post-doctorales

Ce mémoire intitulé
**Importance de la phosphorylation de la ligase Itch dans la reconnaissance et
l'ubiquitylation des protéines à domaine SH3**

Présenté par :
Rachel Forget

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Matton, président-rapporteur
Annie Angers, directrice de recherche
Jean Rivoal, membre du jury

RÉSUMÉ

Itch est une ligase de l'ubiquitine impliquée dans la reconnaissance et la dégradation des protéines par le protéasome. Itch contient trois sites phosphorylés par JNK et il a été démontré que la phosphorylation de ces résidus est nécessaire pour que Itch puisse reconnaître et ubiquityler les protéines c-Jun et JunB. Ces sites de phosphorylation se retrouvent dans le domaine PRD responsable des interactions de Itch avec les protéines à domaine SH3. Si la phosphorylation de Itch par JNK est importante pour réguler son activité avec c-Jun et JunB, on connaît peu de choses sur les interactions de Itch avec les protéines à domaine SH3 ainsi que l'implication de la phosphorylation dans leur régulation. Nous avons donc créé des mutants de Itch par mutagenèse dirigée où les sites de phosphorylation étaient remplacés par des alanines (mutant non phosphorylable) et où l'un des trois sites était remplacé par un acide aspartique (mutant constitutivement phosphorylé). Ces mutants sont utilisés dans des tests d'interaction et d'ubiquitylation, dans le but de déterminer l'impact de la phosphorylation de Itch dans la reconnaissance et l'ubiquitylation des protéines SH3. Nos résultats montrent que, contrairement au modèle proposé, la phosphorylation de Itch n'est pas essentielle à l'interaction de Itch avec l'endophiline, mais la phosphorylation de Itch module l'ubiquitylation ainsi que la dégradation de l'endophiline. La régulation de l'interaction de Itch avec ses substrats est donc différente selon le substrat.

Mots-clés : Itch, ubiquitylation, phosphorylation, endophiline, JNK, interaction, régulation

ABSTRACT

Itch is an ubiquitin ligase involved in protein recognition and degradation by the proteasome. Itch has three phosphorylation sites targeted by JNK. These sites overlap a small proline rich domain responsible for Itch binding to SH3 domain proteins. Phosphorylation of Itch is important for Itch interaction with c-Jun and JunB. However, little is known about Itch interaction with SH3 proteins and the impact of phosphorylation on Itch ability to recognize and ubiquitinate SH3 proteins. We created a phosphomimic mutant of Itch and a mutant of Itch that cannot be phosphorylated by JNK. We tested these mutants in interaction and ubiquitination assays to determine their effect on Itch ability to bind and ubiquitinate Endophilin, an SH3 domain protein. Phosphorylation is not a prerequisite for Itch binding to Endophilin but phosphorylation of Itch modulates Itch ability to ubiquitinate Endophilin. Phosphorylation of Itch also modulates Endophilin fate, as phosphomimic Itch induces degradation of Endophilin compared to non-phosphorylated Itch. These results show that phosphorylation regulates Itch activity towards different substrates in different ways.

Keywords: Itch, ubiquitination, phosphorylation, Endophilin, JNK, interaction, regulation, SH3 proteins

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
REMERCIEMENTS	IX
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Ubiquitylation	1
1.1.1. Principes généraux.....	1
1.1.2. Les enzymes de l'ubiquitylation.....	3
1.2. Régulation de l'ubiquitylation	4
1.2.1. Relocalisation de la ligase ou du substrat.....	4
1.2.2. Phosphorylation de la ligase ou du substrat.....	5
1.2.3. Ubiquitylation des ligases	7
1.3. La ligase Itch.....	8
1.3.1. Structure	8
1.3.2. Itch dans les différents processus cellulaires.....	9
1.4. La régulation de la ligase Itch	13
1.4.1. Phosphorylation.....	14
1.4.2. Interactions avec des protéines adaptatrices.....	16
1.4.3. Autoubiquitylation et désubiquitylation.....	17
1.4.4. Clivage par des caspases.....	18
1.5. Objectifs et hypothèses	19
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	21
2.1. Mutagenèse	21
2.2. Plasmides utilisés	23
2.3. Anticorps.....	24

2.4.	Transfections.....	24
2.5.	Immunofluorescence.....	24
2.6.	Immunoprécipitation	25
2.7.	BRET.....	27
2.8.	Protéines de fusion	28
2.9.	Chromatographie d'affinité	29
2.10.	Dégradation de l'endophiline	31
3.	RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	33
3.1.	Constructions et expression des mutants de la ligase Itch.....	33
3.2.	Localisation des mutants de la ligase Itch	35
3.3.	Autoubiquitylation des différents mutants de la ligase Itch	37
4.	RÉSULTATS	39
4.1.	Interaction de la ligase Itch avec l'endophiline	39
4.2.	Ubiquitylation de l'endophiline par Itch	41
4.3.	Dégradation de l'endophiline endogène.....	43
5.	DISCUSSION.....	48
5.1.	Itch, JNK et les protéines SH3	48
5.2.	Itch, Fbw7 et la phosphorylation	51
5.3.	Itch et les autres protéines SH3	53
5.4.	Itch et l'encombrement stérique causé par la phosphorylation	54
5.5.	Itch et les protéines activatrices	55
6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	56
7.	RÉFÉRENCES	58

Liste des figures

Figure 1 : Types de chaînes d'ubiquitine formées sur les substrats et leur différents rôles.....	2
Figure 2 : Processus d'ubiquitylation.....	4
Figure 3 : Structure de Itch.....	9
Figure 4 : Itch et ses substrats dans différents processus cellulaires.....	10
Figure 5 : Mécanismes de régulation de la ligase Itch dans les cellules immunitaires.....	13
Figure 6 : Aperçu de la méthode de mutagenèse dirigée.....	21
Figure 7 : Processus d'immunoprécipitation.....	24
Figure 8 : Schéma représentant la chromatographie d'affinité.....	28
Figure 9 : Représentation schématique des constructions de la ligase Itch.....	32
Figure 10 : Expression des différents mutants de la ligase Itch.....	33
Figure 11 : Localisation des constructions de la ligase Itch dans des cellules COS.....	34
Figure 12 : Autoubiquitylation des constructions de la ligase Itch.....	35
Figure 13 : Interaction entre les différents mutants de Itch et le domaine SH3 de l'endophiline.....	37
Figure 14 : Interaction entre rLuc-endophiline et GFP-Itch.....	38
Figure 15 : Ubiquitylation de l'endophiline par les mutants de la ligase Itch.....	40
Figure 16 : Dégradation de l'endophiline endogène en présence des différents Itch suite à un traitement à la cycloheximide.....	42
Figure 17 : Dégradation de l'endophiline par la ligase Itch.....	43

Liste des tableaux

Tableau I : Amorces utilisées pour l'obtention des mutations ponctuelles sur la ligase Itch par mutagenèse dirigée ainsi que la séquence d'acides aminés mutés correspondants.....	21
Tableau II : Les différents mutants de la ligase Itch ainsi que l'effet des mutations ponctuelles sur la ligase.....	31

Liste des abréviations

AIP4 : Atrophin Interacting Protein 4
ATP : adénosine triphosphate
BAR : Bin/Amphiphysin/Rvs
BARD1 : BRCA1 associates RING domain 1
BRCA1 : Breast cancer 1
CASP : C-terminal caspase-8-like
CHX : cycloheximide
CKII : Casein Kinase 2
CL : cell lysate
COS : CV-1 in origin and carrying SV40 genetic material
DUB : Desubiquitinating enzyme
E1 : Ubiquitin activating enzyme
E2 : Ubiquitin conjugating enzyme
E3 : Ubiquitin ligase
EGF : endothelial growth factor
ENaC : endothelial sodium channel
FAF : fat facet
FAM : fat facet in mouse
GFP : green fluorescence protein
GPCR : G protein coupled receptor
GST : Glutathione sepharose transferase
HA : hemagglutine
HECT : Homologous to E6-AP C-terminus
HEK 293T : human embryonic kidney 293T
HRS : hepatocyte growth-factor related kinase substrate
IL-4 : interleukin-4
JNK : c-Jun N-terminal kinase
Monoub : monoubiquitylation
Multiub : multiubiquitylation

N4BP1 : Nedd-4 binding partner 1
NDFIP : Nedd-4 family interacting protein
Nedd4-2 : Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4-2
Par : partitioning defective
PARP : poly-ADP-ribose polymerase
PBS : phosphate buffer saline
PCR : polymerase chain reaction
PD: pulldown
PKA : protein kinase A
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride
Polyub : polyubiquitylation
PPXY : Proline-Proline-Acide aminé X- Tyrosine
PRC1 : Polycomb repressive complex 1
PRD : Proline rich domain
PY : Proline-tyrosine
RING : really interesting new gene
SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel
SGK1 : serum- and glucocorticoid-related kinase 1
SH3 : src homology domain 3
Smurf : Smad ubiquitination related factor
t-Bid : truncated Bid
TKB: Tyrosine kinase binding domain
TCR : T cell receptor
TGF- β : transforming growth factor β
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TSG101 : tumor susceptibility gene 101
UBA : ubiquitin associated domain
WT : wild type
WW : tryptophan-tryptophan domain

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Annie Angers pour l'élaboration du projet, les idées et son aide au niveau technique. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans votre laboratoire.

J'aimerais dire un énorme merci à mon collègue et l'ainé du labo, Guillaume Desrochers, pour avoir répondu à mes innombrables questions et pour les échanges d'idées. Ce fut agréable et constructif. Merci aux stagiaires qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Un merci à mes voisins de corridor Alexe, Ha-Loan, Thierry, Matthieu, Maggie et Solmaz qui ont rendu les moments difficiles plus agréables.

Merci au Drs Mohamed Hijri et Anja Geitman pour m'avoir partagé leurs connaissances en microscopie confocale et de m'avoir permis d'utiliser leur microscope. Merci aux Drs Jean Rivoal et Daniel Matton pour avoir pris de leur temps pour la lecture et la correction de ce mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études ainsi que mes sœurs et leurs conjoints pour m'avoir permis de décrocher de temps en temps.

1. Introduction

Ce projet vise à comprendre la régulation de la ligase de l'ubiquitine Itch. Il existe divers moyens de contrôler l'activité des enzymes, impliquant souvent des modifications post-traductionnelles. Dans le cas de la ligase Itch, la phosphorylation est une modification régulant son activité (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006, Yang *et al*, 2006, Morales *et al*, 2007). Lorsque la ligase Itch est phosphorylée par JNK (c-Jun N-terminal kinase), elle subirait un changement de conformation qui libérerait les domaines d'interaction de Itch. La libération de ces domaines permettrait à la ligase d'interagir avec ses substrats et mènerait ainsi à leur ubiquitylation. Ce modèle a été décrit par Gallagher et ses collègues suite à des résultats obtenus lors de la caractérisation de l'interaction entre Itch et les protéines Jun, des protéines reconnues par les domaines WW de Itch (Gallagher *et al*, 2006). Des études de notre laboratoire ont cependant montré que la ligase Itch possède une autre catégorie de substrats, soit des protéines contenant des domaines SH3 et capables d'interagir avec le domaine riche en proline de Itch (Angers *et al*, 2004). Les travaux décrits ici consisteront donc à déterminer si la phosphorylation de la ligase Itch par JNK permet de réguler l'interaction et l'ubiquitylation des protéines à domaine SH3 qui sont des substrats de Itch.

1.1. Ubiquitylation

1.1.1. Principes généraux

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur une protéine. L'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés, se lie aux substrats via un lien peptidique entre une glycine en C-terminal de l'ubiquitine et le groupement amine de la chaîne latérale d'une lysine du substrat. L'ajout de cette ubiquitine sur le substrat influence la stabilité, l'activité et la régulation des protéines marquées (figure 1) (Hershko et Ciechanover, 1998).

L'ubiquitylation est impliquée dans la dégradation des protéines, mais également dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme l'induction de la réponse inflammatoire, la réparation de l'ADN et l'endocytose. Le type d'ubiquitylation détermine le sort de la protéine modifiée. Il existe plusieurs types d'ubiquitylation (figure 1). La mono-ubiquitylation consiste en l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur le

substrat. La multi-ubiquitylation est l'ajout de plusieurs unités d'ubiquitine sur divers résidus lysines d'un même substrat. Ces types d'ubiquitylation sont impliqués dans l'endocytose, le bourgeonnement des virus, l'expression de certains gènes et la réparation de l'ADN (Pickart, 2001, Woelk *et al*, 2007).

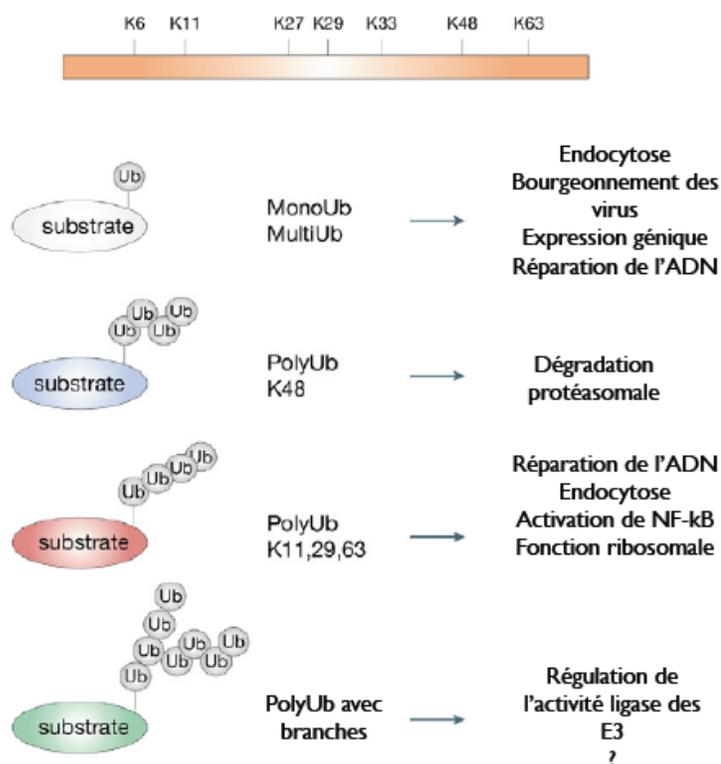


Figure 1 : Types de chaînes d'ubiquitine formées sur les substrats et leur différents rôles. La monoubiquitylation (monoub) est la présence d'une seule molécule d'ubiquitine sur le substrat et la multi-ubiquitylation (multiub) est la présence de plusieurs molécules d'ubiquitine sur plusieurs résidus d'un même substrat. La polyubiquitylation (polyub) peut se faire par l'ubiquitylation de l'ubiquitine sur l'une de ses sept lysines (K). Le point d'interrogation (?) indique que la fonction est inconnue. (Tiré de Woelk *et al*, 2007)

La polyubiquitylation consiste en l'ajout de plusieurs molécules d'ubiquitine sur un même résidu lysine d'un substrat. Les ubiquitines sont alors liées entre elles par un de leurs sept résidus lysine (K), soit les résidus 6, 11, 27, 29, 33, 48 ou 63. Le destin de la protéine modifiée est influencé par le type de chaîne formée. Les ubiquitines liées entre elles par leurs résidus 6, 11, 27, 29, 33 ou 63 forment des chaînes linéaires. Les protéines modifiées par ces types de chaînes sont impliquées dans l'endocytose, la réparation de l'ADN et dans certaines fonctions ribosomales (Arnason et Ellsion, 1994, Spence *et al*, 1995). Les protéines marquées par des chaînes K6 et K11 peuvent également être

dégradées par le protéasome (Baboshina et Haas, 1996). Les ubiquitines liées entre elles par leur résidu lysine 48 formeront plutôt une chaîne globulaire et les protéines ainsi marquées seront dirigées vers le protéasome où elles seront dégradées (Gregori *et al*, 1990, Finley *et al*, 1994). Les ubiquitines sont également regroupées entre elles de façon à former des chaînes à embranchement. Dans ce type de chaîne, une première chaîne d'ubiquitine est formée sur un résidu lysine du substrat. Sur une unité d'ubiquitine à l'intérieur de la chaîne, une deuxième chaîne d'ubiquitine est formée. Les fonctions de la polyubiquitylation par embranchement ne sont pas connues mais la régulation des ligases est une fonction proposée (Ben-Saadon *et al*, 2006).

1.1.2. Les enzymes de l'ubiquitylation

La réaction d'ubiquitylation est une cascade enzymatique impliquant trois enzymes : E1, E2 et E3. Les E1 sont des enzymes d'activation. En présence d'ATP, elles activent l'ubiquitine et forment un lien thioester entre l'ubiquitine et elles-mêmes. Suite à l'activation de l'ubiquitine, cette dernière sera récupérée par une enzyme de conjugaison, E2. L'enzyme de conjugaison accepte l'ubiquitine et forme également un lien thioester avec l'ubiquitine. Suite à cet échange d'ubiquitine, l'enzyme de conjugaison transporte l'ubiquitine et, à l'aide d'une ligase de l'ubiquitine, la transfère sur le substrat (Hersko *et al*, 1982, Hass et Rose, 1982, Hass et Bright, 1988). Les ligases de l'ubiquitine (E3) sont responsables de la spécificité de la réaction en établissant des liaisons protéines-protéines. Il existe deux types de ligases de l'ubiquitine : les ligases RING et les ligases HECT.

Les ligases RING (Really Interesting New Gene) sont des enzymes contenant un domaine RING d'environ 70 résidus et pouvant lier des atomes de zinc. Elles sont des protéines adaptatrices qui permettent le lien entre l'enzyme de conjugaison et le substrat, permettant le transfert direct de l'ubiquitine de la E2 à la protéine cible (Joazeiro et Weissman, 2000).

Les ligases de type HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) sont des ligases contenant un domaine en C-terminal à l'intérieur duquel une cystéine active accepte l'ubiquitine avant le transfert de cette dernière au substrat. Les ligases HECT prennent l'ubiquitine de la E2 et la transfèrent sur elles-mêmes par la formation d'un

lien thioester. Une fois l'échange effectué, la ligase transfère l'ubiquitine au substrat causant ainsi son ubiquitylation (Huibregtse *et al*, 1995).

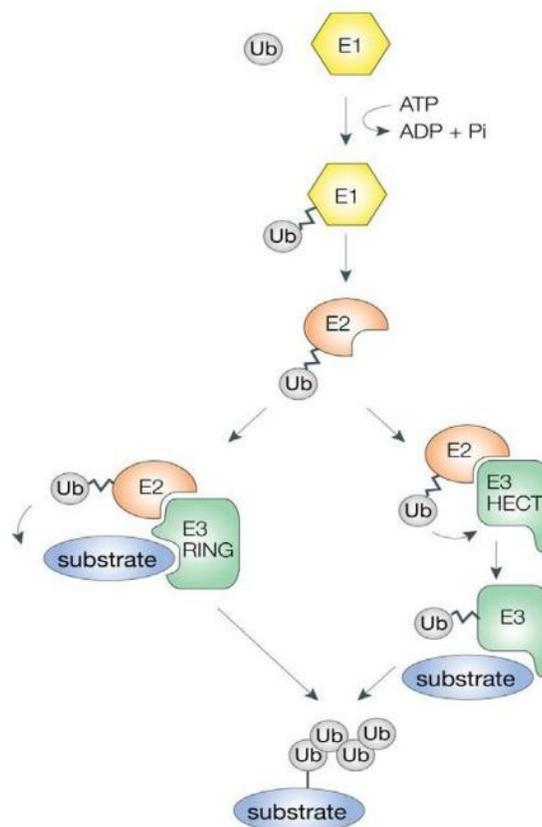


Figure 2 : Processus d'ubiquitylation. L'ubiquitylation est une cascade enzymatique impliquant trois enzymes : l'enzyme d'activation (E1) qui, avec l'hydrolyse de l'ATP, lie l'ubiquitine. L'enzyme chargée transfère l'ubiquitine à une enzyme de conjugaison (E2) pour un transfert. L'enzyme E2 se liera soit avec une ligase (E3) de type RING pour permettre la liaison directe de l'ubiquitine au substrat, soit avec une ligase de type HECT qui prendra l'ubiquitine de l'enzyme E2 pour ensuite la lier au substrat. (Tiré de Woelk *et al*, 2007).

1.2. Régulation de l'ubiquitylation

L'ubiquitylation est un processus rapide qui doit être étroitement régulé pour être spécifique. La régulation de l'ubiquitylation peut se faire de plusieurs façons et résulte en l'activation ou l'inhibition du procédé.

1.2.1. Relocalisation de la ligase ou du substrat

Une façon de réguler l'ajout d'ubiquitine sur un substrat est la relocalisation de la ligase de l'ubiquitine. Par exemple, la relocalisation de la ligase peut être due à une

interaction de cette ligase avec une protéine adaptatrice comme dans le cas de Smurf2 (Smad ubiquitination related factor 2). Le domaine N-terminal de la protéine adaptatrice Smad7 interagit avec le domaine HECT de Smurf2. Cette interaction cause l'activation de Smurf2 par la levée d'inhibition entre son domaine C2 et son domaine HECT. L'interaction entre Smurf2 et Smad7 cause la relocalisation du complexe du noyau au cytoplasme et facilite le recrutement de l'enzyme de conjugaison (E2). L'exportation du complexe Smurf2-Smad7 cause l'ubiquitylation du récepteur TGF- β (Transforming Growth Factor- β), terminant ainsi la signalisation induite par le récepteur. La relocalisation de Smurf2 est responsable de la régulation du récepteur TGF- β . (Wiesner *et al*, 2007).

La relocalisation du substrat peut également contrôler l'ubiquitylation. Les facteurs de transcription sont régulés par l'ubiquitylation. La protéine c-Jun est localisée au noyau et active la transcription suite à des stimuli variés. Pour arrêter la transcription, c-Jun est relocalisée au cytoplasme où elle est ubiquitylée, principalement par la ligase Itch. HRS (hepatocyte growth factor-related kinase substrate) et TSG101 (tumor susceptibility gene) reconnaissent c-Jun ubiquitylée et l'amène vers le lysosome où elle est dégradée. Une fraction de c-Jun ubiquitylée par Itch est également dégradée par le protéasome (Fang et Kerppola, 2004, Ikeda et Kerppola, 2008). Fbw7 (F-box and WD repeat domain containing 7) est une ligase de type RING de la famille SCF (SKP1, CUL1 and F-box protein). Fbw7 interagit avec ses substrats phosphorylés en reconnaissant un domaine CPD (Cdc4 phospho-degron) où est situé le site de phosphorylation de ses substrats (Weckler et Clurman, 2008). GSK3 phosphoryle c-Jun sur deux sites de phosphorylation, la sérine 239 et la thréonine 243, qui sont reconnus par la ligase Fbw7. Cette interaction cause la polyubiquitylation de c-Jun et sa dégradation par le protéasome (Wei *et al*, 2005). Itch et Fbw7 causent la dégradation de c-Jun par l'implication de deux voies différentes, soit les lysosomes dans le cas de la ligase Itch, soit le protéasome dans le cas de Fbw7.

1.2.2. Phosphorylation de la ligase ou du substrat

Une autre façon de contrôler l'ubiquitylation est la phosphorylation. Suite à une stimulation, les ligases peuvent être phosphorylées et ainsi être activées ou inhibées. Par

exemple, dans le cas de Nedd4-2 (neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4-2), l'inhibition intramoléculaire causée par la liaison de son domaine WW et un motif PY situé à l'intérieur de son domaine HECT inhibe l'autoubiquitylation de la ligase. ENaC (Endothelial sodium Channel), le substrat principal de Nedd4-2, contient un motif PY qui déloge le domaine WW du domaine HECT et cause une levée d'inhibition sur Nedd4-2 (Bruce *et al*, 2008). Par contre, en présence de la kinase SGK1 (serum- and glucocorticoid-related kinase 1) Nedd4-2 est phosphorylée, ce qui empêche la ligase d'interagir avec ENaC. La phosphorylation de Nedd4-2 s'effectue sur deux sérines et causerait un changement de conformation qui rendrait la liaison de ENaC moins favorable (Debonneville *et al*, 2001). Aussi, les deux sites de phosphorylation de Nedd4-2 se situent à proximité de sites d'interaction avec la famille de protéines 14-3-3. Lors de la phosphorylation de Nedd4-2 par SGK1, les protéines 14-3-3 sous forme de dimère interagissent avec Nedd4-2 empêchant ainsi son interaction avec ENaC en obstruant les domaines WW (Bhalla *et al*, 2005). La phosphorylation de Nedd4-2 par la kinase SGK1 diminue donc son activité ligase en empêchant l'interaction de Nedd4-2 avec son substrat par la liaison des protéines 14-3-3.

La phosphorylation des substrats est également un moyen de contrôler la réaction d'ubiquitylation. La ligase Cbl est recrutée au récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) suite à l'auto-phosphorylation du récepteur. Le domaine de liaison avec les phospho-tyrosine (TBK) de la ligase Cbl reconnaît la tyrosine 1045 du récepteur de l'EGF. L'interaction entre la ligase et le récepteur cause la phosphorylation de Cbl sur une tyrosine à proximité du domaine RING ce qui augmente la capacité de la ligase à ubiquityler le récepteur. La phosphorylation de Cbl est nécessaire pour son interaction avec ses substrats de la classe des tyrosines kinases. Ainsi, deux phosphorylations successives sur deux protéines différentes contrôlent l'activité d'une ligase et l'ubiquitylation du récepteur (Levkowitz *et al*, 1999). La ligase Cbl peut aussi interagir avec la protéine adaptatrice Grb2. Grb2 possède un site d'interaction sur le récepteur de l'EGF ainsi que deux domaines SH3 pouvant interagir avec des domaines riches en prolines. Le domaine SH3 en N-terminal de Grb2 interagit avec le domaine riche en proline de Cbl. Le complexe Cbl-Grb2 interagit avec le récepteur de l'EGF par

l'interaction entre Grb2 et la tyrosine 1114. Le récepteur de l'EGF est ainsi ubiquitylé par Cbl et dégradé par les lysosomes (Waterman *et al*, 2002).

1.2.3. Ubiquitylation des ligases

L'ubiquitylation des ligases est aussi impliquée dans le contrôle de leur activité. Les ligases RING doivent souvent être ubiquitylées pour être actives. Les ligases Ring1B et Bmi1 font partie du complexe répresseur polycomb 1 (PRC1) et sont des répresseurs de transcription. Ce complexe est responsable de l'ubiquitylation de l'histone H2A. Le domaine RING de la ligase Ring1B interagit avec le domaine RING de Bmi1 pour stabiliser le complexe PRC1. L'autoubiquitylation de Ring1B est nécessaire pour la monoubiquitylation de l'histone H2A. L'interaction entre Bmi1 et Ring1B induit une diminution de l'autoubiquitylation de Ring1B et une augmentation de l'ubiquitylation de l'histone H2A (Ben-Saadon *et al*, 2006).

L'autoubiquitylation des ligases peut également réduire leur activité. BRCA1 (Breast cancer 1) possède une activité ligase due à la présence d'un domaine RING. Lorsque BRCA1 se lie à BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1), le complexe cause l'autoubiquitylation de BRCA1 ainsi que l'ubiquitylation de ses substrats par la formation d'une chaîne poly-ubiquitine. La chaîne d'ubiquitines est reconnue par la protéine UBXN1 qui contient un motif UBA (ubiquitin-associated domain). L'interaction entre UBXN1 et le complexe BRCA1/BARD1 diminue l'activité ligase de BRCA1. Cette régulation négative permettrait de contrôler la durée de l'activité ligase de BRCA1 (Wu-Baer *et al*, 2010).

La ligase Smurf-2 est une ligase de type HECT responsable de la terminaison de la signalisation par le récepteur TGF- β . Smurf-2 possède une interaction intramoléculaire inhibitrice qui est rompue en présence de Smad-7. L'activation de Smurf-2 permet la régulation du récepteur TGF- β ainsi qu'une régulation de la ligase même. Suite à l'ubiquitylation du récepteur, Smurf-2 s'autoubiquityle ce qui cause sa dégradation. L'autoubiquitylation de Smurf-2 contrôle ainsi son niveau dans la cellule (Weisner *et al*, 2007).

1.3. La ligase Itch

1.3.1. Structure

La protéine Itch a été découverte au cours d'une étude portant sur le locus *agouti* du chromosome 2 chez les souris. La mutation 18H induite par radiation cause une inversion chromosomique qui empêche les gènes *agouti* et *itch* de s'exprimer. Les souris mutantes se grattent constamment, présentent de l'inflammation dans certains organes et leur système immunitaire est déficient (Perry *et al*, 1998, Fang *et al*, 2002). Itch est également connu sous le nom de AIP4 (atrophin interacting protein 4) et possède une masse moléculaire d'environ 113 kDa (Wood *et al*, 1998). Itch est localisé à la membrane des endosomes et du système trans-golgien, ce qui lui permet d'interagir avec les protéines se déplaçant entre les différents compartiments cellulaires (Angers *et al*, 2004).

La ligase Itch fait partie de la famille Nedd4/Rsp5p. Les membres de la famille Nedd-4 sont composés d'un domaine C2 en N-terminal, de 1 à 4 domaines WW et d'un domaine HECT en C-terminal. Le domaine C2 permet l'interaction de la protéine avec les phospholipides de la membrane (Rotin *et al*, 2000).

Le domaine WW est nommé ainsi à cause de la présence de deux résidus tryptophanes (W) à l'intérieur du domaine (André et Springael, 1994). Les domaines WW sont impliqués dans la reconnaissance des protéines et se lient habituellement à des motifs PPXY (Pirozzi *et al*, 1997, Chen et Sudol, 1995). Itch possède quatre domaines WW lui permettant d'interagir avec diverses protéines.

Itch est le seul membre de la famille Nedd-4 à posséder un domaine riche en proline (PRD). Ce domaine est situé dans la région centrale entre le domaine C2 et ses domaines WW. Le domaine riche en proline est reconnu par les protéines à domaine SH3 (Src homology domain 3) dont certaines protéines qui sont impliquées dans le processus de l'endocytose comme l'endophiline, β -PIX et SNX-9 (Angers *et al*, 2004, Janz *et al*, 2007, Baumann *et al*, 2010). Le domaine riche en proline contient trois sites pouvant être phosphorylés par la kinase JNK, soit les sérines 199 et 232 (S199 et S232) et la thréonine 222 (T222) (Gallagher *et al*, 2006).

Le domaine HECT est une séquence d'environ 350 acides aminés situés en C-terminal et contient l'activité ligase des protéines de la famille Nedd-4. Ce domaine est

responsable de recruter les enzymes de conjugaison (E2) de la machinerie d'ubiquitylation en plus de contenir la cystéine qui permettra la formation du lien thioester entre l'ubiquitine et la ligase. Le domaine HECT est également responsable du transfert de l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat (Huibregtse *et al*, 1995).

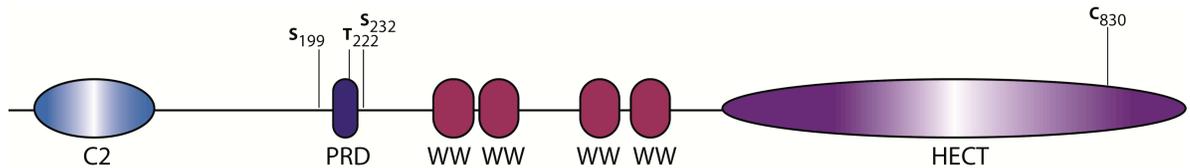


Figure 3 : Structure de Itch. La ligase de l'ubiquitine contient un domaine C2 en N-terminal, un petit domaine riche en proline (PRD), quatre domaines WW et un domaine HECT en C-terminal. S199, T222 et S232 sont trois sites de phosphorylation de la kinase JNK chevauchant le domaine PRD.

1.3.2. Itch dans les différents processus cellulaires

Les domaines d'interaction de la ligase Itch sont responsables de son interaction avec des protéines impliquées dans une variété de processus cellulaires (figure 4).

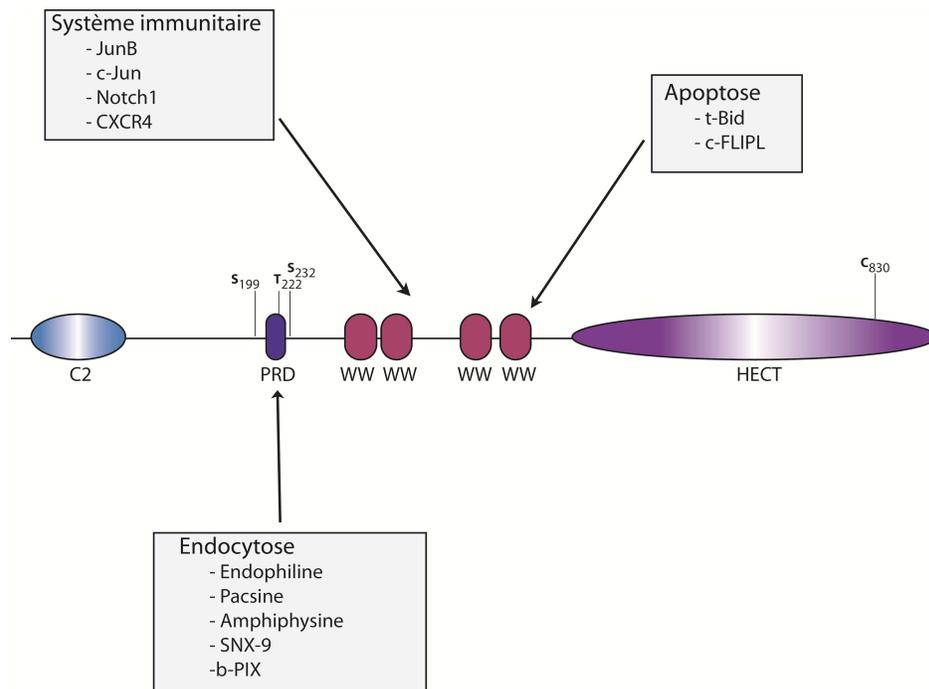


Figure 4 : Itch et ses substrats dans différents processus cellulaires. Les domaines WW de Itch sont responsables de l'interaction de la ligase avec les protéines Jun, Notch1 et CXCR4, protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Les domaines WW sont également responsables de l'interaction de Itch avec les protéines apoptotiques t-Bid et c-FLIP_L. Le domaine PRD est responsable de l'interaction de Itch avec les protéines de l'endocytose comme l'endophiline, la pacsine, l'amphiphysine, SNX-9 et β-PIX.

Itch et le système immunitaire

Les cellules T se différencient en cellules T_H1 ou T_H2 selon leurs fonctions et leur profil en cytokines. JunB est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules T_H2 du système immunitaire. JunB interagit avec le promoteur *IL-4* (interleukine-4) qui conduit à l'expression du gène et à la production d'interleukine. Itch régule la stabilité de JunB. La protéine interagit avec les domaines WW de la ligase et cette interaction mène à l'ubiquitylation et la dégradation de JunB par le protéasome. La protéine c-Jun, tout comme JunB, est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules T_H2 du système immunitaire. De la même façon que JunB, c-Jun interagit avec les domaines WW de la ligase Itch (Fang *et al*, 2002, Fang et Kerppola, 2004). Dans les souris où la ligase Itch est absente, un nombre anormalement élevé de cellules T_H2 est détecté. L'augmentation de cellules T_H2 ainsi qu'une accumulation de JunB cause une augmentation dans la sécrétion d'IgG1, d'IgE et d'IL-4. La présence de JunB en quantité élevée augmente l'interaction entre JunB et l'ADN ce qui conséquemment cause l'augmentation d'IL-4. La dégradation de JunB permet un contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des cellules T (Fang *et al*, 2002).

Notch-1 est un autre substrat de la ligase Itch impliqué entre autres dans le développement du système immunitaire. Notch est un récepteur transmembranaire impliqué dans la différenciation de plusieurs types cellulaires. Dans le système immunitaire, Notch régule le développement et la survie des cellules T. Le domaine intracellulaire de Notch interagit avec les domaines WW de la ligase Itch et cette interaction permet l'ubiquitylation de Notch. L'ubiquitylation de Notch par Itch cause la formation d'une chaîne d'ubiquitines reliées entre elles par leur lysine en position 29 menant à la dégradation de Notch aux lysosomes (Qiu *et al*, 2000, Chastagner *et al*, 2008). Les chaînes d'ubiquitines K27 et K29 pourraient être des signaux de dégradation

pour les lysosomes comme la chaîne d'ubiquitines K48 est le signal pour la dégradation par le protéasome (Woelk *et al*, 2007).

Itch est aussi impliqué dans le contrôle des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR). Les chimiokines sont des molécules de faible poids moléculaire qui se lient à des récepteurs transmembranaires et qui régulent divers processus cellulaires dont le développement, l'angiogenèse et les réponses immunitaires. Le récepteur CXCR4 est un récepteur de chimiokines qui, lorsque lié à son substrat CXCL12, est impliqué dans le développement embryonnaire, la maturation des lymphocytes et la migration cellulaire (Slagsvold *et al*, 2006). L'endocytose du récepteur mène à l'atténuation du signal cellulaire. Suite à l'endocytose, le récepteur est soit recyclé à la surface de la cellule, soit dégradé. Dans le cas du récepteur CXCR4, son ubiquitylation est effectuée par la ligase Itch. Cette ubiquitylation mène à son internalisation et à sa dégradation. L'ubiquitylation de CXCR4 servirait de signal permettant l'acheminement du récepteur vers les lysosomes. En absence d'ubiquitylation, le signal déclenché par l'interaction entre CXCL12 et CXCR4 est transmis aux protéines en aval du récepteur permettant ainsi une réponse adaptée de la cellule au stimulus (Marchese *et al*, 2001, Marchese *et al*, 2003).

Itch et l'apoptose

Itch régule aussi certaines protéines apoptotiques contrôlant ainsi le destin cellulaire. L'effet de la ligase peut être anti-apoptotique comme cela a été démontré dans le cas de la régulation de t-Bid (truncated Bid). En conditions apoptotiques, la protéine Bid est clivée par la caspase-8. Le produit clivé, t-Bid est responsable de l'altération de la membrane de la mitochondrie suite à sa dimérisation avec Bax ou Bak, causant la libération du cytochrome c. La libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation des voies de la caspase-3 cause l'apoptose de la cellule (Li *et al*, 1998). Suite à une stimulation à l'EGF, JNK phosphorylerait Itch ce qui activerait la protéine. L'activation de Itch faciliterait son interaction avec t-Bid. La ligase Itch interagit seulement avec le fragment clivé t-Bid. La protéine pro-apoptotique t-Bid est ubiquitylée par la ligase causant sa dégradation par le protéasome. Les cellules sont protégées de l'apoptose par la diminution des niveaux de t-Bid dans la cellule (Azakir *et al*, 2010).

L'effet de la ligase Itch peut également être pro-apoptotique. L'activation de JNK par le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) cause la phosphorylation de Itch. La phosphorylation de Itch augmente son activité ligase et permet son interaction avec le domaine CASP (c-terminal caspase-8-like) de c-FLIP_L. c-FLIP_L est une protéine anti-apoptotique qui induit l'inactivation de la caspase-8. Le niveau de c-FLIP_L dans la cellule détermine la survie ou la mort de la cellule. L'ubiquitylation de c-FLIP_L par Itch cause sa dégradation par le protéasome donc une diminution de son niveau cellulaire et la mort des cellules (Chang *et al*, 2006).

La stimulation de la voie de JNK peut avoir des effets différents sur l'activité de Itch dans le phénomène de l'apoptose. L'effet pourrait être spécifique aux types de cellules dans lesquelles Itch pourrait induire un signal pro-apoptotique alors que dans des cellules différentes, Itch deviendrait un signal anti-apoptotique.

Itch et l'endocytose

L'endophiline, l'amphiphysine, la pacsine, SNX-9 (sorting nexin 9) ainsi que β -PIX (β -p21-activated kinase-interactive exchange factor) sont des protéines impliquées dans la formation de vésicules de clathrine lors de l'endocytose. Ces protéines sont exprimées dans le cerveau. Elles sont composées d'un domaine SH3 impliqué dans les interactions protéines-protéines et d'un domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) impliqué dans la courbure des membranes lors de la formation des vésicules de clathrine. L'endophiline, l'amphiphysine, la pacsine, SNX9 ainsi que β -PIX interagissent avec la dynamine, une protéine responsable du détachement de la vésicule de clathrine de la membrane (Ringstad *et al*, 1997, McPherson, 1999, Bai *et al*, 2010).

Itch interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'endocytose. L'endophiline fut la première protéine de l'endocytose dont l'interaction avec Itch fut caractérisée (Angers *et al*, 2004). Il existe trois variantes de l'endophiline soit A1, A2 et A3. L'endophiline A1 est exprimée dans le cerveau, l'endophiline A2 est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus alors que l'endophiline A3 est exprimée dans le cerveau et les testicules. L'endophiline A1 est une protéine de 40 kDa contenant un domaine BAR, une région variable et un domaine SH3. L'endophiline est impliquée dans la formation des vésicules à clathrine par son interaction avec la synaptojanine et la dynamine (Ringstad

et al, 1997, Kjaerulff *et al*, 2010). Le domaine SH3 de l'endophiline A1 interagit avec le domaine riche en proline de la ligase Itch. Cette interaction mène à l'ubiquitylation de l'endophiline. Suite à une stimulation des cellules à l'EGF, l'ubiquitylation de l'endophiline par Itch est augmentée ce qui pourrait être dû à une augmentation de l'activité ligase de Itch par sa phosphorylation par JNK (Angers *et al*, 2004, Azakir et Angers, 2009).

Itch interagit également avec la protéine SNX-9. SNX-9 fait partie de la famille des sorting nexin, protéines impliquées dans l'endocytose, le triage endosomal et la signalisation endosomale. SNX-9 contient, en plus des domaines SH3 et BAR, un domaine PX (phox-homology). Le domaine PX est responsable de l'interaction entre SNX9 et le phosphatidylinositol-3-monophosphate retrouvé dans les compartiments endocytiques. La protéine SNX-9 joue un rôle important dans le remodelage de la membrane et est essentielle dans les étapes finales de l'endocytose par la formation de vésicules de clathrine. SNX-9 interagit avec plusieurs protéines retrouvées dans la formation des vésicules dont la clathrine, AP2 et la dynamine. (Cullen, 2008). Le domaine SH3 de SNX-9 interagit avec le domaine PRD de la ligase Itch. L'interaction entre les deux protéines cause l'ubiquitylation et la dégradation de SNX-9. Itch régule ainsi le niveau intracellulaire de SNX-9 (Baumann *et al*, 2010).

β -PIX est composée d'un domaine SH3 en N-terminal, un domaine DH (diffuse B-cell lymphoma homology) qui est suivi d'un domaine PH (pleckstrin homology) et d'un «leucine zipper». Elle agit comme facteur d'échange de guanine pour la protéine Rac/Cdc42 en plus d'être un facteur d'échange pour PAK (p21-activated kinase). β -PIX interagit avec Cbl pour faciliter le regroupement des protéines impliquées dans l'internalisation du récepteur de l'EGF. β -PIX est une protéine à domaine SH3 qui tout comme l'endophiline et SNX-9 interagit avec le domaine PRD de la ligase Itch. La protéine β -PIX sert de protéine d'échafaudage lorsqu'elle interagit avec Itch et faciliterait l'endocytose du récepteur CXCR4 (Janz *et al*, 2007).

1.4. La régulation de la ligase Itch

La découverte des nombreux substrats de la ligase Itch a permis de mettre en lumière que cette ligase de l'ubiquitine est impliquée dans plusieurs processus cellulaires

et sa régulation est importante pour le bon fonctionnement de l'organisme. La ligase Itch peut être régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles. La régulation de Itch a des effets différents sur son interaction avec ses nombreux substrats. La figure 5 montre les différentes protéines impliquées dans la régulation de Itch et leur effet dans le système immunitaire.

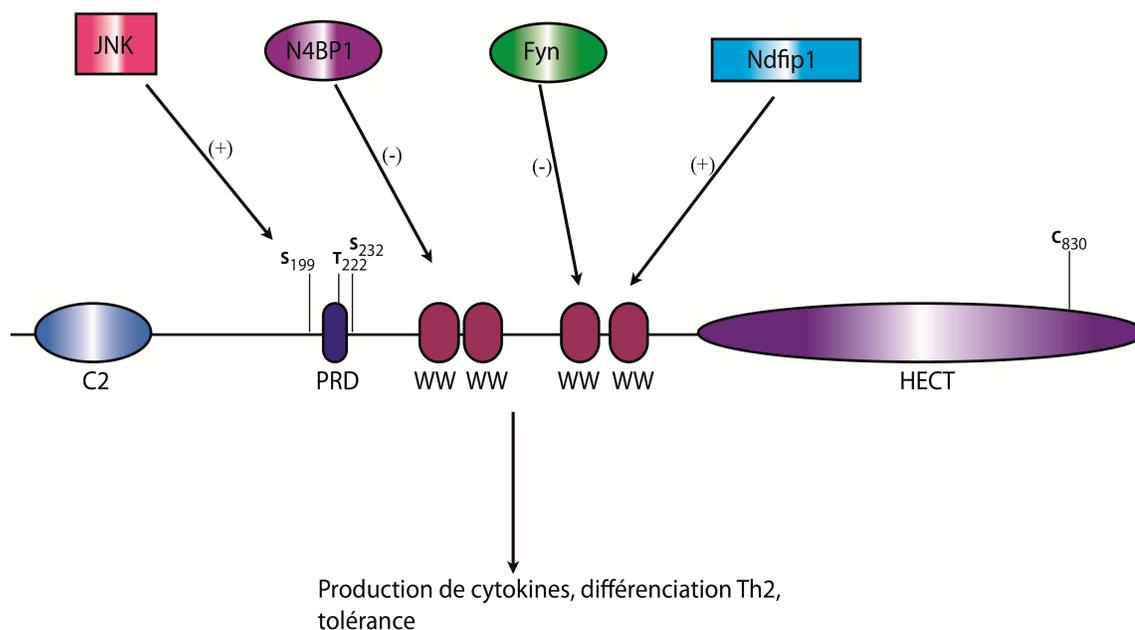


Figure 5 : Protéines exerçant un rôle régulateur sur la ligase Itch dans les cellules immunitaires. La phosphorylation par la kinase JNK de Itch augmente son activité ligase et diminue la production de cytokines. La protéine N4BP1 se lie aux domaines WW de Itch ce qui empêche la liaison des substrats de Itch augmentant la production de cytokines. La protéine Fyn phosphoryle Itch sur une tyrosine située entre ses domaines WW ce qui inhibe son activité ligase et empêche les substrats de Itch de se lier à ses domaines WW. NDFIP1 interfère avec l'interaction intramoléculaire de la ligase Itch, ce qui libère les domaines WW de Itch et permet l'ubiquitylation de ses substrats (adapté de Liu, 2007).

1.4.1. Phosphorylation

La phosphorylation de Itch peut avoir un effet positif ou négatif sur son activité ligase. Fyn est une tyrosine kinase de la famille Src située à la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. Elle est impliquée dans la signalisation des cellules T et des neurones pendant le développement et la vie des cellules (Saito *et al*, 2010). Le domaine SH3 de Fyn interagit avec les domaines WW de la ligase Itch. Cette interaction permet à la kinase Fyn de phosphoryler la ligase Itch sur la tyrosine 371 contenue dans le

domaine WW3 de la ligase. La phosphorylation de Itch cause une diminution de son activité ligase sur son substrat JunB (Yang *et al*, 2006). La phosphorylation de la ligase Itch par Fyn représente un contrôle négatif de l'activité d'ubiquitylation par Itch et par le fait même permet la production d'IL-4 par JunB.

Itch est également phosphorylée sur une thréonine retrouvée dans son domaine WW3 par la CK2 et la PKA. Lorsque Itch n'est pas phosphorylé, le groupement hydroxyle d'une thréonine en position 30 (30^e acide aminé du domaine WW3, T30) est exposée à la surface de Itch et orientée vers le ligand. Lorsque la CK2 (Casein Kinase II) ou la PKA (Protein Kinase A) sont activées, T30 est phosphorylée. La phosphorylation de T30 cause un encombrement stérique et empêche les ligands de Itch d'interagir. De plus, T30 est située dans une région de Itch qui interagit avec ses substrats. La phosphorylation de T30 empêche le résidu thréonine de former un pont hydrogène avec le substrat et aucune interaction n'est possible. Cette phosphorylation de Itch sur une thréonine contenue dans un de ses domaines WW empêche son interaction avec ses substrats dont LMPA2 (latent membrane protein A2) (Shaw *et al*, 2005, Morales *et al*, 2007).

La phosphorylation de Itch peut également avoir un effet activateur sur la ligase. Le modèle proposé suggère que sous sa forme non phosphorylée, Itch est dans une conformation repliée induite par une interaction intramoléculaire qui empêche ses domaines WW d'interagir avec les substrats, et ainsi leur ubiquitylation. Suite à l'activation des récepteurs TCR (T-cell receptor), Itch est phosphorylée par la kinase JNK, ce qui enlève l'interaction inhibitrice entre ses domaines WW et son domaine HECT. La levée de l'interaction amène un changement de conformation qui rend la ligase Itch active. La phosphorylation de la ligase Itch se fait sur trois résidus, soit la sérine 199, la thréonine 222 et la sérine 232, qui se situent à l'intérieur du domaine riche en proline. L'interaction entre Itch et ses substrats dont c-Jun et JunB est alors possible tout comme leur ubiquitylation. L'ubiquitylation de c-Jun et JunB cause leur dégradation. Dans le cas de la dégradation de JunB, une diminution de la transcription du gène codant pour IL-4 est observée (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006).

1.4.2. Interactions avec des protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices et activatrices NDFIP (NEDD-4 family-interacting proteins) sont également impliquées dans la régulation des ligases. Les protéines NDFIP sont des protéines membranaires situées au Golgi, aux endosomes et dans les corps multi-vésiculaires. Elles contiennent un motif PY qui interagit avec les domaines WW des ligases de la famille Nedd-4. L'absence de NDFIP1 dans des souris cause l'inflammation de la peau et la mort prématurée des souris alors que l'expression des deux protéines NDFIP dans des cultures cellulaires augmente la quantité de protéines ubiquitylées détectables ce qui suggère que la présence de NDFIP1 et NDFIP2 stimule les ligases de l'ubiquitine. Le motif PY de NDFIP1 et 2 interagit avec les domaines WW de la ligase Itch. Dans les cellules T activées, l'expression de NDFIP1 est augmentée. NDFIP1 interagit avec Itch et entraîne sa relocalisation des vésicules cytoplasmiques à la membrane plasmique. Cette relocalisation permettrait à Itch de se lier à ses substrats, d'induire leur ubiquitylation et leur dégradation. Des résultats similaires ont été observés pour NDFIP2. Lorsque NDFIP2 et Itch interagissent, Itch est retrouvé aux endosomes. L'interaction entre NDFIP2 et Itch enlève l'interaction intramoléculaire de la ligase et permet son interaction avec JunB et l'endophiline ce qui augmente leur ubiquitylation et conséquemment leur dégradation (Oliver *et al*, 2006, Mund et Pelham, 2009).

Numb active également Itch pour permettre l'ubiquitylation de Gli1. Gli1 est un facteur de transcription de la voie de signalisation Hedgehog et régule l'expression de plusieurs gènes dont sa propre expression. Gli1 est un fort activateur de la transcription lorsque la voie de signalisation Hedgehog est stimulée et cause la prolifération et le développement cellulaire (Ruiz *et al*, 2002). Numb est retrouvée dans la couche externe germinale du cerveau. Numb est une protéine adaptatrice qui est impliquée dans l'ubiquitylation et l'endocytose des récepteurs et facilite la différenciation neuronale (Gulino *et al*, 2010). Numb interagit avec Gli1 pour diminuer l'effet de la voie de signalisation Hedgehog. Cette diminution est observée par l'interaction du complexe Numb-Gli1 avec la ligase de l'ubiquitine Itch. Numb interagit avec les domaines WW de Itch pour enlever l'interaction intramoléculaire entre les domaines WW et le domaine HECT de Itch. Numb recrute ensuite Gli1 puis le transfère à la ligase Itch. Gli1 possède deux domaines PPXY ainsi qu'une proline précédée d'une sérine phosphorylée

nécessaire pour permettre son interaction avec les domaines WW1, WW2 et WW4 de Itch. L'interaction entre Gli1 et Itch induit l'ubiquitylation ainsi que la dégradation de Gli1 (DiMarcotullio *et al*, 2006, DiMarcotullio *et al*, 2011).

Les protéines adaptatrices peuvent aussi inhiber l'activité ligase de Itch. N4BP1 (Nedd-4 binding partner 1) est une protéine impliquée dans le développement qui interagit avec Nedd-4 et est monoubiquitylé par cette ligase. N4BP1 interagit aussi avec la ligase Itch en se liant au deuxième domaine WW de la ligase. L'absence d'ubiquitine sur N4BP1 suggère que l'interaction entre Itch et N4BP1 est plutôt une interaction régulatrice. Le deuxième domaine WW de la ligase Itch sert également de site d'interaction avec la protéine p73 α . Lorsque N4BP1 se lie à Itch, il empêche la protéine p73 α de se lier à Itch empêchant du même coup son ubiquitylation et sa dégradation. De même, la liaison de N4BP1 au domaine WW2 de Itch diminue l'ubiquitylation de c-Jun et de p63, deux autres substrats interagissant avec les domaines WW de la ligase Itch. La diminution d'interaction entre Itch et ces substrats cause leur stabilisation et augmente leur activité transcriptionnelle. Par son interaction avec la ligase Itch et sa compétition avec les substrats de Itch, N4BP1 est un régulateur négatif de l'activité de Itch (Oberst *et al*, 2007).

1.4.3. Autoubiquitylation et désoubiquitylation

L'autoubiquitylation est l'ajout d'ubiquitine sur une ligase par elle-même ou par deux ligases identiques (trans-ubiquitylation). L'autoubiquitylation de Itch influence son activité ligase ainsi que son niveau cellulaire. L'autoubiquitylation de Itch nécessite deux molécules de Itch ce, qui correspond à une ubiquitylation en trans. Dans le processus d'ubiquitylation, Itch accepte une molécule d'ubiquitine de l'enzyme de conjugaison UbcH7. Ensuite, Itch transfère l'ubiquitine de sa cystéine active sur une lysine d'un deuxième Itch. L'ubiquitylation de Itch résulte en une chaîne d'ubiquitines liées entre elles par leur lysine 63. Ce type de chaîne contribuerait à la stabilité de la ligase Itch (Scialpi *et al*, 2008). L'autoubiquitylation de la ligase Itch causerait aussi sa dégradation. Lorsque le protéasome est inhibé, une augmentation de la quantité de la ligase Itch dans les cellules est observée. L'autoubiquitylation de Itch mènerait à sa dégradation par le protéasome (Mouchantaf *et al*, 2006).

Comme mentionné précédemment, les ligases peuvent s'autoubiquityler. Cette autoubiquitylation peut être réversible par les protéases de l'ubiquitine, les enzymes de désubiquitylation. La désubiquitylation est le phénomène inverse de l'ubiquitylation et consiste à cliver le lien peptide entre l'ubiquitine et le substrat via l'action de protéases spécialisées (desubiquitinating enzymes, DUB) (Wilkinson, 1997). Les DUB contiennent des domaines cystéine et histidine actifs. FAM/USPX9 (fat facets in mouse) est l'équivalent murin de la protéine FAF (fat facets) retrouvée chez la drosophile. FAM se retrouve sur le chromosome X. FAM est retrouvée dans les populations de cellules en expansion lors de la gastrulation et la neurulation des embryons, dans les cellules post-mitotiques du système nerveux central et est impliquée dans l'apoptose (Wood *et al*, 1997). Dans le cas de la ligase Itch, elle est désubiquitylée par FAM/USP9X. FAM/USP9X est une protéase qui hydrolyse l'ubiquitine sur ses substrats avant leur entrée dans le protéasome, prolongeant ainsi leur demi-vie et leur effet dans la cellule. FAM/USP9X se lie aux domaines WW de la ligase Itch. Lorsque FAM/USP9X est co-exprimée avec Itch, le niveau cellulaire de Itch augmente alors que son ubiquitylation diminue. La présence de FAM/USP9X régulerait le niveau de Itch dans les cellules, contrôlant du même coup les processus cellulaires régis par Itch (Mouchantaf *et al*, 2006).

1.4.4. Clivage par des caspases

Les caspases sont des protéases impliquées dans l'apoptose. Les caspases sont des protéases spécifiques ayant une préférence de clivage après les acides aspartiques. Les caspases-3, 6 et 7 sont des caspases effectrices. La caspase-3 est essentielle pour le développement embryonnaire (Salvesen et Abrams, 2004). En situation d'apoptose dans des cellules de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, le niveau cellulaire de la ligase Itch diminue et une augmentation de deux fragments protéiques est observée (Rossi *et al*, 2009). Suite à une incubation de Itch avec les caspases-3, 6 et 7, deux fragments protéiques sont détectés; l'un à 64 kDa correspondant au fragment N-terminal et l'autre à 36 kDa correspondant au fragment C-terminal. La détection de ces deux fragments montre que Itch est un substrat des caspases et suggère la présence d'un seul site de clivage. Le site de clivage de Itch est localisé à l'acide aspartique 240 (D240). La

formation des deux fragments de Itch est accompagnée par l'activation des caspases 3, 6, 7 et 8 ainsi que du clivage de la protéine PARP (poly ADP-ribose polymerase), un substrat des caspases-3 et 7. Le clivage de la ligase Itch n'empêche pas la ligase d'avoir une activité catalytique car le site de clivage est situé à la suite du domaine riche en proline et précède les quatre domaines WW de la ligase. Le clivage de Itch cause la perte d'une région fondamentale impliquée dans la localisation de Itch et dans son activité ligase (Rossi *et al*, 2009). Le clivage de la ligase aurait un impact sur la localisation et la régulation de l'activité de Itch.

1.5. Objectifs et hypothèses

Itch est surtout connu pour son implication dans le système immunitaire. La recherche de nouveaux substrats a permis de constater que la ligase Itch est également impliquée dans plusieurs processus cellulaires dont l'apoptose (Chang *et al*, 2006, Azakir *et al*, 2010) et l'endocytose (Angers *et al*, 2004). Les substrats de Itch peuvent interagir avec la ligase par ses domaines WW et son domaine PRD selon que les substrats contiennent un motif PY ou un motif SH3. La majorité des interactions connues et caractérisées de la ligase Itch concernent les substrats se liant aux domaines WW de la ligase. Des études précédentes ont permis de caractériser l'interaction entre Itch et l'endophiline A1 (Angers *et al*, 2004) puis d'autres protéines à domaine SH3 (Janz *et al*, 2007, Baumann *et al*, 2010).

La spécificité de la réaction d'ubiquitylation dépend des ligases. Il est donc important que ces dernières soient étroitement régulées. La régulation des interactions entre Itch et ses substrats est encore assez peu comprise. Le modèle proposé pour l'activation de la ligase est que lorsque Itch n'est pas phosphorylée, la protéine est dans une conformation repliée qui empêche l'interaction des substrats avec la ligase. Ce modèle n'est toutefois pas compatible avec plusieurs observations où Itch est actif, même dans des conditions où JNK ne devrait pas être activée (Angers *et al*, 2004, Mund et Pelham, 2009, Oliver *et al*, 2006, Di Marcotullio, 2011), ce qui soulève la question quant à la généralisation de ce modèle pour tous les substrats de Itch, notamment les substrats à domaine SH3. Le but de ce projet est ainsi de déterminer l'importance de la phosphorylation du domaine riche en proline de la ligase Itch dans sa capacité à interagir

et à ubiquityler les protéines à domaine SH3 dont l'endophiline. Pour ce faire, nous allons créer des mutants de la ligase Itch mimant la forme phosphorylée, des mutants ne pouvant être phosphorylés ainsi que des mutants ne possédant aucune activité ligase. À l'aide de ces mutants, nous déterminerons si la phosphorylation de la ligase influence l'interaction entre le domaine PRD de Itch et le domaine SH3 de l'endophiline. Si l'interaction entre les différents mutants de la ligase Itch et de l'endophiline est possible, nous caractériserons l'effet de cette interaction en observant l'ubiquitylation et le résultat de cette ubiquitylation.

2. Matériel et méthode

2.1. Mutagenèse

Pour déterminer l'importance des sites de phosphorylation par JNK de la ligase Itch dans sa capacité à interagir et à ubiquityler les protéines à domaines SH3, différentes mutations ponctuelles sont effectuées sur la séquence normale de Itch (wild type, WT). Ces mutations sont effectuées dans le but d'obtenir une ligase qui ne peut pas être phosphorylée par JNK et une version de Itch mimant la forme phosphorylée par JNK. Les mutants sont créés en utilisant le protocole QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla CA, USA) (figure 6). Dans le protocole QuickChange, il est possible d'obtenir plusieurs mutations ponctuelles sur un brin d'ADN à des endroits spécifiques avec des amorces contenant les mutations voulues. Pour l'obtention de nos mutants de la ligase Itch, l'ADN GFP-Itch WT sert de base pour la mutagenèse et est produit dans des bactéries *Escherichia coli* Dam⁺ ce qui produira un ADN méthylé aux A des séquences GATC. Cent microgrammes de cet ADN seront ajoutés à un mélange de réactions contenant 50 ng des amorces mentionnées dans le tableau I ainsi que le tampon QuickChange à une concentration finale de 1X, le mélange QuickSolution, les dNTP ainsi que le mélange multi-enzymatique QuickChange pour un volume final de 25 µl. Le mélange sera soumis à des cycles thermiques permettant la synthèse d'un brin complémentaire à l'ADN matrice. L'enzyme *DpnI* est une enzyme spécifique pour l'ADN méthylé. Une digestion du mélange d'ADN par la *DpnI* à 37°C pendant 60 minutes permet de couper l'ADN méthylé ce qui coupera l'ADN matrice, tout en laissant le brin nouvellement synthétisé intact. Cet ADN circulaire simple-brin sera utilisé pour transformer les bactéries (Weiner et Costa, 1994).

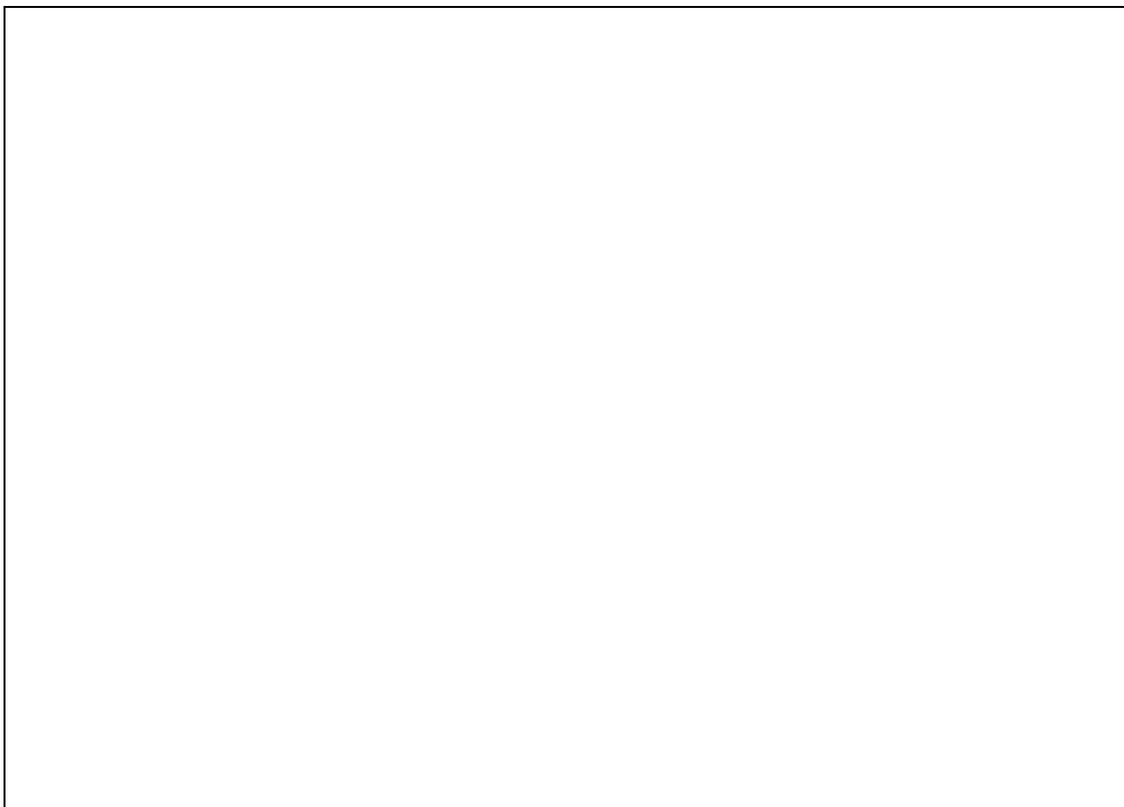


Figure 6 : Aperçu de la méthode de mutagenèse dirigée. Des cycles thermiques sont effectués pour dénaturer l'ADN, permettre l'hybridation des amorces avec un des simples brins de l'ADN parental et la synthèse du brin complémentaire contenant les mutations désirées. Une digestion est effectuée par l'enzyme de restriction *DpnI* pour permettre de couper l'ADN parental méthylé et garder intact le brin complémentaire. L'ADN simple brin obtenu est transformé dans des bactéries XL10-Gold pour obtenir un ADN double brin contenant les mutations désirées (tiré de QuickChange multi site-directed mutagenesis kit).

Tableau I : Amorces utilisées pour l'obtention des mutations ponctuelles sur la ligase Itch par mutagenèse dirigée ainsi que la séquence d'acides aminés mutés correspondants. Les bases mutées et leurs acides aminés mutés correspondants sont soulignés.

Mutations	Amorces antisens	Acides aminés mutés correspondants
S199→A	GAG AGT GAT GGA <u>GCA</u> TTA TTC C	GNN <u>A</u> PSL
T222→A	CTA CGT GGG <u>GCG</u> GGT GGT	PPP <u>A</u> PRR
S232→A	GGC AGA TGG TGC <u>ACC</u> ATT GAC A	VNG <u>A</u> PSA
T222→D	TGG TCT ACG TGG <u>ATC</u> GGG TGG TGG TGG	PPPP <u>D</u> PRRP

Un volume de 1,5 µl de la réaction de PCR digéré est incubé avec des bactéries ultra-compétentes XL-10 Gold puis ces bactéries sont soumises à un choc thermique. Suite au choc thermique, les bactéries sont étalées sur les boîtes de pétri contenant l'antibiotique kanamycine pour permettre la croissance des bactéries possédant potentiellement le plasmide muté. Les bactéries qui intègrent l'ADN GFP-Itch posséderont un gène résistant à la kanamycine ce qui leur permettra de croître sur les pétris. Ainsi, les bactéries ayant poussées sur la boîte de pétri pourront être transférées dans du bouillon LB ce qui permettra d'extraire l'ADN. L'ADN extrait est ensuite séquencé pour confirmer la présence des mutations dans la séquence de Itch. Une fois les mutations confirmées, l'ADN peut être utilisé pour les transfections cellulaires et nous pourrons ainsi vérifier l'impact des sites de phosphorylation par JNK sur Itch dans la modulation des substrats de Itch.

2.2. Plasmides utilisés

Les vecteurs GFP-Itch WT, GFP-Itch CA, où la cystéine active en position 830 est mutée en alanine ainsi que le domaine PRD de la ligase Itch dans le vecteur pGEX-4T-1 (Amersham Bioscience maintenant GE Healthcare, Baie d'Urfée, QC, Canada) ont été décrits dans une étude précédente (Angers *et al*, 2004). La HA-ubiquitine (hemagglutinine) fut donnée généreusement par Ted Dawson (John Hopkins University). La construction pcDNA3-endophiline ainsi que le domaine SH3-endophiline dans le vecteur pGEX-2TK ont été décrits dans des études précédentes (Micheva *et al*, 1997, Ramjaun *et al*, 2001).

Le plasmide rLuc-endophiline a été réalisé avec l'amorce sens 5'-GAGACTCGAGTATGTCGGTGGCAGGGCTG-3' et l'amorce anti-sens 5'-GAGAGGATCCTATGGGGCAGAGCAACCAG-3' dans le vecteur rLuc. La séquence a été amplifiée par PCR (polymerase chain reaction) à partir du plasmide pcDNA3-endophiline décrit dans une étude précédente (Micheva *et al*, 1997) et clonée dans le vecteur (h)prLuc C1 (humanized prLuc) à l'aide des enzymes KpnI et BamHI (Invitrogen, Life Technologies Inc, Burlington, ON, Canada).

2.3. Anticorps

Les anticorps polyclonaux dirigés contre la GFP (Green fluorescence protein) et l'endophiline ont été achetés chez Invitrogen. L'anticorps monoclonal contre l'hémagglutinine (HA) provient de Biovision (Mountain View, CA, USA).

2.4. Transfections

Les cellules HEK 293T (human embryonic kidney 293T) contiennent un niveau basal de Itch. Pour permettre une meilleure visualisation des phénomènes d'interaction, d'ubiquitylation et de dégradation, les différentes constructions de Itch, de l'endophiline et de l'ubiquitine sont surexprimées dans des cellules HEK 293T. Les plasmides GFP-Itch WT et ses mutants, le plasmide HA-ubiquitine et le plasmide pcDNA3-endophiline sont exprimés dans les cellules à l'aide de la technique calcium/phosphate à 5 µg d'ADN par boîte de pétri de 10 cm (Kingston *et al*, 2003). La méthode de transfection au calcium induit la précipitation de l'ADN sur les cellules. Par phagocytose, l'ADN entrera dans les cellules pour permettre l'expression des protéines correspondantes (Loyter *et al*, 1982).

2.5. Immunofluorescence

Afin de déterminer si les mutations des sites de phosphorylation par JNK de la ligase Itch affectent sa localisation, une observation par immunofluorescence est effectuée pour visualiser la localisation des mutants de la protéine Itch. Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine 24 h avant la transfection à la lipofectamine. La lipofectamine est une solution lipidique cationique qui va créer des interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ADN. Les complexes ADN-lipofectamine se lient à la membrane des cellules et entreront par endocytose dans les cellules (Duan *et al*, 2009). Les plasmides codant pour GFP-Itch WT ainsi que les mutants GFP-Itch CA, AAA, ADA et AAS sont transfectés dans des cellules COS (CV-1 in origin and carrying SV40 genetic material) avec la lipofectamine et 0,8 µg d'ADN par puits de 2 cm² (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Douze heures après la transfection, les cellules sont lavées dans du PBS (phosphate-buffered saline, 20 mM NaH₂PO₄, 0,9% NaCl, pH 7,4) puis fixées 30 minutes dans une solution de 3,3%

paraformaldéhyde à température pièce. Les lamelles de verre contenant les cellules transfectées fixées sont montées sur lame. Les images des cellules exprimant les constructions sont prises à l'aide d'un microscope confocal LSM 510 duo de Zeiss à l'aide d'un objectif 63X à l'huile (Carl Zeiss, Germany).

2.6. Immunoprécipitation

Pour déterminer si la phosphorylation influence l'autoubiquitylation de la ligase Itch, les mutants GFP-Itch AAA, ADA, AAS, CA ainsi que GFP-Itch WT en présence d'ubiquitine sont exprimées dans les cellules HEK 293T. Par la suite, les protéines sont extraites et soumises à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP. Le processus d'immunoprécipitation consiste à récupérer un antigène par un anticorps couplé à une matrice solide. Dans la présente étude, la matrice solide est composée de billes de sépharose couplées à la protéine A. Les anticorps interagissent avec la protéine A et ce complexe permet de récupérer l'antigène spécifique, soit GFP-Itch WT et ses mutants. L'interaction entre anti-GFP et Itch permet de déterminer si Itch interagit avec d'autres protéines dans un extrait cellulaire en effectuant un immunobuvardage de type Western sur le complexe anticorps-antigène. Comme le complexe protéine A-anticorps est incubé avec l'extrait contenant toutes les protéines présentes dans les cellules, la détection de complexes protéiques est possible (figure 7) (Phizicky et Fields, 1995, Bonifacino et Dell'Angelica, 2001). L'ubiquitylation d'une protéine peut être détectée par un immunobuvardage contre l'ubiquitine. Dans la présente étude, si Itch est ubiquitylée, il y aura une présence d'une traînée de poids moléculaire supérieur à son poids moléculaire causée par l'addition de l'ubiquitine à la protéine.

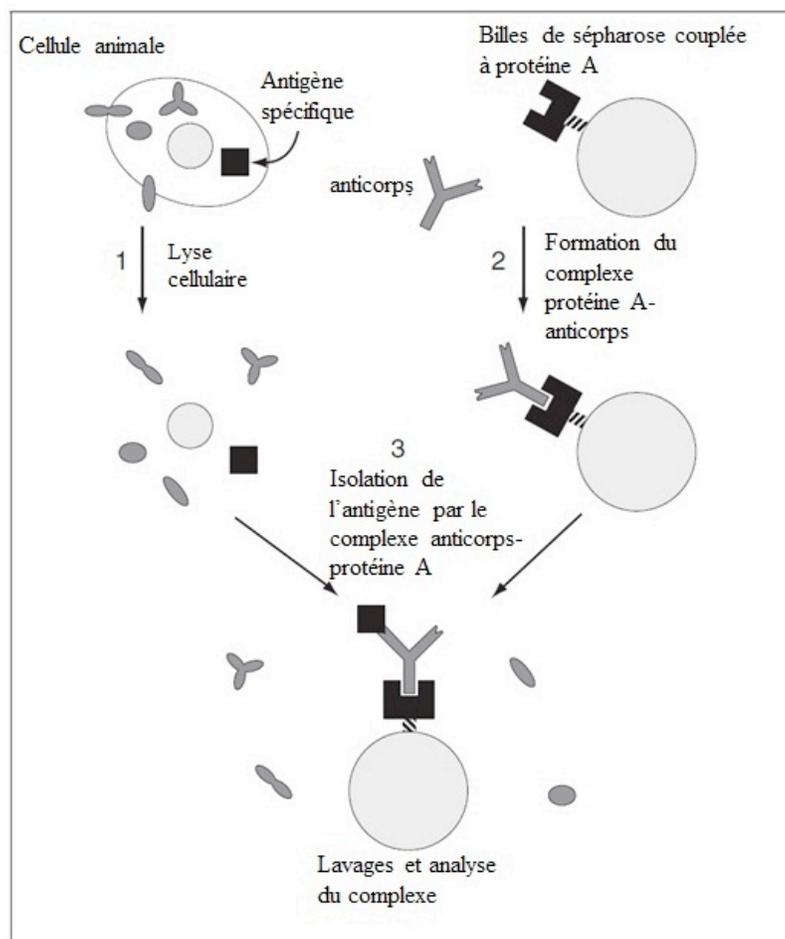


Figure 7 : Processus d'immunoprécipitation. 1. La lyse cellulaire est effectuée sur des cellules animales contenant l'antigène spécifique (Itch WT, AAA, ADA, AAS et CA). 2. Incubation de l'anticorps (anti-GFP) avec les billes de sépharose couplées à la protéine A pour former le complexe anticorps-protéine A. 3. Le complexe anticorps-protéine A est ensuite incubé avec l'extrait cellulaire contenant l'antigène spécifique. Suite à l'incubation, le complexe anticorps-protéine A est lavé puis analysé (modifié de Bonifacino et Dell'Angelica, 2001).

Les plasmides GFP-Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont transfectés avec le plasmide HA-ubiquitine dans des cellules HEK 293T. Les cellules exprimant les différents mutants de Itch et l'ubiquitine sont lavées dans du PBS froid et extraites dans une solution A (Hepes 10 mM pH 7,4, 150 mM NaCl contenant de la benzamidine 1X, PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 1X, de la leupeptine 1X et de l'aprotinine 1X). Les cellules sont lysées par sonication suivie d'une incubation de 30 minutes à 4°C dans du Triton X-100 à concentration finale de 1%. Suite à l'incubation, les extraits cellulaires sont centrifugés à 4°C à une vitesse de 45 000 rpm pendant 15 minutes. Le

surnageant de chaque extrait cellulaire est récupéré et 10% est conservé pour constituer l'extrait total (CL). Le surnageant restant est incubé avec 20 μ l de billes protéine A préalablement incubé avec 0,5 μ l d'anticorps α -GFP. Suite à une incubation de 2 h à température pièce, les échantillons sont rincés dans la solution A pour conserver les protéines liées aux billes. Les échantillons sont dénaturés 5 minutes à 95°C. Ils sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose pour permettre un immunobuvardage de type Western et ainsi détecter l'ubiquitylation de Itch.

2.7. BRET

Pour déterminer si les sites de phosphorylation de la ligase Itch influencent son interaction avec l'endophiline, nous avons utilisé la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). Le BRET consiste à exprimer chez des cellules deux protéines de fusion, l'une couplée à rLuc (Renilla Luciferase) et l'autre couplée à la GFP. Ces cellules sont ensuite traitées avec la coelenterazine, un substrat perméable qui est dégradée par rLuc et émet de l'énergie (luminescence mesurée à 465-505 nm). De cette façon, si les protéines de fusion interagissent entre elles, cela aura pour effet de rapprocher la luciférase de la GFP. Si cette proximité est de moins de 100 Å, il y aura transfert de l'énergie produite par la luciférase à la GFP qui réémettra cette énergie à une longueur d'onde supérieure (fluorescence d'interaction mesurée à 505-555 nm). En mesurant l'intensité de cette réémission et en divisant cette valeur par la quantité de luminescence totale qui est produite (mesurée à 465-505 nm), on obtient un ratio BRET qui témoigne de l'interaction entre les molécules. Étant donné que le niveau d'interaction peut varier selon le niveau d'expression des protéines l'une par rapport à l'autre, le ratio BRET peut être évalué en fonction d'un second ratio qui témoigne de la proportion des protéines. Ce dernier est établi en déterminant la quantité totale de protéines de fusion GFP en les stimulant à l'aide d'un laser à 485 nm afin de déterminer leur émission (fluorescence totale mesurée à 530 nm). Cette valeur est ensuite divisée par la luminescence totale mesurée suite à l'ajout du substrat pour donner le ratio d'expression (fluorescence totale/luminescence totale).

La représentation graphique du ratio BRET en fonction du ratio d'expression donne une courbe logarithmique saturable dans le cas d'une interaction spécifique alors qu'on obtient une droite à pente faible dans le cas d'une interaction due au hasard (Pfleger et Eidne, 2003).

Dans cette étude, des cellules HEK293T ont été transfectées au calcium phosphate avec une quantité constante de rLuc-endophiline tout en faisant varier la quantité de GFP-Itch. Les cellules sont resuspendues dans une solution de Tyrode contenant 5mM EDTA pour atteindre une concentration finale de 10^6 cellules par mL, 48h après la transfection. La lecture de fluorescence totale est effectuée à 530 nm suite à l'excitation de la GFP à 485 nm (FlexStation, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Après avoir ajouté la coelenterazine (Biotium, Hayward, CA, USA) aux cellules pour une concentration finale de 5 μ M, la luminescence (465-505 nm) et la fluorescence d'interaction (505-555 nm) sont mesurées sur un deuxième appareil (Mithras-LB-940, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). Ces essais ont permis d'obtenir les courbes d'interaction de l'endophiline avec les différentes formes de Itch (AAA, AAS, ADA, WT ou CA). Ceci a aussi permis de déterminer les quantités de transfectants requises pour atteindre la moitié de la valeur de saturation du ratio BRET. Deux expériences distinctes (n = 36-40) ont été effectuées dans ces conditions afin de comparer l'interaction des différents mutants chez des populations cellulaires présentant des taux et des ratios d'expression similaires. Les résultats ont été comparés par une analyse de variance suivie d'un test de Tukey à l'aide du logiciel d'analyse statistique SPSS 16.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA) afin de déterminer l'intervalle de confiance des résultats présentés dans l'histogramme.

2.8. Protéines de fusion

Les différentes constructions GST sont exprimées dans les bactéries BL21 d'*Escherichia coli* et purifiées avec des billes glutathione-sepharose (Bio-World, Dublin, OH, USA). Les constructions GST couplées aux billes de glutathione-sepharose constituent les protéines de fusion utilisées pour les chromatographies d'affinité d'interaction et d'ubiquitylation. Les billes d'agarose couplées à la GST permettent

l'immobilisation des protéines GST-endophiline SH3 et GST-Itch PRD d'extraits bactériens (figure 8, étape 1).

Les bactéries contenant les plasmides GST-endophiline SH3 et GST-Itch PRD sont inoculées dans du milieu LB. Les cultures sont incubées jusqu'à ce que la DO_{600} soit de 0,5, indiquant que la culture bactérienne a atteint la moitié de sa phase de croissance. Ensuite, les cultures bactériennes sont induites à l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) pour une concentration finale de 0,5 mM pendant 2h30 à 37 °C. Les bactéries sont centrifugées pendant 15 minutes à 4000 g puis resuspendues dans du PBS. Les bactéries sont lysées par sonication puis la lyse est complétée par l'ajout de triton X-100 à une concentration finale de 1% suivi d'une incubation de 20 minutes à 4 °C avec agitation. Les lysats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 10 000 g puis le surnageant est récupéré. Le surnageant contient les protéines de fusion GST-endophiline SH3 et GST-Itch PRD.

Suite à l'extraction, les surnageants sont incubés avec les billes d'agarose couplées à la glutathione qui vont se lier avec les protéines GST. Cette incubation permet de purifier les protéines de fusion et d'éliminer les protéines non désirées. Suite à l'incubation, les billes sont lavées trois fois dans du PBS froid pour éliminer les protéines non liées. Une fois les lavages terminés, les complexes billes-GST sont utilisés dans les chromatographies d'affinité.

2.9. Chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité est effectuée pour déterminer si les sites de phosphorylation par JNK de la ligase Itch sont impliqués dans son interaction avec l'endophiline, une protéine à domaine SH3. La chromatographie d'affinité permet de déterminer l'interaction entre deux protéines. D'abord, les plasmides GFP-Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont transfectés dans des cellules HEK 293T. Les cellules sont lavées et les protéines sont extraites comme décrit précédemment. Des volumes correspondant à 10% des extraits cellulaires sont conservés pour constituer l'extrait de départ. Les extraits restants sont incubés 2h à température pièce avec 20 μ g de protéines de fusion GST-endophiline SH3. Cette incubation permet de récupérer les différents

mutants de Itch qui interagiront avec le domaine SH3 de l'endophiline rattaché à la GST (figure 8, étape 2, Phizicky et Fields, 1995).

Suite à l'incubation, les billes sont lavées avec la solution A pour permettre l'élimination des protéines non liées (figure 8, étape 3). Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 95°C et déposés sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pour permettre un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-GFP pour détecter la présence des différentes constructions de Itch qui ont interagi avec le domaine SH3 de l'endophiline. La détection des constructions de Itch par chromatographie d'affinité nous permettra de déterminer si les sites de phosphorylation par JNK sur Itch sont impliqués dans l'interaction de Itch avec les protéines SH3 dont l'endophiline.

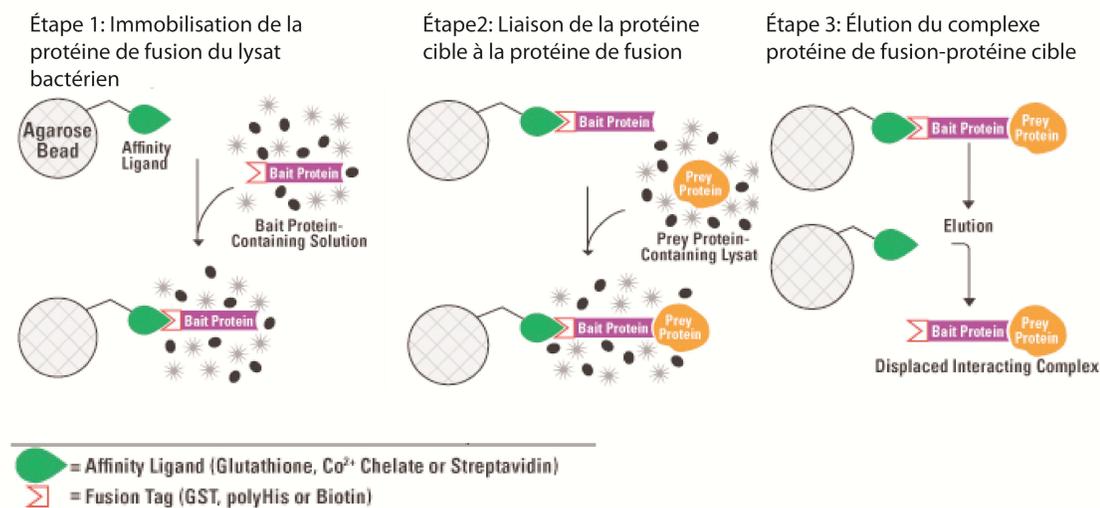


Figure 8 : Schéma représentant la chromatographie d'affinité. La première étape consiste à immobiliser sur une matrice solide comme des billes d'agarose couplées à la glutathione, la protéine de fusion GST-endophiline SH3 ou GST-Itch PRD contenue dans un lysat bactérien. Une fois la protéine immobilisée, le complexe est utilisé pour récupérer dans un lysat cellulaire les différents Itch ou l'endophiline respectivement. Après une incubation des complexes avec les lysats cellulaires, les complexes GST-SH3-Itch ou GST-PRD-endophiline sont élués (modifié de Protein Interaction Technical Handbook, Fisher Scientific).

La chromatographie d'affinité est également utilisée pour déterminer l'impact des mutations des sites de phosphorylation sur la capacité de Itch à ubiquityler l'endophiline. Les plasmides de l'endophiline et de la HA-ubiquitine sont surexprimés en présence des

différentes constructions de Itch dans des cellules HEK 293T. Comme mentionné précédemment, les cellules sont lavées dans du PBS froid et les protéines sont extraites dans la solution A. Après avoir conservé des fractions des extraits cellulaires qui correspondent à 10% des protéines totales des échantillons, les extraits restants sont incubés avec 20 µg des protéines de fusion GST-Itch PRD. Suite à l'incubation de 2h à température pièce, les billes sont lavées dans la solution A et dénaturées 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide pour permettre un immunobuvardage de type Western et observer l'ubiquitylation de l'endophiline par les différents mutants de Itch. L'anticorps anti-HA permet de détecter les formes ubiquitylées de l'endophiline par Itch. L'ubiquitylation de l'endophiline par les différents mutants de la ligase Itch permettra de déterminer l'importance des mutations des sites de phosphorylation dans la capacité de Itch à ubiquityler l'endophiline.

2.10. Dégradation de l'endophiline

Une façon indirecte de mesurer l'effet de la phosphorylation sur l'ubiquitylation des protéines SH3 est d'observer la dégradation de l'endophiline en présence des différents mutants de Itch. La dégradation peut être observée en bloquant la synthèse de nouvelles protéines. La cycloheximide (CHX) est un inhibiteur qui empêche la synthèse de nouvelles protéines en bloquant l'élongation lors de la traduction (Schneider-Poetsch *et al*, 2010). S'il y a une dégradation de l'endophiline en présence des constructions de Itch, une diminution du niveau de l'endophiline devrait être observée lorsque les extraits cellulaires sont traités avec la cycloheximide.

Les différentes constructions GFP-Itch soit Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont exprimées dans les cellules HEK 293T. Quarante huit heures après la transfection, les cellules sont traitées 0, 3 et 6 h à la cycloheximide (US Biological, Swampscott, MA, USA) à une concentration finale de 80 µg/ml. Le traitement est arrêté par deux lavages successifs au PBS froid. Les cellules sont ensuite extraites de la même façon que précédemment. Les protéines totales des extraits cellulaires sont dosées par la méthode de Bradford (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) puis 100 µg de protéines sont déposées sur gel. Suite à la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis un immunobuvardage de type western est effectué. L'anticorps

anti-endophiline permet de détecter le niveau de l'endophiline endogène présent dans les différents échantillons. Les bandes obtenues sont ensuite quantifiées en utilisant la moyenne des pixels de la fonction analyse du programme Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Une diminution de la moyenne des pixels dans le temps indiquera que les constructions de Itch causent l'ubiquitylation de l'endophiline et conséquemment la dégradation de l'endophiline.

La dégradation de l'endophiline est également mesurée indirectement en bloquant l'activité du protéasome. La lactacystine est un inhibiteur qui interagit avec le noyau catalytique 20S du protéasome et inhibe son activité peptidase. La lactacystine inhibe aussi la sous-unité 26S du protéasome responsable de l'hydrolyse des peptides ubiquitylés ce qui empêche ces peptides d'être dégradés par le protéasome. L'inhibition du protéasome cause une accumulation des protéines dans la cellule (Fenteany et Schreiber, 1998). L'inhibition du protéasome par un inhibiteur chimique permet de déterminer l'impact des mutations des sites de phosphorylation par JNK de Itch sur sa capacité à ubiquityler l'endophiline et donc d'induire sa dégradation par le protéasome.

Les constructions GFP-Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont transfectées dans des cellules HEK 293T. Les cellules sont traitées 16 h à la lactacystine 10 μ M (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada) 24 h après la transfection. Les protéines des cellules surexprimant les différents Itch sont extraites comme mentionné précédemment. Les surnageants sont dosés par la méthode de Bradford (Fisher Scientific) pour déterminer la quantité totale de protéines de chaque extrait cellulaire. Pour chaque construction, 30 μ g de protéines sont déposés sur gel puis soumis à un transfert sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite soumises à un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps anti-endophiline et anti-GFP pour détecter l'endophiline et Itch respectivement. Les bandes obtenues pour l'endophiline sont numérisées et quantifiées à l'aide de la moyenne de la fonction analyse du programme Image J (NIH). L'écart entre l'intensité de la bande avec ou sans traitement à la lactacystine représente la fraction de protéine qui a été dégradée par le protéasome.

3. Résultats préliminaires

3.1. Constructions et expression des mutants de la ligase Itch

La phosphorylation de la ligase Itch par la kinase JNK est nécessaire pour son interaction avec les protéines c-Jun et JunB, deux protéines qui contiennent des motifs PPXY et qui interagissent avec les domaines WW de la ligase Itch. La phosphorylation de la ligase est également importante pour l'ubiquitylation de ces protéines (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006). Dans le but de déterminer si cette phosphorylation est nécessaire pour la classe de substrats SH3, nous avons créé des mutants de la ligase ne pouvant être phosphorylée (AAA), mimant une forme toujours phosphorylée (ADA) ou sans activité ligase (CA). Nous avons également obtenu au cours de la mutagenèse dirigée une construction de Itch ayant conservé un site de phosphorylation original (AAS) (tableau II et figure 9). Des études précédentes ont montré que la présence d'une seule charge négative est suffisante pour augmenter l'activité catalytique de Itch (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006), d'où l'utilisation de la construction Itch ADA pour vérifier l'impact de la phosphorylation sur l'interaction de Itch avec ses substrats. Les cinq constructions de la ligase ont été confirmées par séquençage.

Tableau II : Les différents mutants de la ligase Itch ainsi que l'effet des mutations ponctuelles sur la ligase.

Mutant	Effets de la mutation
AAA	Ne peut être phosphorylé par JNK
ADA	Mime une version de Itch toujours phosphorylé par JNK
AAS	Un seul site de phosphorylation disponible pour JNK
WT	Trois sites de phosphorylation possible pour JNK
CA	Aucune activité catalytique mais possède les trois sites de phosphorylation pour JNK

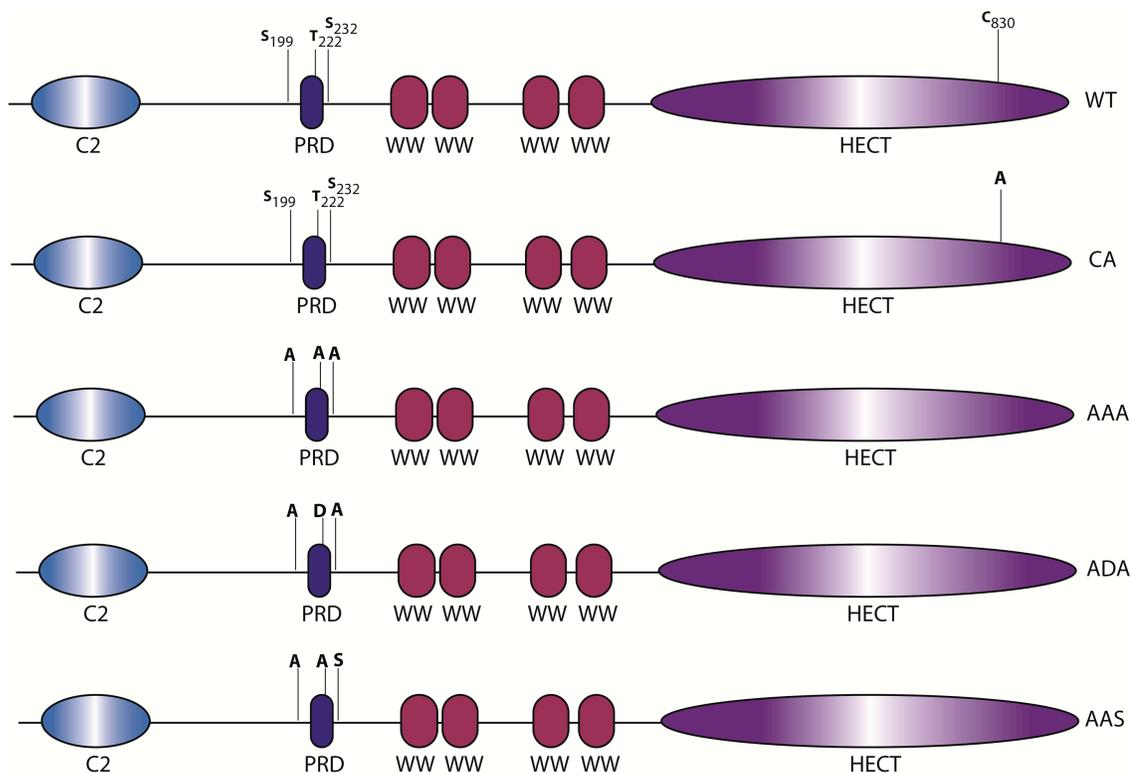


Figure 9 : Représentation schématique des constructions de la ligase Itch. À partir de la séquence normale de la ligase (WT), une forme contenant une mutation permettant d'éliminer l'activité ligase de Itch a été créée en mutant la cystéine 830 par une alanine (CA). Une forme de Itch ne pouvant être phosphorylée est également créée en mutant les trois sites de phosphorylation de JNK par des alanines (AAA). Une construction constitutivement active est obtenue en remplaçant une alanine de la construction précédente par un acide aspartique (ADA). Lors de la création des mutants AAA et ADA, la construction AAS est également obtenue alors que deux sites de phosphorylation, S199 et T 222, sont remplacés par des alanines et une sérine originale (S232) est conservée.

Ensuite, nous avons exprimé les mutants de Itch ainsi que Itch WT dans des cellules HEK 293T. Les protéines de ces cellules sont extraites puis un immunobuvardage de type Western est effectué pour vérifier l'expression de Itch et de ses mutants. La détection de protéines pour toutes les constructions de Itch sur la membrane de nitrocellulose permet de confirmer que l'ADN mutant obtenu est fonctionnel et s'exprime correctement (figure 10).

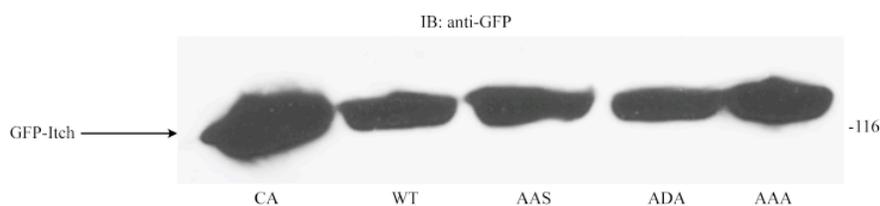


Figure 10 : Expression des différents mutants de la ligase Itch. Les constructions GFP-Itch CA, WT, AAS, ADA et AAA sont surexprimées dans des cellules HEK293T puis extraites 48h après la transfection. Les extraits sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Un immunobuvardage de type Western est effectué. L'anticorps anti-GFP est utilisé pour détecter les différentes formes de la ligase Itch.

3.2. Localisation des mutants de la ligase Itch

Dans le but de vérifier si les mutations effectuées sur les sites de phosphorylation ainsi que sur la cystéine active n'influençaient pas la localisation des mutants, nous avons surexprimé chaque construction de Itch dans les cellules COS par une transfection à la lipofectamine. La localisation des différents mutants est comparée avec la construction WT (figure 11). Les images obtenues en microscopie confocale nous permettent de voir que la localisation de Itch CA, AAA, ADA et AAS n'est pas affectée par leurs mutations lorsqu'elle est comparée avec la localisation de la ligase normale. On observe un enrichissement de la protéine dans la région du Golgi et dans des vésicules périnucléaires correspondant probablement aux endosomes, tel que rapporté par Angers *et al* (2004).

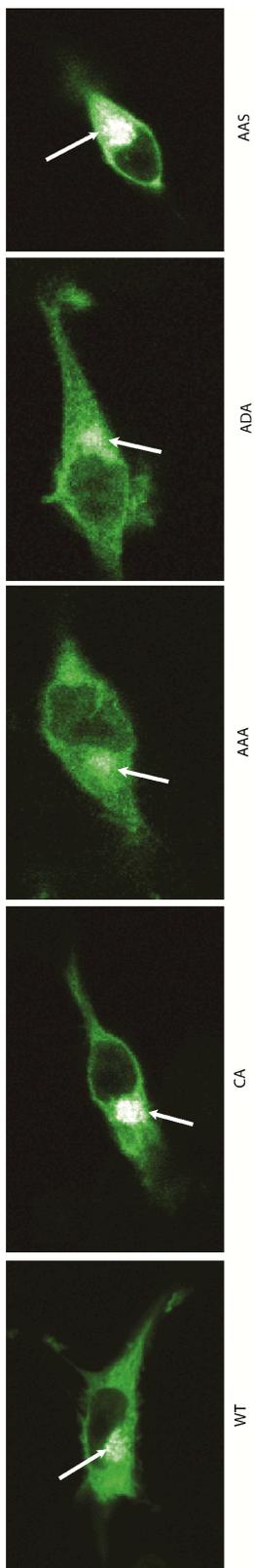


Figure 11 : Localisation des constructions de la ligase Ick dans des cellules COS. La forme normale (WT) et les mutants CA, AAA, ADA et AAS de la ligase Ick sont surexprimés dans des cellules COS par une transfection à la lipofectamine (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Seize heures après la transfection, les cellules sont fixées 30 minutes avec du paraformaldéhyde 3,3% puis visualisées à l'aide d'un objectif 63X d'un microscope LSM510 Duo de Zeiss. Les flèches pointent les accumulations périmoléculaires correspondant probablement aux endosomes.

3.3. Autoubiquitylation des différents mutants de la ligase Itch

La phosphorylation de la ligase Itch est importante pour l'interaction et l'ubiquitylation de c-Jun et JunB, deux substrats se liant à ses domaines WW. La phosphorylation de Itch permettrait de dégager ses domaines WW et son domaine HECT d'une interaction inhibitrice par un changement de conformation. Ce changement induirait l'ubiquitylation des protéines à motifs PPXY comme c-Jun et JunB (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006). L'autoubiquitylation de Itch est un moyen de mesurer son activité catalytique et Gallagher *et al* (2006) avaient montré que l'autoubiquitylation de Itch dépend de sa phosphorylation par JNK. Suite à la création des mutants de la ligase Itch, nous avons déterminé l'impact des mutations AAA, AAS et ADA de Itch sur sa capacité à s'ubiquityler. Pour ce faire, nous avons surexprimé dans des cellules HEK 293T les différents mutants de Itch en présence d'ubiquitine. Les fusions GFP-Itch sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-GFP, et l'ubiquitylation déterminée par un immunoblot avec un anticorps dirigé contre l'ubiquitine (HA).

Lorsque la ligase Itch ne peut pas être phosphorylée (AAA), l'autoubiquitylation de Itch est très faible (figure 12A, puits AAA). Par contre, l'introduction d'un acide aspartique imitant un site phosphorylé stimule l'autoubiquitylation, comparé à la forme AAA, car une traînée de poids moléculaire supérieur à la masse de Itch est observée pour le mutant ADA (figure 12A, puits ADA). L'autoubiquitylation de la ligase Itch est possible lorsqu'un seul site de phosphorylation est disponible sur la ligase comme il est possible de constater par la présence d'ubiquitylation pour le mutant de Itch AAS (figure 12A, puits AAS). La forme normale de la ligase Itch possède l'autoubiquitylation la plus forte (WT, figure 12A). La ligase sans activité catalytique (CA) montre aussi un très faible taux d'ubiquitylation, observé ici par une faible traînée représentant la polyubiquitylation (figure 12A, puits CA), ce qui confirme que notre mutant est catalytiquement inactif. L'ubiquitylation résiduelle observée avec AAA et CA pourrait être due à l'activité endogène de la ligase Itch qui est naturellement exprimée dans les cellules HEK. Ces résultats préliminaires indiquent que nos constructions de Itch sont fonctionnelles et se comportent comme il est rapporté dans la littérature (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006).

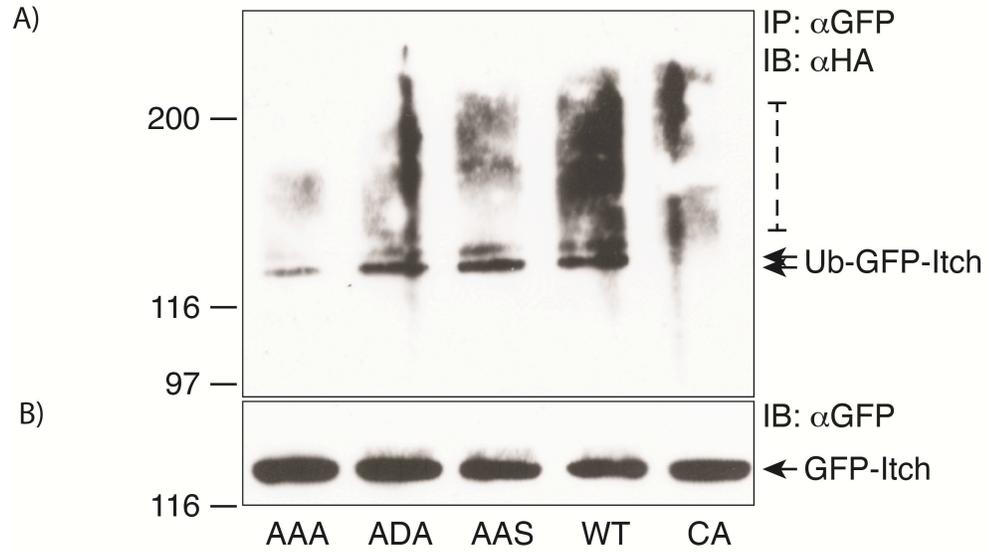


Figure 12 : Autoubiquitylation des constructions de la ligase Itch. Des cellules HEK293T sont transfectées avec les différentes constructions GFP-Itch en présence de la HA-ubiquitine. A) Les protéines sont extraites et soumises à une immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti-GFP. Les protéines recueillies sont ensuite soumises à un immunobuvardage (IB) anti-HA pour déterminer la présence d'ubiquitine sur les différentes variantes de la ligase Itch. B) Les protéines immunoprécipitées sont également soumises à un immunobuvardage avec l'anticorps anti-GFP pour confirmer l'immunoprécipitation de Itch avec les protéines A couplées à l'anticorps anti-GFP.

4. Résultats

4.1. Interaction de la ligase Itch avec l'endophiline

Les protéines à domaine SH3 interagissent avec des motifs riches en proline. L'endophiline est une protéine à domaine SH3 qui interagit avec le domaine PRD de Itch. L'interaction entre le domaine SH3 de l'endophiline et le domaine PRD de la ligase Itch cause l'ubiquitylation de l'endophiline et sa dégradation par le protéasome. De même, une stimulation des cellules avec l'EGF augmente l'ubiquitylation de l'endophiline en présence de Itch (Angers *et al*, 2004, Azakir et Angers, 2009). Pour vérifier si l'association entre Itch et l'endophiline est influencée par la phosphorylation du domaine PRD de la ligase comme il est observé pour les protéines qui interagissent avec les domaines WW de Itch, les lysats de cellules HEK surexprimant les mutants de Itch sont incubés avec la protéine de fusion GST-SH3 endophiline. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE et soumises à un immunobuvardage de type Western.

Nous pouvons constater la présence de bandes correspondant à Itch pour toutes les constructions de la ligase, ce qui montre que tous les mutants de Itch interagissent avec le domaine SH3 de l'endophiline tout comme la forme normale de la ligase (figure 13, WT, panneau PD). La présence d'une bande pour la construction de Itch qui ne peut être phosphorylé (AAA) permet de constater que l'absence de phosphorylation sur les sites phosphorylés par JNK n'empêche pas l'interaction de Itch avec l'endophiline, alors que la forme mimant la phosphorylation (ADA) n'influence pas l'interaction entre Itch et le domaine SH3 de l'endophiline (figure 13, panneau PD). L'absence de deux sites de phosphorylation n'empêche pas l'interaction entre Itch et le domaine SH3 de l'endophiline (AAS, figure 13, panneau PD).

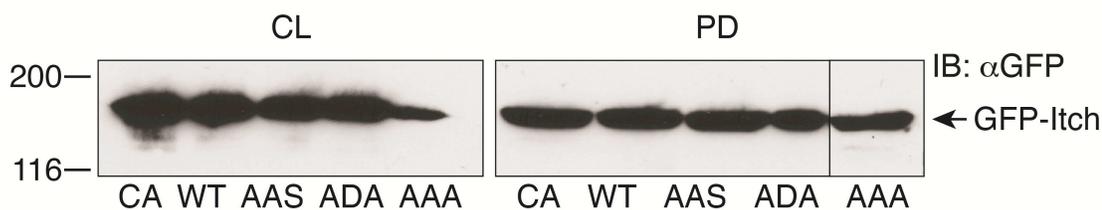


Figure 13 : Interaction entre les différents mutants de Itch et le domaine SH3 de l'endophiline. Les constructions GFP-Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont surexprimées dans des cellules HEK293T. Les protéines sont extraites puis soumises à une chromatographie d'affinité avec la protéine de fusion GST-endophiline SH3. L'anticorps anti-GFP a permis de détecter Itch interagissant avec les protéines de fusion GST-endophiline SH3 (pull-down, PD) ainsi que la quantité de GFP-Itch dans les extraits de départ (CL, 10% de l'extrait).

Dans les essais de chromatographie d'affinité, l'interaction entre Itch et l'endophiline a lieu *in vitro* après l'extraction des protéines des cellules. Pour observer plus directement l'interaction de Itch avec l'endophiline *in vivo*, nous avons effectué des essais BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*). Pour ces expériences, les cellules HEK 293T sont transfectées avec des niveaux normalisés de l'endophiline fusionnée avec le gène de la luciférase de la Rénille (*Renilla luciferase*), et les constructions GFP-Itch. La coelenterazine, le substrat de la luciférase, est ajoutée aux cellules 24h après la transfection. La fluorescence et la luminescence sont mesurées, puis le ratio BRET est calculé pour chaque condition. Les résultats, reportés à la figure 14, montrent que les niveaux d'interactions avec l'endophiline similaires pour tous les mutants de Itch.

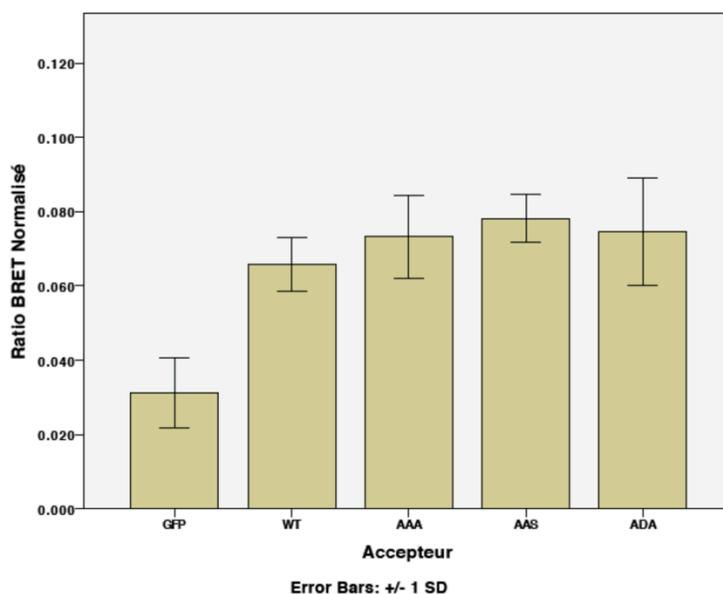


Figure 14 : Interaction entre rLuc-endophiline et GFP-Itch. Des cellules HEK sont transfectées avec des niveaux constants de rLuc-endophiline et de GFP, GFP-Itch WT, AAA, AAS et ADA. Suite à une normalisation pour éliminer l'auto-fluorescence, les ratios BRET sont calculés. Les lectures sont effectuées sur 40 échantillons de cellules transfectées avec rLuc-endophiline et GFP-Itch. Les barres d'erreur (error bars) correspondent à un écart-type (SD). Ceci permet de confirmer que les mutants de la ligase Itch ont tous un niveau d'interaction similaire avec l'endophiline.

4.2. Ubiquitylation de l'endophiline par Itch

Puisque la phosphorylation ne semble pas essentielle pour l'interaction de Itch avec les protéines à domaine SH3, nous avons voulu voir si la phosphorylation pourrait moduler l'ubiquitylation de l'endophiline. Lorsque Itch est phosphorylé, l'ubiquitylation de c-Jun et JunB est augmentée (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006). Dans le but de déterminer si le même phénomène se produit pour les protéines à domaine SH3, les différents mutants de la ligase Itch ainsi que la ligase normale sont transfectés dans des cellules HEK 293T en présence de l'endophiline et de l'ubiquitine. Les protéines sont ensuite extraites et incubées avec la protéine de fusion GST-Itch PRD afin de récupérer l'endophiline. Les protéines récupérées par cette chromatographie d'affinité sont séparées sur SDS-PAGE et soumises à un immunobuvardage de type Western. Avec l'anticorps anti-HA, il est possible de détecter l'ubiquitylation de l'endophiline par la

présence de bandes de poids moléculaire plus élevé que l'endophiline qui correspondent aux formes ubiquitylées de l'endophiline.

Nous pouvons observer que l'absence de la phosphorylation de la ligase Itch (AAA) n'empêche pas l'ubiquitylation de l'endophiline (figure 15A). Le mutant imitant une forme phosphorylée (Itch ADA) permet également l'ubiquitylation de l'endophiline. La présence d'un seul site de phosphorylation sur la ligase Itch ne semble pas empêcher l'ubiquitylation car il est possible d'observer l'ubiquitylation de l'endophiline par le mutant AAS. Le niveau d'ubiquitylation du mutant AAS est comparable au niveau du mutant ADA. Le mutant CA catalytiquement inactif, ne provoque pas d'ubiquitylation de l'endophiline ce qui est normal (figure 15A). La présence de bandes suivies d'une trainée représentant la polyubiquitylation est observée pour tous les mutants de la ligase Itch ainsi que pour la forme normale de Itch ce qui indique que la phosphorylation de la ligase n'est pas essentielle pour qu'il y ait ubiquitylation de l'endophiline.

Le niveau d'activité de la ligase Itch pourrait toutefois être modulé puisque nous pouvons constater que le niveau d'ubiquitylation de l'endophiline est plus élevé en présence du mutant AAA et de la forme normale de la ligase qu'en présence des mutants ADA et AAS (figure 15A). Il est toutefois difficile d'attribuer la différence à la phosphorylation étant donné que la forme sauvage et la forme non-phosphorylable de Itch sont comparables.

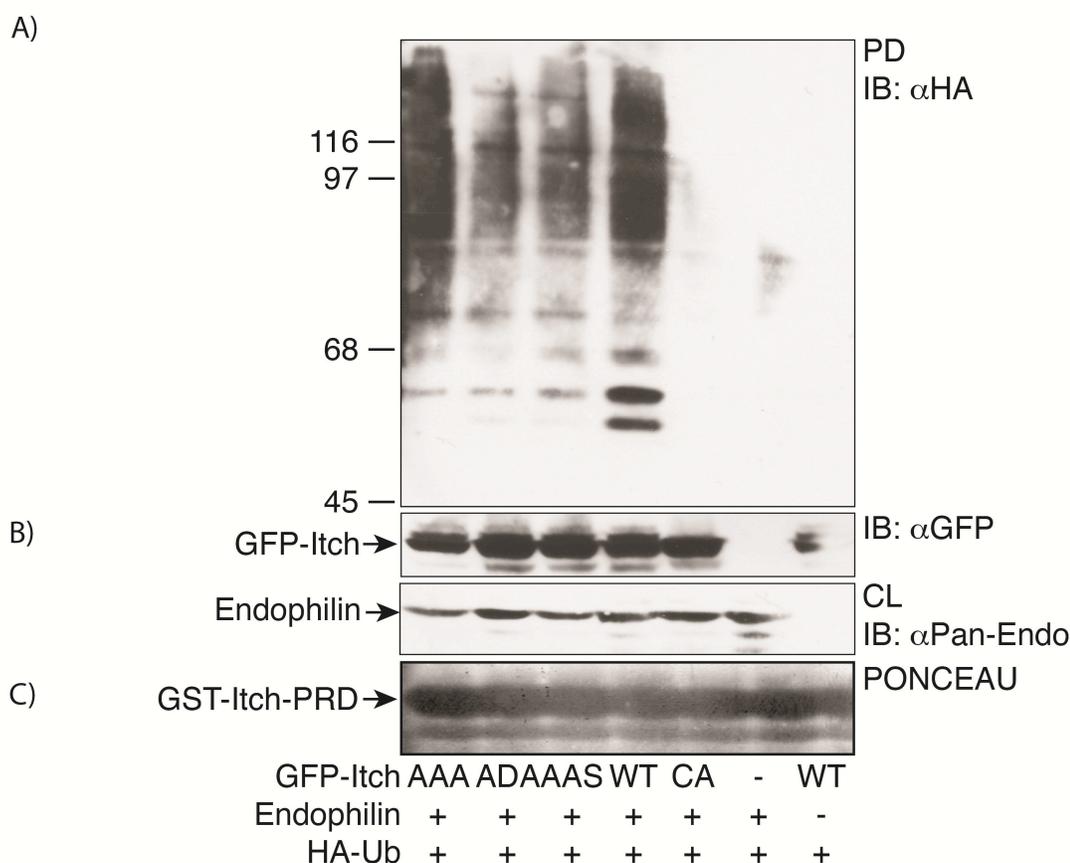


Figure 15 : Ubiquitylation de l'endophiline par les mutants de la ligase Itch. Les constructions GFP-Itch AAA, ADA, AAS, WT et CA sont transfectées avec l'endophiline et de la HA-ubiquitine dans des cellules HEK293T, puis les protéines sont extraites 48h après la transfection. A) Les protéines sont soumises à une chromatographie d'affinité avec le domaine PRD de Itch fusionné à GST. L'anticorps anti-HA a permis de détecter l'ubiquitine associée à l'endophiline purifiée (PD). B) L'anticorps anti-GFP et anti-endophilin ont permis de montrer l'expression des différents GFP-Itch et l'endophiline, respectivement, dans les extraits cellulaires totaux (CL). C) La coloration au ponceau montre le niveau équivalent de protéines de fusion GST-Itch PRD incubé avec les extraits protéiques ainsi que le niveau d'endophiline récupéré pour les différentes transfections.

4.3. Dégradation de l'endophiline endogène

Des études effectuées précédemment ont montré que la ligase Itch entraînait une dégradation de l'endophiline et que cet effet était augmenté lorsque les cellules étaient stimulées à l'EGF (Azakir et Angers, 2009). Les résultats obtenus précédemment montrent que la phosphorylation n'est pas obligatoire pour l'interaction entre Itch et

l'endophiline. L'absence de phosphorylation sur Itch n'empêche pas l'ubiquitylation de l'endophiline. Nous avons voulu voir si la phosphorylation de Itch influençait la dégradation de l'endophiline. Une façon de voir la dégradation des protéines est d'empêcher la synthèse de nouvelles protéines avec un inhibiteur chimique comme la cycloheximide.

Suite au traitement à la cycloheximide des cellules exprimant les différentes constructions de Itch, il est possible de voir que la ligase sans site actif ne peut causer la dégradation de l'endophiline observée ici par la présence de bandes équivalentes pour tous les temps de traitement (figure 16). L'absence de dégradation par la ligase Itch CA est due au fait que la ligase ne peut pas ubiquityler l'endophiline et donc induire sa dégradation. Le mutant de Itch ne pouvant être phosphorylé (AAA) cause peu de dégradation de l'endophiline (figure 16a et b). Par contre, la phosphorylation de Itch favoriserait la dégradation de l'endophiline comme nous pouvons le constater lorsque nous regardons la diminution des bandes représentant l'endophiline endogène retrouvée en présence de Itch ADA (figure 16a et b). La présence d'un seul site de phosphorylation Itch (AAS) semble causer la dégradation de l'endophiline mais à un degré moindre que lorsque la ligase est phosphorylée ou sous sa forme normale (WT) (figure 16a et b). La forme normale de la ligase Itch induit la dégradation de l'endophiline suite à son ubiquitylation observée ici par la présence de l'endophiline seulement au temps zéro.

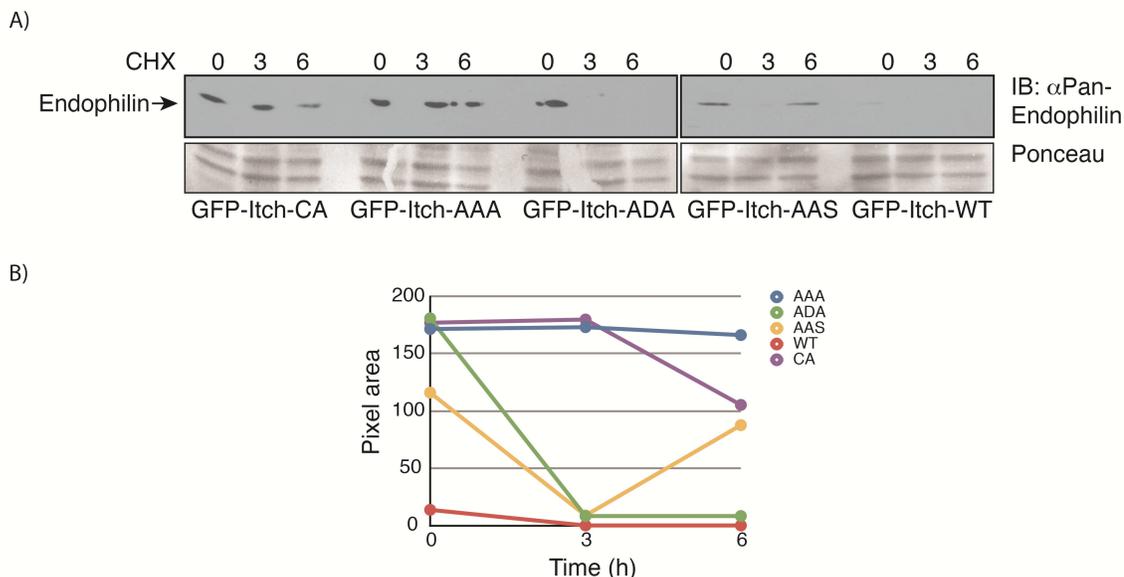
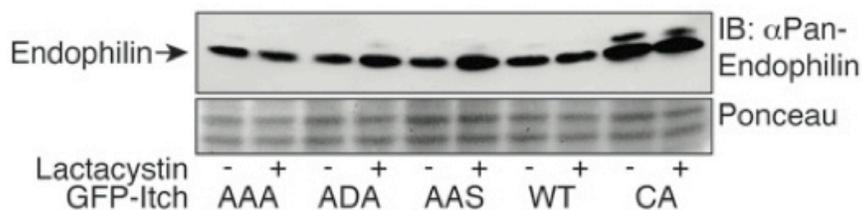


Figure 16 : Dégradation de l'endophiline endogène en présence des différents Itch suite à un traitement à la cycloheximide. A) Les cellules exprimant les différentes constructions de Itch sont traitées avec de la cycloheximide à $80\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pendant 3 et 6 h. Les lysats cellulaires sont dosés par la méthode de Bradford et $100\mu\text{g}$ de protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE. Avec l'anticorps pan-endophiline, il est possible de détecter l'endophiline endogène. La coloration ponceau montre le niveau équivalent de protéines mis sur gel. B) Les pixels moyens (pixel area) de l'immunobuvardage présenté en A sont quantifiés à l'aide du logiciel Image J (NIH). Les pixels moyens représentent la quantité de l'endophiline détectée sur le film après les différents temps de traitement.

La dégradation des protéines peut également être inhibée en bloquant l'activité du protéasome. La lactacystine est un inhibiteur chimique du protéasome qui cause l'accumulation des protéines ubiquitylées. Suite au traitement à la lactacystine des cellules surexprimant Itch, nous avons observé et quantifié l'accumulation de l'endophiline endogène (figure 17 a et b). Le mutant de la ligase Itch ne pouvant être phosphorylé par JNK (AAA) ne cause aucune accumulation de l'endophiline endogène. Le mutant constitutivement actif (ADA) cause une légère accumulation de l'endophiline tout comme la forme normale de Itch (WT). Le mutant de Itch contenant qu'un seul site de phosphorylation (AAS) cause une accumulation élevée de l'endophiline alors que le mutant de Itch sans activité ligase (CA) ne cause aucune accumulation de l'endophiline endogène (figure 17 a et b).

A)



B)

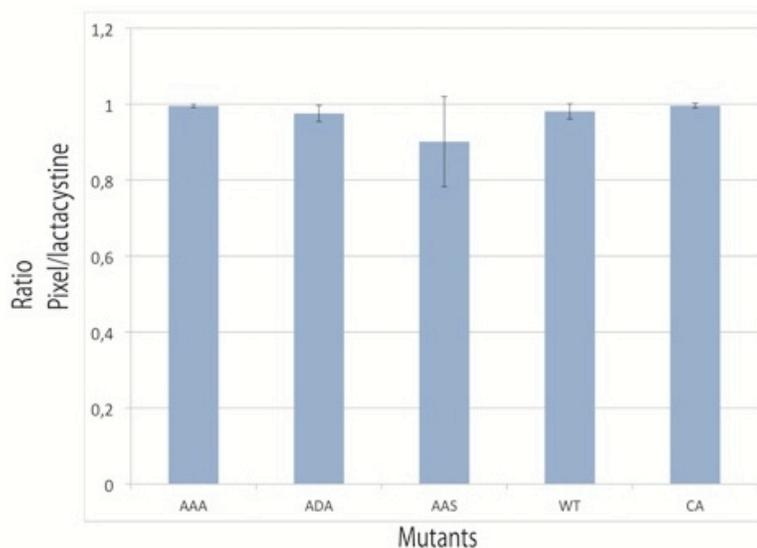


Figure 17 : Dégradation de l'endophiline par la ligase Itch. A) Les cellules HEK 293T transfectées avec les différentes constructions de la ligase Itch sont traitées 16h avec la lactacystine, un inhibiteur du protéasome. Les protéines sont ensuite extraites et soumises à un immunobuvardage de type Western. L'endophiline endogène est détectée à l'aide de l'anticorps anti-endophiline. B) Les pixels moyens représentant la quantité d'endophiline endogène de trois immunobuvardages sont mesurés à l'aide du logiciel Image J (NIH). Les pixels moyens sont normalisés où l'endophiline détectée après 16h de traitement correspond au maximum de l'endophiline accumulée pour chaque construction de Itch pour 3 répétitions. Les barres d'erreurs correspondent à un écart-type standard.

Ensemble, ces résultats semblent montrer que la ligase Itch cause une diminution modeste de la quantité de l'endophiline, mais qui n'est pas du tout perçue par le mutant AAA, ne pouvant être phosphorylé, suggérant une possible facilitation de l'ubiquitylation suite à la phosphorylation par JNK. Lors des deux tests de dégradation, nous pouvons constater que la forme constitutivement active de Itch dégrade l'endophiline de façon comparable à la forme normale de Itch (figure 16 a et b, figure 17

a et b). Le mutant de la ligase Itch qui comporte un seul site de phosphorylation (AAS) semble également favoriser la dégradation de l'endophiline.

5. Discussion

La ligase Itch possède deux catégories de substrats : les substrats à motif PPXY qui interagissent avec ses domaines WW et les substrats à domaine SH3 qui interagissent avec son domaine riche en proline. La phosphorylation de la ligase Itch permet de réguler son activité ligase envers certains substrats de la catégorie PPXY (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2004, Yang *et al*, 2006, Morales *et al*, 2007). Le but de cette étude était de déterminer si la phosphorylation de la ligase Itch par JNK était nécessaire pour l'interaction et l'ubiquitylation des protéines à domaine SH3.

5.1. Itch, JNK et les protéines SH3

La phosphorylation de la ligase Itch module l'interaction et l'ubiquitylation de c-Jun et JunB, deux protéines qui se lient à ses domaines WW. La phosphorylation de Itch permettrait de dégager ses domaines WW et son domaine HECT d'une interaction inhibitrice intramoléculaire par un changement de conformation. Ce changement de conformation permettrait l'interaction de Itch avec les protéines c-Jun et JunB et conséquemment d'induire leur ubiquitylation (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006). La ligase Itch contient un domaine riche en proline qui interagit avec le domaine SH3 de certaines protéines dont l'endophiline. Nous avons observé que la phosphorylation de Itch semblait n'avoir aucune influence sur son interaction avec l'endophiline. Ceci est contraire au modèle de Gallagher décrit précédemment qui suggère que la phosphorylation de Itch est nécessaire pour son interaction avec ses substrats (Gallagher *et al*, 2006).

Cependant, nos résultats correspondent à ce qui a été démontré par Azakir et Angers (2009). Cette étude montre que l'interaction entre Itch et l'endophiline est possible en absence de phosphorylation par JNK de Itch. Nos résultats montrent que l'interaction inhibitrice intramoléculaire de Itch n'empêche pas son interaction avec l'endophiline. Comme l'interaction est possible sans phosphorylation, les sites d'interaction de l'endophiline sur Itch seraient disponibles et accessibles même en présence de l'interaction intramoléculaire entre le domaine riche en proline et le domaine HECT de Itch.

Après avoir déterminé que la phosphorylation de Itch n'est pas essentielle pour l'interaction de la ligase avec l'endophiline, l'impact des sites de phosphorylation de Itch sur l'ubiquitylation de l'endophiline est observée. La phosphorylation de la ligase Itch par JNK n'affecte pas l'ubiquitylation de l'endophiline car nous observons l'ubiquitylation de l'endophiline pour toutes les constructions de Itch même lorsque la ligase ne peut être phosphorylée par JNK. Ce résultat est opposé à ce qui est observé dans l'étude de Gallagher, où l'ubiquitylation de c-Jun et JunB est absente lorsque la ligase Itch ne peut être phosphorylée par JNK. L'ubiquitylation de ces deux substrats augmente lorsque Itch est phosphorylée par JNK. L'augmentation de l'ubiquitylation observée pour JunB et c-Jun est dû à la libération des domaines WW de l'interaction inhibitrice intramoléculaire entre le domaine PRD et le domaine HECT de Itch (Gallagher *et al*, 2006, Gao *et al*, 2004). Nos résultats indiqueraient que la présence de l'interaction inhibitrice empêche l'interaction des substrats avec les domaines WW de Itch mais n'empêche pas Itch d'ubiquityler d'autres protéines dont les protéines SH3. Itch aurait une activité ligase de base qui serait augmentée en présence de phosphorylation.

Des études précédentes ont montré que l'ubiquitylation de l'endophiline augmente lorsque la ligase Itch est stimulée à l'EGF. Ceci serait dû à la phosphorylation de Itch par JNK (Azakir et Angers, 2009). Cependant, nous n'avons observé aucune augmentation d'ubiquitylation lorsque la ligase Itch est constamment phosphorylée par rapport à la ligase ne pouvant être phosphorylée par JNK. La stimulation à l'EGF ainsi que l'utilisation de la forme normale de Itch peut expliquer la différence entre l'étude d'Azakir et Angers (2009) et nos résultats. La forme normale de Itch pouvant être stimulée dans le temps permet de voir l'augmentation de l'ubiquitylation alors que la forme de Itch mimant une version phosphorylée permet seulement de voir l'ubiquitylation résultant de la stimulation maximale. Également, le niveau d'ubiquitylation de l'endophiline en présence de la ligase constitutivement active dépend du niveau d'expression de la ligase alors que dans l'étude précédente, le niveau d'ubiquitylation de l'endophiline mesuré dépend de la réponse à la stimulation.

Nous avons observé une diminution de l'ubiquitylation lorsque nous utilisons une version de Itch mimant une version phosphorylée de Itch par JNK. Les répétitions de l'expérience permettent d'éliminer la phosphorylation pour expliquer la diminution observée car aucune variation dans le niveau d'ubiquitylation n'était détectée dans les répétitions. Le niveau d'expression des protéines ainsi que le niveau de transfection pourrait expliquer la différence entre l'ubiquitylation de Itch toujours phosphorylée et l'ubiquitylation de Itch non phosphorylée ou normale.

L'augmentation de la dégradation de l'endophiline par le protéasome suite à la phosphorylation de Itch correspond à ce qui est observé pour la protéine JunB. JunB montre une dégradation dépendante de l'activation de Itch. Lorsque la ligase Itch est sous sa forme non phosphorylée, JunB peut interagir avec le gène responsable de la production d'IL-4. Lorsque Itch est phosphorylée par JNK, une dégradation de JunB est observée permettant ainsi un contrôle sur la quantité d'IL-4 produite (Gao *et al*, 2004, Gallagher *et al*, 2006). La phosphorylation de Itch augmenterait l'ubiquitylation de l'endophiline ce qui induirait une plus grande dégradation de l'endophiline par le protéasome.

La phosphorylation des ligases pourrait avoir un impact sur la régulation de l'abondance et l'activité de certains substrats. Comme la phosphorylation augmenterait l'activité enzymatique des ligases dans certains cas, l'ubiquitylation de leurs substrats serait augmentée ce qui du même coup augmenterait leur dégradation par le protéasome. Dans cette étude, lorsque la synthèse des protéines est bloquée, une diminution de l'endophiline est observée pour les constructions de Itch normale (WT), constitutivement active (ADA) et contenant un site de phosphorylation (AAS). De même, lorsque la dégradation des protéines est bloquée par l'inhibition du protéasome, les constructions de Itch ADA, AAS et WT induisent une accumulation de l'endophiline. La variation des niveaux de l'endophiline lors d'une inhibition chimique de la synthèse ou de la dégradation des protéines indique que la ligase Itch augmenterait la quantité de l'endophiline ubiquitylée ce qui augmenterait la dégradation de l'endophiline par le protéasome. Ceci confirme ce qui est observé dans une étude précédente où l'endophiline était dégradée suite à la surexpression de la ligase Itch (Azakir et Angers, 2009).

Nous observons une variation de dégradation entre les mutants ne pouvant être phosphorylé et constitutivement actif ce qui indiquerait que la phosphorylation induirait une augmentation d'ubiquitylation de l'endophiline par Itch. Il est possible que la variation d'ubiquitylation entre le mutant de Itch mimant une version phosphorylée de la ligase et les autres constructions de Itch soit trop faible pour être détectée par les techniques utilisées dans cette étude mais l'effet de la variation d'ubiquitylation soit perceptible lorsque la synthèse des protéines ou leur dégradation est inhibée. De même, la détection de l'ubiquitylation et de la dégradation de l'endophiline avec une forme de Itch dont ses trois sites de phosphorylation sont mutés en acide aspartique pourrait donner une meilleure indication de la dégradation de l'endophiline suite à son ubiquitylation par Itch.

Le niveau de l'endophiline endogène mesurée pour le mutant de la ligase qui contient un site de phosphorylation (AAS) est équivalent à la ligase constitutivement active. Ceci pourrait être dû au fait que les mutations effectuées sur Itch pour substituer les sites de phosphorylation de JNK par des alanines pourrait influencer la conformation idéale de l'interaction entre Itch et l'endophiline. La présence des trois alanines pourrait déplacer légèrement le site d'ubiquitylation sur l'endophiline ce qui expliquerait la diminution d'ubiquitylation pour le mutant AAS. Les substrats marqués par une chaîne d'ubiquitines reliées entre elles par leur lysine 48 induit la dégradation de ces protéines par le protéasome (Woelk *et al*, 2007). Les trois alanines pourraient changer le type de chaînes formées sur l'endophiline ce qui expliquerait l'absence d'induction de dégradation de l'endophiline par le protéasome pour le mutant ne pouvant être phosphorylé par JNK.

5.2. Itch, Fbw7 et la phosphorylation

La phosphorylation de la ligase Itch par JNK sur trois sites situés dans le domaine riche en proline n'empêche pas l'interaction entre Itch et l'endophiline. Une situation similaire est observée dans le cas de la ligase Fbw7. La ligase Fbw7 est une ligase de type F-box qui recrute des complexes SCF pour induire l'ubiquitylation de certaines protéines. L'activité de Fbw7 est régulée de plusieurs façons dont la phosphorylation. En absence de phosphorylation, Fbw7 interagit avec certaines protéines dont elle-même et

Skp1, un des composants du complexe SCF qui aide Fbw7 à effectuer son activité ligase sur ses substrats. En présence de phosphorylation, ces interactions sont toujours possibles indiquant que la phosphorylation de Fbw7 n'empêche pas l'interaction de la ligase avec ses partenaires (Schülein *et al*, 2011). Nos résultats sont similaires à ce qui est observé ici dans le cas de la ligase Fbw7. Lorsque notre mutant de Itch ne peut pas être phosphorylé par JNK, l'interaction entre Itch et l'endophiline est possible. L'interaction entre Itch et l'endophiline est également possible lorsque le mutant de Itch mime une forme phosphorylée par JNK de Itch ce qui indique que la phosphorylation de Itch n'interfère pas dans son interaction avec l'endophiline. L'encombrement causé par le groupement phosphate n'empêcherait pas l'endophiline de se lier au domaine riche en proline de Itch.

Lorsque Fbw7 est phosphorylée, une augmentation dans l'ubiquitylation de ses substrats est observée (Schülein *et al*, 2011). Nous observons l'ubiquitylation de l'endophiline pour toutes nos constructions de Itch ce qui indique que les mutations des sites de phosphorylation n'affecte pas l'ubiquitylation de l'endophiline par Itch. Nos résultats ne montrent aucune augmentation dans l'ubiquitylation de l'endophiline lorsque Itch est constitutivement actif. Comme mentionné précédemment, les niveaux d'ubiquitylation détectés dans la présente étude seraient dépendants du niveau d'expression des protéines car nous surexprimons Itch, l'endophiline ainsi que l'ubiquitine. L'augmentation de l'ubiquitylation est possiblement trop faible pour qu'une légère variation soit détectée lorsque les protéines sont surexprimées. Les résultats obtenus dans les études sur Itch et Fbw7 indiqueraient que la phosphorylation des ligases augmente, dans certains cas, leur activité enzymatique vis-à-vis certains substrats.

La dégradation de l'endophiline par le protéasome serait facilitée par la phosphorylation de Itch. Ce phénomène est également observé pour la ligase Fbw7. Lorsque la ligase est stimulée par PI3K, ses substrats, c-Myc et cyclin E sont dégradés plus rapidement (Schülein *et al*, 2011). La comparaison des niveaux de l'endophiline endogène lorsque la synthèse de protéines est bloquée par un inhibiteur chimique comme la cycloheximide indique que la phosphorylation de Itch faciliterait la dégradation de l'endophiline par le protéasome. Le même phénomène est observé lorsque la dégradation par le protéasome est bloquée à l'aide de l'agent chimique la

lactacystine. Ces résultats indiqueraient que la phosphorylation de la ligase Itch augmenterait l'ubiquitylation de l'endophiline et conséquemment sa dégradation par le protéasome. La phosphorylation de Itch par JNK ne serait pas nécessaire pour induire l'ubiquitylation de l'endophiline par contre, elle pourrait favoriser la dégradation.

5.3. Itch et les autres protéines SH3

La phosphorylation de Itch ne serait pas essentielle pour permettre l'interaction de la ligase avec l'endophiline. La forme de Itch ne pouvant être phosphorylée par JNK interagit avec le domaine SH3 de l'endophiline. Ce résultat est similaire à ce qui est observée pour une autre protéine contenant un domaine SH3, la kinase Fyn. Le domaine SH3 de la kinase Fyn interagit avec le domaine WW3 de Itch indépendamment de l'activation de Itch par JNK (Yang *et al*, 2006).

Itch interagit également avec la pacsine et l'amphiphysine. La pacsine et l'amphiphysine sont deux protéines impliquées dans l'endocytose comme l'endophiline. L'étude caractérisant l'interaction de la ligase Itch avec la pacsine et l'amphiphysine surexprime la forme normale de Itch ce qui indique que la ligase pourrait interagir avec ces protéines sans phosphorylation (Desrochers, 2010). Ces résultats sont similaires à ce que nous obtenons pour l'endophiline. Lorsque nous surexprimons les constructions de Itch ne pouvant être phosphorylée ainsi que la forme normale de Itch, nous détectons une interaction entre le domaine SH3 de l'endophiline et la ligase. De même, nous détectons une interaction entre la ligase Itch et l'endophiline lorsque nous surexprimons la version de Itch constitutivement active. Il serait intéressant de déterminer si la phosphorylation de Itch influence l'interaction de Itch avec la pacsine et l'amphiphysine comme il a été fait pour l'endophiline. L'interaction entre le domaine SH3 de l'endophiline et le domaine PRD de Itch n'est pas influencée par la phosphorylation de la ligase ce qui suggère que les interactions entre les protéines SH3 avec les différents domaines d'interaction de la ligase Itch pourrait ne pas nécessiter la phosphorylation de Itch pour permettre leur interaction.

L'interaction entre Itch et le domaine SH3 de Fyn n'induit pas l'ubiquitylation de Fyn. L'effet de cette interaction est plutôt d'inhiber l'activité ligase de Itch (Yang *et al*, 2006). Cependant, l'interaction entre Itch et la pacsine ou l'amphiphysine cause leur

ubiquitylation (Desrochers, 2010). Comme mentionné précédemment, cette étude utilise seulement la forme normale de Itch ce qui suppose que l'ubiquitylation de la pacsine et de l'amphiphysine est possible en absence de phosphorylation par JNK sur Itch. Nos résultats sont similaires à cette étude. Lorsque nous surexprimons la forme ne pouvant être phosphorylée par JNK de Itch et la forme normale de Itch, nous détectons l'ubiquitylation de l'endophiline ce qui permet de penser que l'ubiquitylation de l'endophiline est possible sans la phosphorylation de Itch par JNK. Comme l'étude de Desrochers (2010) est effectuée avec seulement la forme normale de la ligase Itch, il n'est pas possible de déterminer si la phosphorylation de Itch influence le niveau d'ubiquitylation sur la pacsine et l'amphiphysine comme il a été fait pour l'endophiline. De même, aucun test de dégradation n'a été effectué dans l'étude de Desrochers (2010) sur la pacsine et l'amphiphysine. Il est donc impossible de comparer les résultats obtenus avec l'endophiline aux deux protéines. Il serait intéressant de comparer le niveau d'ubiquitylation de l'endophiline ainsi que le niveau de protéines lorsque la pacsine et l'amphiphysine sont mis en présence de la forme de Itch mimant une version de Itch phosphorylée par JNK.

5.4. Itch et l'encombrement stérique causé par la phosphorylation

La phosphorylation par JNK de Itch ne semble pas interférer dans sa capacité à interagir avec l'endophiline. Ce résultat est différent de ce qui est observé dans le cas de l'interaction entre LMPA2 et Itch. Lorsque Itch est phosphorylée par CK2 ou PKA sur la tyrosine en position 30 dans son troisième domaine WW, l'interaction entre Itch et LMPA2 est inhibée. La phosphorylation sur le résidu T30 de Itch cause un encombrement stérique qui empêche LMPA2 de se lier à Itch (Morales *et al*, 2007). L'encombrement stérique causé par l'ajout de groupement phosphate par JNK sur Itch ne semble pas interférer dans son interaction avec l'endophiline. Nos résultats montrent que l'interaction entre Itch et l'endophiline est possible en absence de phosphorylation et en présence de phosphorylation. Ces résultats supposeraient que la phosphorylation n'empêche pas l'interaction du domaine SH3 de l'endophiline avec le domaine riche en proline où sont situés les sites de phosphorylation par JNK de la ligase Itch.

De même, la phosphorylation de la ligase Nedd4-2 diminue son interaction avec son substrat principal ENaC. La phosphorylation de Nedd4-2 induirait un changement de conformation qui rendrait inapte la ligase à interagir avec son substrat (DeBonneville *et al*, 2001). Ce phénomène ne semble pas observé lorsque la ligase Itch est phosphorylée par JNK sur les trois résidus chevauchant son domaine riche en proline. La phosphorylation de Itch ne l'empêche pas d'interagir avec l'endophiline car aucune diminution d'interaction détectable n'est observée lorsque nous surexprimons le mutant de Itch mimant la forme phosphorylée de la ligase. Par contre, il faudrait vérifier si la présence de phosphorylation sur les trois sites à l'intérieur du domaine PRD influencerait l'interaction de Itch avec l'endophiline.

5.5. Itch et les protéines activatrices

L'absence de phosphorylation n'empêche pas la ligase Itch d'interagir avec l'endophiline, une protéine à domaine SH3. L'endophiline n'est pas la seule protéine interagissant avec Itch en absence de phosphorylation. Les protéines NDFIP interagissent avec les domaines WW de la ligase indépendamment de l'activation de Itch pour augmenter l'action de Itch sur ses substrats (Olivier *et al*, 2006, Mund et Pelham, 2009). De même, la protéine N4BP1 interagit avec Itch pour diminuer son activité ligase. L'interaction entre Itch et N4BP1 s'effectue indépendamment de la phosphorylation de Itch (Oberst *et al*, 2007). Les protéines NDFIP ainsi que la protéine N4BP1 ne sont pas ubiquitylés par Itch ce qui indiquerait que l'interaction de Itch avec certaines protéines ne mène pas directement à l'ubiquitylation de ces dernières. La phosphorylation de Itch serait donc nécessaire pour l'interaction de Itch avec certains de ses substrats mais elle ne serait pas essentielle pour d'autres. La régulation de l'activité de Itch par JNK ne serait donc pas un mécanisme général de contrôle de son activité, mais affecterait spécifiquement certains substrats.

6. Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche consistait à déterminer si la phosphorylation de la ligase Itch par la kinase JNK influençait la capacité de Itch à interagir et à ubiquityler les protéines à domaine SH3. Gallagher et ses collègues ont montré que lorsque la ligase Itch est non phosphorylée, sa conformation permettait une interaction intramoléculaire inhibitrice qui empêche la ligase d'interagir avec c-Jun et JunB via ses domaines WW. L'activation de la kinase JNK induit la phosphorylation de Itch ce qui enlève l'interaction inhibitrice et permet ainsi son interaction avec c-Jun et JunB. L'interaction de Itch avec c-Jun et JunB induit leur ubiquitylation (Gallagher *et al*, 2006, Gao *et al*, 2004). Les protéines à domaine SH3 interagissent avec le domaine PRD de la ligase Itch. À partir du modèle de Gallagher, nous avons voulu déterminer si la phosphorylation de la ligase Itch par JNK influençait la capacité de la ligase à interagir et à ubiquityler les protéines à domaine SH3. L'endophiline est une protéine à domaine SH3 dont l'interaction avec Itch est connue et caractérisée. En appliquant la technique de la chromatographie par affinité, nous avons déterminé que la phosphorylation de la ligase Itch n'influence pas l'interaction de Itch avec l'endophiline ainsi que l'ubiquitylation de l'endophiline par Itch. Par contre, la phosphorylation de la ligase Itch pourrait favoriser la dégradation de l'endophiline. L'étude de l'impact de la phosphorylation de la ligase Itch sur sa capacité à interagir et à ubiquityler les protéines à domaine SH3 nous a permis de constater que la ligase Itch peut réguler c-Jun et JunB différemment de l'endophiline.

La phosphorylation de Smurf-1 induit un changement d'affinité de la ligase pour ses substrats (Cheng *et al*, 2011). Il serait intéressant de voir si la phosphorylation de Itch par JNK induit un changement de préférence de l'endophiline vers c-Jun ou JunB lorsque Itch devient phosphorylé. La phosphorylation de Pellino augmente sa capacité à interagir avec différentes enzymes de conjugaison et permet différents types d'ubiquitylation sur ses substrats (Ordureau *et al*, 2008, Smith *et al*, 2009). Il serait intéressant de déterminer si la phosphorylation de la ligase Itch par JNK influence l'enzyme de conjugaison avec laquelle Itch interagit ainsi que le type de chaîne d'ubiquitine formée sur l'endophiline. Itch est également phosphorylée par Fyn (Yang *et*

al, 2006). La phosphorylation de Itch par Fyn inhibe sa capacité à interagir avec JunB. Nous pourrions comparer l'effet de la phosphorylation de Itch par Fyn sur l'endophiline à l'effet observé lorsque nous étudions la phosphorylation de Itch par JNK.

7. Références

- André, B. & Springael, J.Y., 1994. WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(2), p.1201-1205.
- Angers, A, Ramjaun, A.R & McPherson, P.S, 2004. The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12), p.11471-11479.
- Arnason, T. & Ellison, M.J., 1994. Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), p.7876-7883.
- Azakhir, B.A. & Angers, A., 2009. Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cellular Signalling*, 21(8), p.1326-1336.
- Azakhir, B.A., Desrochers, G. & Angers, A., 2010. The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *The FEBS Journal*, 277(5), p.1319-1330.
- Baboshina, O.V. & Haas, A.L., 1996. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5), p.2823-2831.
- Bai, J. *et al.*, 2010. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell*, 143(3), p.430-441.
- Baumann, C. *et al.*, 2010. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *The FEBS Journal*, 277(13), p.2803-2814.
- Ben-Saadon, R. *et al.*, 2006. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Molecular Cell*, 24(5), p.701-711.
- Bhalla, V. *et al.*, 2005. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(12), p.3073-3084.

- Bonifacino, J.S., Dell'Angelica, E.C. & Springer, T.A., 2001. Immunoprecipitation. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al]*, Chapter 9, p.Unit 9.8.
- Bruce, M.C. *et al.*, 2008. Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *The Biochemical Journal*, 415(1), p.155-163.
- Chang, L. *et al.*, 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*, 124(3), p.601-613.
- Chastagner, P., Israël, A. & Brou, C., 2008. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PloS One*, 3(7), p.e2735.
- Chen, H.I. & Sudol, M., 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), p.7819-7823.
- Cheng, P.-lin *et al.*, 2011. Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron*, 69(2), p.231-243.
- Cullen, P.J., 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(7), p.574-582.
- Debonneville, C. *et al.*, 2001. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *The EMBO Journal*, 20(24), p.7052-7059.
- Desrochers, G., 2010. Comparaison De L'ubiquitylation De Différentes Protéines À Domaine SH3, Montréal: Université de Montréal.
- Duan, Y. *et al.*, 2009. The biological routes of gene delivery mediated by lipid-based non-viral vectors. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(12), p.1351-1361.
- Fang, D. & Kerppola, T.K., 2004. Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), p.14782-14787.
- Fang, D. *et al.*, 2002. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nature Immunology*, 3(3), p.281-287.
- Fenteany, G. & Schreiber, S.L., 1998. Lactacystin, Proteasome Function, and Cell Fate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), p.8545 -8548.

- Finley, D. *et al.*, 1994. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Molecular and Cellular Biology*, 14(8), p.5501-5509.
- Gallagher, E. *et al.*, 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), p.1717-1722.
- Gao, M. *et al.*, 2004. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5694), p.271-275.
- Gregori, L. *et al.*, 1990. A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(15), p.8354-8357.
- Gulino, A., Di Marcotullio, L. & Screpanti, I., 2010. The multiple functions of Numb. *Experimental Cell Research*, 316(6), p.900-906.
- Haas, A.L. & Bright, P.M., 1988. The resolution and characterization of putative ubiquitin carrier protein isozymes from rabbit reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(26), p.13258-13267.
- Haas, A.L. & Rose, I.A., 1982. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(17), p.10329-10337.
- Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, p.425-479.
- Huibregtse, J.M. *et al.*, 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), p.5249.
- Ikeda, H. & Kerppola, T.K., 2008. Lysosomal localization of ubiquitinated Jun requires multiple determinants in a lysine-27-linked polyubiquitin conjugate. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), p.4588-4601.
- Janz, J.M., Sakmar, T.P. & Min, K.C., 2007. A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(39), p.28893-28903.
- Joazeiro, C.A. & Weissman, A.M., 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102(5), p.549-552.

- Kingston, R.E., Chen, C.A. & Okayama, H., 2003. Calcium phosphate transfection. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al]*, Chapter 20, p.Unit 20.3.
- Kjaerulff, O., Brodin, L. & Jung, A., 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 60(3), p.137-154.
- Levkowitz, G. *et al.*, 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular Cell*, 4(6), p.1029-1040.
- Li, H *et al.*, 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), p.491-501.
- Liu, Y.-C., 2007. The E3 ubiquitin ligase Itch in T cell activation, differentiation, and tolerance. *Seminars in Immunology*, 19(3), p.197-205.
- Loyter, A., Scangos, G.A. & Ruddle, F.H., 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(2), p.422-426.
- Marchese, A. *et al.*, 2003. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Developmental Cell*, 5(5), p.709-722.
- Marchese, A. & Benovic, J.L., 2001. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), p.45509-45512.
- Di Marcotullio, L *et al.*, 2011. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*, 30(1), p.65-76.
- Di Marcotullio, L. *et al.*, 2006. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nature Cell Biology*, 8(12), p.1415-1423.
- McPherson, P S, 1999. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cellular Signalling*, 11(4), p.229-238.
- Micheva, K.D., Kay, B.K. & McPherson, P S, 1997. Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(43), p.27239-27245.
- Morales, B. *et al.*, 2007. NMR structural studies of the ItchWW3 domain reveal that phosphorylation at T30 inhibits the interaction with PPxY-containing ligands. *Structure (London, England: 1993)*, 15(4), p.473-483.

- Mouchantaf, R. *et al.*, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50), p.38738-38747.
- Mund, T. & Pelham, H.R.B., 2009. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO Reports*, 10(5), p.501-507.
- Oberst, A. *et al.*, 2007. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), p.11280-11285.
- Oliver, P.M. *et al.*, 2006. Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T helper 2 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 25(6), p.929-940.
- Ordureau, A. *et al.*, 2008. The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *The Biochemical Journal*, 409(1), p.43-52.
- Perry, W.L. *et al.*, 1998. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nature Genetics*, 18(2), p.143-146.
- Pfleger, K.D.G. & Eidne, K.A., 2003. New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary*, 6(3), p.141-151.
- Phizicky, E.M. & Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews*, 59(1), p.94-123.
- Pickart, C.M., 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, 70, p.503-533.
- Pirozzi, G. *et al.*, 1997. Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(23), p.14611-14616.
- Qiu, L. *et al.*, 2000. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(46), p.35734-35737.
- Qualmann, B. *et al.*, 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Molecular Biology of the Cell*, 10(2), p.501-513.

- Ramjaun, A R *et al.*, 2001. Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(31), p.28913-28919.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P., 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), p.8569-8574.
- Rossi, M. *et al.*, 2009. Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(3), p.659-664.
- Rotin, D, Staub, O & Haguener-Tsapis, R., 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of Membrane Biology*, 176(1), p.1-17.
- Ruiz i Altaba, A., Sánchez, P. & Dahmane, N., 2002. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), p.361-372.
- Saito, Y.D. *et al.*, 2010. Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer*, 116(7), p.1629-1637.
- Salvesen, G.S. & Abrams, J.M., 2004. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, 23(16), p.2774-2784.
- Schneider-Poetsch, T. *et al.*, 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*, 6(3), p.209-217.
- Schülein, C., Eilers, M. & Popov, N., 2011. PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. *FEBS Letters*, 585(14), p.2151-2157.
- Scialpi, F. *et al.*, 2008. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), p.1515-1521.
- Shaw, A.Z. *et al.*, 2005. Phosphorylation of either Ser16 or Thr30 does not disrupt the structure of the Itch E3 ubiquitin ligase third WW domain. *Proteins*, 60(3), p.558-560.
- Simpson, F. *et al.*, 1999. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature Cell Biology*, 1(2), p.119-124.
- Slagsvold, T. *et al.*, 2006. CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *The EMBO Journal*, 25(16), p.3738-3749.

- Smith, H. *et al.*, 2009. Identification of the phosphorylation sites on the E3 ubiquitin ligase Pellino that are critical for activation by IRAK1 and IRAK4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), p.4584-4590.
- Spence, J. *et al.*, 1995. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), p.1265-1273.
- Thermo Scientific Pierce Protein Interaction Technical Handbook, Thermo Fischer Scientific. URL: http://www.piercenet.com/files/10PIE067_ProteinInteractionHB_1601945.pdf (consulté le 1er novembre 2011)
- Waterman, H. *et al.*, 2002. A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *The EMBO Journal*, 21(3), p.303-313.
- Wei, W. *et al.*, 2005. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell*, 8(1), p.25-33.
- Weiner, M.P. & Costa, G.L., 1994. Rapid PCR site-directed mutagenesis. *PCR Methods and Applications*, 4(3), p.S131-136.
- Welcker, M. & Clurman, B.E., 2008. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nature Reviews. Cancer*, 8(2), p.83-93.
- Wiesner, S. *et al.*, 2007. Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell*, 130(4), p.651-662.
- Wilkinson, K.D., 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(14), p.1245-1256.
- Woelk, T. *et al.*, 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Division*, 2, p.11.
- Wood, S A *et al.*, 1997. Cloning and expression analysis of a novel mouse gene with sequence similarity to the Drosophila fat facets gene. *Mechanisms of Development*, 63(1), p.29-38.
- Wu-Baer, F., Ludwig, T. & Baer, R., 2010. The UBXN1 protein associates with autoubiquitinated forms of the BRCA1 tumor suppressor and inhibits its enzymatic function. *Molecular and Cellular Biology*, 30(11), p.2787-2798.

Yang, C. *et al.*, 2006. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Molecular Cell*, 21(1), p.135-141.