



HAL
open science

**Identification des “ Ubiquitin Specific proteases ”
impliquées dans la régulation des voies de l’immunité
chez la drosophile**

Elodie Engel

► **To cite this version:**

Elodie Engel. Identification des “ Ubiquitin Specific proteases ” impliquées dans la régulation des voies de l’immunité chez la drosophile. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00403268

HAL Id: tel-00403268

<https://theses.hal.science/tel-00403268>

Submitted on 1 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie ENGEL

Le 2 juillet 2009

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire

**Identification des « Ubiquitin Specific Proteases » impliquées dans
la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile**

Directeur de thèse : Dr. Marie-Odile FAUVARQUE

Membres du jury

Dr. Saadi Khochbin	Président
Pr. Jean-Luc Imler	Rapporteur
Dr. Gilles Courtois	Rapporteur
Dr. Marie-Odile Fauvarque	Examineur

Thèse réalisée au sein du laboratoire « Transduction du Signal » INSERM U873
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble
Directeur : Dr. Jacques BAUDIER

REMERCIEMENTS

L'histoire a commencé par une matinée de conférences, en septembre 2005, dans l'amphithéâtre même où je soutiendrai ma thèse le 2 juillet prochain. Parmi les conférenciers, qui, pour la plupart, nous parlent de mesures de forces appliquées à l'ADN, de rayonnements lasers utilisés pour visualiser la polymérisation de l'actine, une chercheuse nous explique qu'on peut utiliser des mouches fluorescentes pour étudier la réponse immunitaire... Cette première rencontre avec Marie-Odile a suffi à aiguïser ma curiosité pour la biologie et quelques mois de stage dans son équipe m'ont convaincue de réaliser une thèse. A peine trois années ont passé depuis, et me voilà déjà sur le point de soutenir ma thèse...

Le travail présenté a été réalisé au CEA-Grenoble au sein du laboratoire « Transduction du Signal » dirigé par *Jacques Baudier*. Je remercie le CEA d'avoir financé mes trois années de thèse.

Je souhaite tout d'abord témoigner ma reconnaissance aux membres de mon Jury, *Saadi Khochbin*, *Jean-Luc Imler* et *Gilles Courtois* qui me font l'honneur de consacrer une partie de leur précieux temps à l'évaluation de mon travail.

Mon premier grand merci va à *Marie-Odile*, ma très chère directrice de thèse. Tu as su me communiquer ton enthousiasme et ta passion pour la Science. J'admire l'énergie que tu consacres à ton équipe et à tes projets de recherche. Je te remercie de m'avoir initiée à la génétique, aux mouches et de me soutenir dans mes projets professionnels.

Dom, tu m'as aidée à faire mes premiers pas dans les manips et j'apprécie ta façon de faire de la biologie moléculaire « à l'ancienne », tes conseils et ton travail de « défrichage » ont été indispensables à l'avancée de mon projet de thèse. Nos conversations au café du matin ou pendant les transferts à la « moucherie » vont me manquer...

Evelyne, voilà quelques mois déjà que tu as quitté le laboratoire mais je ne t'oublie pas pour autant. Ton expertise technique, ta gentillesse et ton réconfort m'ont permis de me sentir bien dans l'équipe. Merci aussi de m'avoir fait découvrir de fabuleux romans.

Je tiens aussi à remercier *Emmanuel*, ou *le Manu* comme on l'appelle quand il n'est pas là, Merci pour tes conseils en génétique, ta patience sans limite (quelqu'un t'as déjà vu en colère ?) et surtout pour ton « côté zen » qui a le don de détendre l'atmosphère.

Un grand merci à *Jackie*, ma partenaire de thèse, de bureau, de galère, d'éclats de rire... Ah, ce qu'on a pu partager pendant ces années (même un cours de danse orientale) ! Merci pour ta bonne humeur, sans toi le bureau va paraître bien vide durant ce mois de juillet...

Merci à *Magda* qui m'a fourni une aide précieuse durant ma dernière année de thèse. Merci pour toutes les manips en S2, pour les clonages, et surtout pour m'avoir supportée pendant les manips de biochimie, merci aussi pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Merci aussi à *Nicolas* qui, en plus de nombreux gâteaux (souvent ratés), a apporté beaucoup de bonne humeur dans l'équipe. Merci pour ton sens de la dérision, ton absence totale de susceptibilité et ton infinie gentillesse... Merci aussi pour toutes les conversations lors de nos trajets du soir en vélo.

Je pense aussi aux stagiaires de l'équipe qui, malgré leur passage rapide, ont su participer à la bonne ambiance du laboratoire. Je pense en particulier à *Sophie, Anne-Claire, Perrine, Jakub* et à la *vilaine fille*.

En plus des personnes de l'équipe, je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de Transduction du Signal qui ont, de près ou de loin, contribué au bon déroulement de ma thèse :

En particulier, je pense à *Odile* et *Claude*, qui m'ont fait partager leur passion du vélo. Merci aussi à *Alex* pour son aide précieuse et ses conseils en biologie cellulaire. Merci à *Béa* et *Peggy* pour nos conversations pendant lesquelles on refaisait le monde en salle de culture (si si un jour le monde ira mieux...). Merci à *Renaud* pour son aide en chimie. Un grand merci aussi à *Nicole, Christelle, Benoît* et *Olivia* pour leur expertise en biochimie. Merci aussi à *Jacques*, le chef du laboratoire, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et fait le plus beau des cadeaux : mon chat. Merci également à ma seconde partenaire de bureau *Anne* avec qui j'ai partagé bien plus que le bureau ! Merci aussi à *Didier* qui m'a fait découvrir la microscopie confocale et dont j'apprécie les anecdotes et la vision très réaliste du monde.

Hors du laboratoire, je remercie également *Saadi* et *Cécile* de m'avoir accueillie à l'IAB et initiée aux Western Blots. Merci à tous les deux pour leurs conversations constructives aussi bien du point de vue technique que professionnel.

Je remercie aussi *Maxim*, du laboratoire Biopuces, pour avoir caractérisé l'activité catalytique de dUSP2 et m'avoir donné des conseils très utiles en purification de protéines.

Je dois également un grand merci à ma famille qui m'a soutenue financièrement et moralement au cours de mes longues années d'études :

Merci à mes grands parents, *Marius* et *Fernande*, de comprendre que je ne puisse aller les voir tous les dimanches. Merci à papi *Jean* d'être aussi fier de sa petite fille ; j'ai également une pensée pour mamie *Raymonde* qui n'a jamais vraiment cru qu'on puisse faire quoi que ce soit de sérieux avec des mouches.

Je tiens à remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenue malgré mes nombreux changements de directions professionnels, merci pour votre confiance et votre amour.

Merci à mon frère et à sa Nanie parce que je les adore et que leur légèreté et leur bonne humeur m'a apporté un précieux soutien pendant ma thèse.

Merci aussi à ma belle famille pour son soutien.

Je ne peux m'empêcher de remercier mon chat, *Nala*, qui a su me procurer tout le réconfort du monde en venant se blottir contre moi pendant la rédaction...

Je termine en remerciant mon chéri, *Greg*, qui m'a supportée jour après jour au cours de cette thèse. Merci pour ton amour, ton soutien et ta « drôlerie » sans lesquels je n'aurais pu faire aboutir ce projet.

Et enfin, une pensée pour toutes les drosophiles qui ont été sacrifiées au nom de la Science.



Table des Matières

Partie A : Introduction	1
I. <u>L'ubiquitination dans la signalisation cellulaire</u>	3
I.1. Ubiquitination : réaction et enzymes	3
I.2. Destin des protéines ciblées	4
I.3. Les déubiquitinases	6
I.3.1. Les différentes classes de DUBs	7
I.3.1. a) Les UCHs	8
I.3.1. b) Les USPs	9
I.3.1. c) Les OTUs	11
I.3.1. d) Les JAMMs	12
I.3.1. e) Les MJDs	12
I.3.2. Régulation et spécificité des DUBs	13
I.3.3. Interaction DUBs/Ligases	15
I.4. Exemples de processus biologiques régulés par ubiquitination	16
I.4.1. L'ubiquitine dans les interactions protéines-protéines	16
I.4.2. L'ubiquitination dans l'endocytose	17
I.4.3. L'ubiquitination dans le noyau	18
I.4.3. a) Maintien des cellules souches	18
I.4.3. b) Transcription et réparation de l'ADN	19
I.4.4. L'ubiquitination dans la transduction du signal	19
I.4.5. Ubiquitination et acétylation : des signaux contradictoires ?	20
I.5. Implication de l'ubiquitination dans des pathologies humaines	22
I.5.1. Implication de l'ubiquitination dans le cancer	22
I.5.2. Exploitation du système ubiquitine par les virus	22
I.5.3. L'ubiquitination dans les maladies neurodégénératives	23
I.5.4. L'ubiquitination dans l'inflammation et l'oncogénèse	24

I.6. Recherche de cibles thérapeutiques parmi les protéines du « système ubiquitine »	25
I.6.1. Inhibition du protéasome : un traitement contre le cancer ?.....	25
I.6.2. Ciblage des enzymes de type E1 et E2.....	25
I.6.3. Vers des cibles plus spécifiques : les ubiquitines ligases et les DUBs.....	26
I.6.4. Stratégie d'identification d'inhibiteurs de DUBs.....	27
II. <u>L'ubiquitination dans la signalisation NF-κB</u>	30
II.1. Les voies NF-κB dans la signalisation cellulaire	30
II.2. Régulation « dégradation » dépendante des voies NF-κB	31
II.3. Régulation « dégradation » non dépendante des voies NF-κB	33
II.3.1. Activation de IKK par TRAF6 dans les voies IL-1R/TLRs.....	34
II.3.2. Activation de IKK par TRAF2 dans la voie du TNFR.....	36
II.3.3. Régulation négative des voies NF-κB par l'ubiquitination.....	38
II.3.3.a) CYLD clive les chaînes d'ubiquitine K63 de TRAF2, TRAF6 et NEMO.....	38
II.3.3.b) A20 clive les chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1, TRAF6 et NEMO et associe des polymères d'ubiquitine K48 à RIP1.....	38
II.3.3.c) Cezanne clive les chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1.....	39
II.3.3.d) USP15 clive les chaînes d'ubiquitine K48 de IκBα.....	40
III. <u>Conservation des voies NF-κB chez la drosophile</u>	41
III.1. La voie Toll	41
III.2. La voie Imd	44
III.3. Interaction entre les voies Toll et Imd	46
III.4. L'ubiquitination dans les voies Toll et Imd	47
III.4.1. L'ubiquitination dans la répression constitutive des voies Toll et Imd.....	47
III.4.2. Régulation de dTAK1 par l'ubiquitination et terminaison du signal.....	48
III.4.3. Implication des DUBs dans la voie Imd.....	50

Partie B : Résultats	51
I. <u>La déubiquitine d'USP36/Scrawny cible Imd pour empêcher l'activation de la réponse immunitaire chez la drosophile</u>	53
I.1. Résumé de l'article	53
I.2. Article : Thevenon et al. ,.....	57
I.3. Résultats complémentaires : localisation d'USP36 dans la cellule	89
I.3.1. Introduction : Localisation d'USP36 d'après la littérature.....	89
I.3.1.a) Chez la drosophile.....	89
I.3.2.b) En cellules humaines.....	90
I.3.2. Résultats : Localisation de dUSP36 en cellules S2 de drosophile.....	91
II. <u>Identification des « Ubiquitin Specific Proteases » impliquées dans la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile</u>	95
II.1. Démarche scientifique	95
II.2. Article : Engel et al., (en préparation)	96
II.3. Résultats complémentaires	127
II.3.1. Interaction fonctionnelle entre les USPs et les éléments de la voie Imd.....	127
II.3.1.a) Principe de l'expérience.....	127
II.3.1.b) Résultats.....	128
II.3.1.c) Interprétation.....	129
II.3.2. Localisation de dUSP2 en cellules S2.....	131
II.3.3. Inactivation des USPs humaines par siRNA en cellules HeLa.....	132
III. <u>Caractérisation de l'activité catalytique de dUSP2 à l'aide de substrats fluorescents</u> ...	137
III.1. Principe de l'expérience	137

III.2. Résultats	138
III.2.1. Détermination expérimentale des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m pour l'Ub-AMC.....	138
III.2.2. Détermination expérimentale des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m pour l'Ub-Rho110-G.....	140
III.2.3. Bilan : comparaison des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m de dUSP2 et hUSP2.....	142
III.3. Conclusion et perspectives	142
III.4. Matériel et méthodes	143
III.4.1. Protocole de préparation des USPs purifiées.....	143
III.4.2. Conditions de la réaction et détermination des paramètres K_m et k_{cat}	143
Partie C : Conclusion et perspectives	145
<u>Conclusion</u>	147
<u>Perspectives</u>	148
➤ Bilan sur l'activité catalytique des USPs.....	148
• Activité catalytique des formes sauvage et mutantes de dUSP36....	149
• dUSP34 aurait-elle perdu son activité catalytique ?.....	150
• Activité catalytique et après?.....	150
➤ Mécanisme d'action de dUSP2 et dUSP36 dans la voie Imd.....	151
• Deux USPs pour une seule cible ?.....	151
• dUSP36 et dUSP2 dans la dynamique du complexe PGRP-LC/Imd....	151
➤ Poursuite de l'étude des orthologues humains.....	152
➤ Réutilisation de la banque de dsRNA sur d'autres voies de signalisation.....	152
➤ Conclusion générale.....	153
Références bibliographiques	155

Annexes	173
Annexe 1 : Présentation du système « UAS Gal4 ».....	175
Annexe 2 : Cartes des transcrits de <i>dUsp2</i> et <i>dUsp34</i> et Schémas des constructions de dUSP2 et dUSP34 en fusion avec la GST.....	179
Annexe 3 : Rappel sur l'équation de Michaelis-Menten.....	180
Annexe 4 : Article : Bergeret et al., 2008.....	184
Annexe 5 : Les Ubiquitin Binding Domains (UBDs).....	195

Index des Figures

Figure 1	: Les réactions d'ubiquitination et d'hydrolyse de l'ubiquitine.....	4
Figure 2	: Les différentes étapes de l'ubiquitination (D'après Sun, 2008).....	5
Figure 3	: Liaison peptidique et isopeptidique	6
Figure 4	: Mécanismes chimiques de l'hydrolyse d'une liaison isopeptidique par une protéase à cystéine (a) et de l'activation de la cystéine catalytique (b).....	7
Figure 5	: Représentation de la structure des domaines catalytiques des cinq classes de DUBs (D'après Nijman et al., 2005).....	8
Figure 6	: Représentation de la structure des sites catalytiques d'USP7 et UCH-L3 (D'après Love et al., 2007).....	10
Figure 7	: Structure d'Otubain 2 (D'après Nanao et al., 2004).....	11
Figure 8	: Les mécanismes de régulation des DUBs (D'après Nijman et al., 2005).....	13
Figure 9	: Les différentes interactions DUBs/Ligases (D'après Nijman et al., 2005).....	16
Figure 10	: Représentation de différents types d'inhibiteurs du « système ubiquitine » (D'après Yang et al., 2009).....	27
Figure 11	: Voies d'activation canonique et non canonique des facteurs NF-κB (D'après Chen, 2005).....	31
Figure 12	: Modèle d'activation des voies du TNFR et des TLRs/IL-1R chez les mammifères (D'après Adhikari et al., 2007).....	37
Figure 13	: Modèle d'activation des facteurs NF-κB par les voies Toll/TLRs chez la drosophile et les mammifères respectivement (D'après Lemaître et Hoffmann, 2007 et Adhikari et al., 2007).....	42
Figure 14	: Modèle d'activation des facteurs NF-κB par les voies Imd/TNFR chez la drosophile et les mammifères respectivement (D'après Lemaître et Hoffmann, 2007 et Adhikari et al., 2007).....	45
Figure 15	: Induction des gènes codant la Drosomycine et de la Diptéricine en réponse à une infection par <i>Micrococcus luteus</i> (bactérie à Gram positif) et <i>Escherichia coli</i> (bactérie à Gram négatif). (D'après Lemaître et Hoffmann, 2007).....	46
Figure 16	: Représentation des différents transcrits de dUSP36 et de l'insertion de la séquence GFP (D'après Buszczak et al., 2009).....	89
Figure 17	: Localisation de dUSP36 en cellules de drosophile (D'après Buszczak et al., 2009).....	90
Figure 18	: Localisation de hUSP36 en cellules humaines (D'après Endo et al., 2009).....	90

Figure 19 :	Localisation de hUSP36⁸⁰¹⁻¹¹²¹ et de hUSP36^{Δ801-1121} en cellules humaines (D'après Endo et al., 2009).....	91
Figure 20 :	Localisation de dUSP36 en cellules S2 de drosophile.....	92
Figure 21 :	Phylogénie des Ubiquitin Specific Proteases de drosophile et de leurs orthologues humains.....	96
Figure 22 :	Représentation schématique des différents phénotypes obtenus résultant de l'inactivation des USPs dans l'aile.....	127
Figure 23 :	Représentation schématique des différents éléments de la voie Imd testés pour l'épistasie et positionnement spéculatif des USPs.....	128
Figure 24 :	Localisation de dUSP2 en cellules S2 de drosophile	131
Figure 25 :	Mesure par QPCR de l'inactivation des hUSPs par ARN interférence en cellules HeLa.....	133
Figure 26 :	Effet de l'inactivation des USPs humaines sur l'activation de la voie du TNFR en cellules HeLa.....	134
Figure 27 :	Détermination des paramètres K_m et k_{cat} de l'enzyme dUSP2 pour le substrat Ub-AMC.....	139
Figure 28 :	Détermination des paramètres K_m et k_{cat} de l'enzyme dUSP2 pour le substrat Ub-Rho110-G.....	141
Figure 29 :	Représentation simplifiée des fonctions hypothétiques des USPs au sein de la voie Imd.....	154
Figure 30 :	Illustration du système d'expression à deux éléments P	176
Figure 31 :	Illustration du système FLP/FRT conduisant à l'élimination d'un gène.....	177
Figure 32 :	Illustration du système FLP/FRT conduisant à la création de clones somatiques.....	178
Figure 33 :	Représentation des transcrits de <i>dUsp2</i> (CG14619) et <i>dUsp34</i> (CG5794).....	179
Figure 34 :	Représentation des constructions GST de dUSP2 et dUSP34.....	179

Index des Tableaux

Tableau 1	: Résultats d'une première expérience d'interaction génétique.....	128
Tableau 2	: Résultats d'une seconde expérience d'interaction génétique.....	129
Tableau 3	: Constantes cinétiques de dUSP2 pour le substrat Ub-AMC.....	140
Tableau 4	: Constantes cinétiques de dUSP2 pour le substrat Ub-Rho110-G.....	140
Tableau 5	: Comparatif des constantes cinétiques de hUSP2sc (d'après Hassiepen et al., 2007) et dUSP2sc pour les substrats Ub-AMC et Ub-Rho110-G.....	142
Tableau 6	: Les Ubiquitin Binding Domains (UBDs) et leurs caractéristiques (D'après Hurley et al., 2006).....	195

Liste des Abréviations

A20	synonyme de TNFAip3
ABC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G
ABIN	A20 B inding I nhibitor of NF- κ B
ADN	Acide D éoxyribonucléique
ADP	Adénosine D i P hosphate
AMSH	Associated M olecule with the SH3
AP1	Activator P rotein 1
ARN	Acide R ibonucléique
ARD1	A rrest- d efective- 1
ATP	Adénosine T ri P hosphate
BAFFR	B cell-Activating F actor R eceptor
BARD1	BRCA1 Associated R ING D omain 1
BLAST	B asic L ocal A lignment S earch T ool
BRCA1	B Reast C ancer 1
Brel	B refeldin-A sensitivity protein 1
Bre5	B refeldin-A sensitivity protein 5
βTrCP	β - T ransducin repeat C ontaining P rotein
Cbl	Casitas B -lineage L ymphoma
CD4	Cluster of D ifferentiation 4
Cezanne	C ellular z inc finger a nti-NF- κ B
CHAPS	3-[(3- C holamidopropyl)dimethylammonio]-1- p ropanesulfonate
CUE	C uel-homologous
Cul1	C ullin 1
CYLD	C ylindromatosis
DAP	D iaminopimelique,
dIAP2	d rosophila I nhibitor of A ptosis 2
DIF	D orsal-related I mmune F actor
Dipt	D iptéricine
DMEM	D ulbecco's M odified E agle's M edium
Doa4	D eubiquitinating enzyme 4
DREDD	D eath R elated ced-3/ N edd2-like protein
Drom	D rosomycine
DSM	D rosophila S neider M edium
dsRNA	d ouble stranded R NA
DT5S	D ominant T emperature S ensitive
DTT	D ithiothreitol
DUB	D éubiquitinases
DUBA	D eubiquitinating enzyme A
EDTA	acide E thylène D iamine T étra A cétique
EGF	E pidermal G rowth F actor
EGFR	E pidermal G rowth F actor R eceptor
EGTA	acide E thylène G lycol T étra A cétique
FADD	F as Associated via D eath D omain
FANCD2	F anconi A nemia C omplementation group D2
Fas	synonyme de TNFRSF6
Fln	F lightin

FLP	Flippase recombination enzyme
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
FRT	Flippase Recognition Target
G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) B inding Protein 1
GDP	Guanosine Di Phosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GNBP3	Gram Negative Binding Protein
GST	Glutathione S-Transferase
GTP	Guanine Tri Phosphate
HAT	Histone Acetyltransferases
HDACs	Histone Deacetylases
HECT	Homologous to E6-associated protein C-terminus
HeLa	Henrietta Lacks
HIF1	Hypoxia-Inducible Factor
HIV	Human Immunodeficient Virus
HL98	7-nitro-5-deazaflavin family member
hQPRT	human Quinolate Phosphoribosyltransferase
HS	Heat Shock
HTS	High-Throughput Screening
HTS	Hu li Tai Shao
IC₅₀	half maximal I nhibitory C oncentration
ICPO	Human Herpes Virus (HHV) Infected Cell Polypeptide 0
IκB	Inhibitor of κB
IKK	IκB Kinase
IL-1R	Interleukine-1 Receptor
Imd	Immune deficiency
IPTG	Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside
IR	Inverted Repeat
IRAK	IL-1R Associated Kinase
ITCH	Itchy Homologue E3 ubiquitin protein ligase
JAMM	JAB1/PAB1/MPN-domain-containing Metalloenzyme
JNK	Jun-terminal Kinase
JNKK	JNK Kinase
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide Lipotéichoïque
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK	MAP Kinase
Mdm2	Murine double minute-2 gene
MEKK3	MAP/ERK Kinase Kinase 3
MFT	Multiple Familial Trichoepithelioma
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal Z-Leu-Leu-Leu-al
MI-63	Multiple myeloma-63
MIU	Motif Interacting with Ubiquitin)
MJD	Machado Joseph Disease protéases
MKK6	MAP Kinase Kinase 6
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NEMO	NF-κB Essential Modulator
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NIK	NSP(nuclear-shuttle protein)-Interacting Kinase 1
NRDP1	Neuregulin Receptor Degradation Protein-1
NZF	Novel Zinc Finger
OptiMEM	(Reduced Serum Media) modification of Eagle's Minimum Essential Media
OTU	Otubain protéases
Otubain 2	Otu2, OTU-domain Ub-al binding protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PcG	Groupe Polycomb
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEST	proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
PGN	Peptidoglycane
PGRP	Peptidoglycan Recognition Receptor Protein
PLA₂	Phospholipase A₂
POH1	26S proteasome-associated pad1 homolog
POSH	Plenty Of SH3
PRKN2	Parkin 2
PRC1	Polycomb repressive complex 1
Puc	Puckered
pVHL	Von Hippel-Lindau protein
PYR-41	(4[4-{5-nitro-furan-2-ylmethylene}-3, 5-dioxo-pyrazolidin-1-yl]-benzoic acid ethyl ester)
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Rab5	Rabaptin 5
Rabex-5	Rab5-associated Exchange factor for Rab5
Rad6	Radiation sensitivity protein 6
RBX1	Ring-Box 1
Rel	Relish
RHD	Rel Homology Domain
RING	Really Interesting New Gene
RIP1	Receptor Interacting Protein
RITA	Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis
RL-TK	Renilla Luciferase-Thymidine Kinase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNA	Ribonucleic Acide
RNAi	RNA interference
ROC1	Rotamase CyP (Cytochrome P) 1 homologue de RBX1
Rpn11	proteasome Regulatory Particle Non-ATPase-like family member 11
rRNA	ARN ribosomaux
Rsp5	Reverses SPT-phenotype Protein 5
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
S2	Schneider 2
S5A/RPN10	proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like family member 10
SCF-βTrCP	Skp1-CUL1-F-box ligase containing the F-box protein βTrCP
SH3	Sperm Hammerhead 3
siRNA	short interfering RNA
Skp	S-phase kinase-associated protein
Slimb	Supernumerary limbs

Smad7	Similar to m others against d ecapentaplegic homolog 7
STAM	S ignal T ransducing A dapter M olecule
SUMO	S mall U biquitin-like M odifier
SVF	S erum de V eau F étal
TAB	TAK1-B inding protein
TAK1	TGF-β A ctivated K inase 1
TGF-β	T ransformig G rowt F actor β
TLR	T oll L ike R eceptor
TNFaip3	T umor N ecrosis F actor α induced protein 3
TNFα	T umor N ecrosis F actor α
TNFR	T umor N ecrosis F actor R eceptor
TNFRSF6	T umor N ecrosis F actor R eceptor S uperfamily member 6
TrxG	G roupe T rithorax
TRADD	TNFR-Associated via D eath D omain
TRAF	TNF R eceptor A ssociated F actor
TRIKA	TRAF6-regulated IKK A ctivator
UAS	U pstream A ctivating S equence
Ub	U biquitine
Ub-al	U b- a ldéhyde
Ub-AMC	U b- 7-A mino- 4-M éthylcouramine
UBA	U biquitin B inding A daptator
Ubc	U biquitin c onjugating enzyme
UBD	U biquitin B inding D omain
Ubl	U biquitin-like
Ubp	U biquitin specific p rotease chez la levure
Ub-Rho110-G	U biquitine R hodamine 110-G lycine
Ub-VME	U b- V inyl m éthyle E ster
UCH	U biquitin C -terminal H ydrolases
UCH-L5	U biquitin C arboxyl-terminal H ydrolase isozyme L5
Uev1a	U biquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
USP	U biquitin S pecific P roteases
Vif	V irion I nfectivity F actor
Vpu	V iral protein U
YFP	Y ellow F luorescent P rotein
ZnF_A20	A20 Z inc F inger
ZnF-UBP	Z inc F inger U biquitin B inding D omain
WT	W ild- T ype

PARTIE A

INTRODUCTION

I. L'ubiquitination dans la signalisation cellulaire

I.1 Ubiquitination : réaction et enzymes

Les études de ces dernières années montrent que l'ubiquitination est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription de gènes, la réparation et la réplication de l'ADN, l'endocytose de récepteurs, le trafic et la localisation intracellulaire (Haglund and Dikic, 2005; Herrmann et al., 2007).

Cette réaction apparaît ainsi comme cruciale dans de plus en plus de mécanismes cellulaires. Elle consiste en la formation d'une liaison covalente entre l'ubiquitine (Ub), petite protéine de 8.5kD très conservée, et un résidu lysine (K) d'une protéine cible (figure 1). L'ubiquitination se produit en trois étapes (Pickart and Eddins, 2004) impliquant les « ubiquitin activating enzymes » (E1), les « ubiquitin conjugating enzymes » (E2) et les « ubiquitin protein ligases enzymes » (E3) (figure 2). E1 se lie à l'ubiquitine par l'intermédiaire d'une liaison thioester, cette réaction est ATP dépendante et induit un changement conformationnel du côté C-terminal de l'ubiquitine. Ce changement de conformation active l'ubiquitine. Cette molécule est ensuite transférée sur une cystéine du site actif d'une E2, par l'intermédiaire d'une liaison thioester. C'est E3 qui définit finalement la spécificité de l'attachement de la molécule d'ubiquitine à une protéine cible. E3 lie, de façon covalente, l'ubiquitine à un substrat spécifique en formant une liaison isopeptidique (figure 3) entre le dernier acide aminé de l'ubiquitine, la glycine 76, et un résidu lysine de la protéine cible (Herrmann et al., 2007). On distingue deux sortes d'E3 ligases suivant leur interaction avec la protéine ciblée. Le premier groupe comprend les E3 ligases contenant un domaine RING (really interesting new gene) ou un domaine RING-like (très proche au niveau structurel d'un domaine RING). Ces enzymes interagissent simultanément avec leur substrat et l'enzyme E2 liée à l'ubiquitine, et positionnent la liaison thioester ubiquitine-E2 à proximité de la lysine nucléophile du substrat. Elles opèrent également quelques changements conformationnels facilitant le transfert de l'ubiquitine. Le second groupe de ligases comprend les E3 ligases contenant un domaine HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus). Ces enzymes transfèrent l'ubiquitine des E2 sur une cystéine active de leur domaine HECT et, dans un second temps, l'ubiquitine est liée à la lysine du substrat. La conjugaison d'ubiquitine sur certaines protéines nécessite une enzyme supplémentaire E4 (Hoppe, 2005) tandis que l'ubiquitination de certaines protéines contenant un domaine de liaison à l'ubiquitine peut se faire sans l'intervention d'une E3 (Hoeller et al., 2007).

L'ubiquitination doit à la fois son efficacité et sa spécificité à la structure très hiérarchique, en termes de quantité, du système d'ubiquitination. En effet, il existe une seule molécule d'ubiquitine, trois enzymes E1 alors qu'on compte une quarantaine de E2 et entre 500 et 600 ubiquitine ligases (un nombre comparable au nombre total prédit de kinases (Wilkinson et al., 2005)). L'ubiquitination est une réaction réversible : l'hydrolyse de la liaison ubiquitine - protéine cible est catalysée par les déubiquitinasés (DUBs) qui font l'objet du paragraphe I.3.

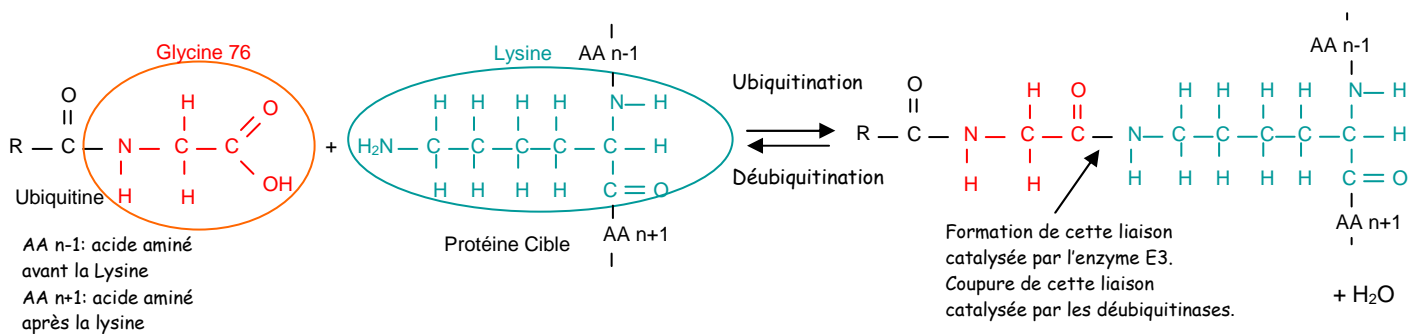


Figure 1. Les réactions d'ubiquitination et d'hydrolyse de l'ubiquitine. L'ubiquitination implique la formation d'une liaison isopeptidique entre le dernier acide aminé de l'ubiquitine (la glycine 76) et un résidu lysine de la protéine cible. La déubiquitination consiste en l'hydrolyse de cette liaison.

I.2. Destin des protéines ciblées

L'ubiquitine peut être liée à sa cible de multiples façons. Dans le cas le plus simple, une seule molécule d'ubiquitine est attachée, c'est la mono-ubiquitination, plusieurs résidus lysine peuvent porter une seule ubiquitine, c'est une multi-ubiquitination. Par ailleurs, chacun des sept résidus lysine de l'ubiquitine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) peut être impliqué dans la formation de chaînes d'ubiquitine, il s'agit alors de poly-ubiquitination.

Le sort d'une protéine attachée à des molécules d'ubiquitine dépend en partie de la longueur et de la configuration des chaînes d'ubiquitine (Varadan et al., 2004 ; figure 2). Les polymères les mieux caractérisés à ce jour sont les chaînes de type K48 et K63 dans lesquelles une ubiquitine est liée à la lysine 48 ou bien la lysine 63 de l'ubiquitine suivante. Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont reçu le prix Nobel de chimie en 2004 pour avoir découvert que les chaînes K48 induisent la dégradation de la protéine ciblée, par le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1998). La dégradation a ainsi été historiquement la première fonction attribuée à l'ubiquitination ; ce procédé joue un rôle important dans l'élimination des protéines endommagées et dans la régulation du temps de vie de protéines impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, tels que la régulation du cycle

cellulaire ainsi que de nombreuses voies de transduction du signal. On sait maintenant que l'ubiquitination des protéines peut aussi conduire à des procédés indépendants de la protéolyse. Par exemple, l'ajout d'une ubiquitine sur un ou plusieurs résidus lysine d'une protéine cible peut modifier sa localisation cellulaire, sa conformation, son activité ou ses interactions avec d'autres protéines (Haglund and Dikic, 2005). L'attachement de chaînes K63 a également un rôle dans l'activation de protéines, elles mêmes impliquées dans différents processus cellulaires comme la réparation de l'ADN (Hannah and Zhou, 2009), l'endocytose (Mosesson et al., 2008) ou la signalisation intracellulaire (Chen, 2005). Les chaînes K63 jouent un rôle particulièrement important dans la régulation de l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation NF- κ B (Nuclear factor kappa B) (Sun, 2008 et paragraphe II). Enfin l'ajout de chaînes K29 semble conduire les protéines ciblées vers une dégradation lysosomale (Chastagner et al., 2006).

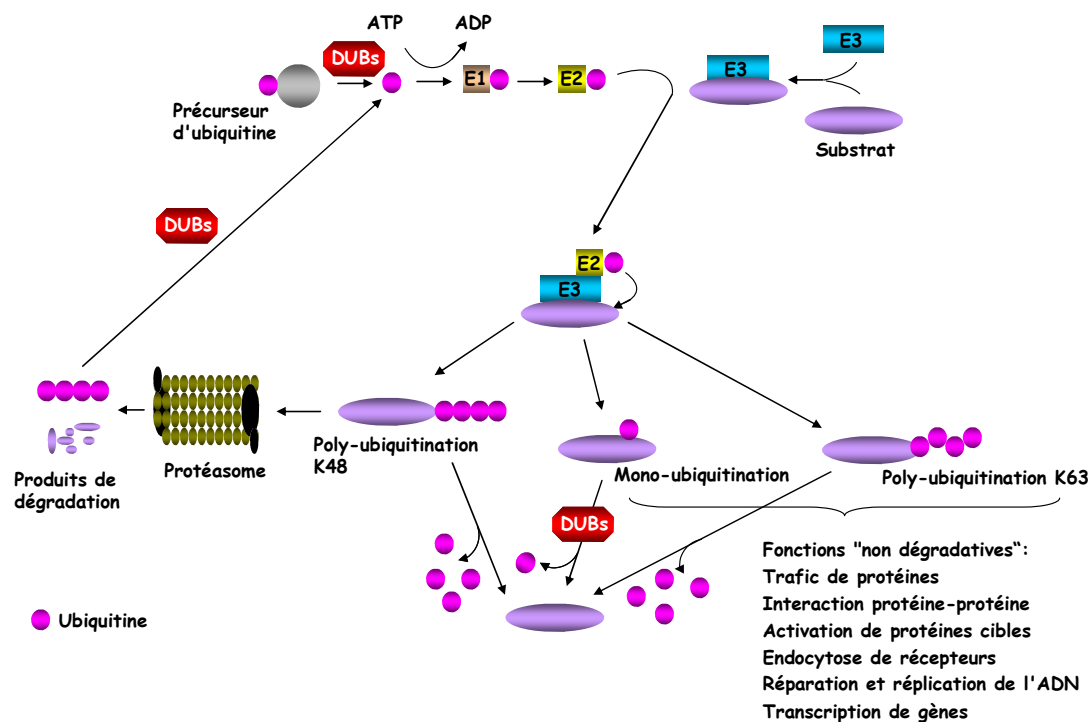


Figure 2. Les différentes étapes de l'ubiquitination. L'ubiquitination est catalysée par trois types d'enzymes : les « ubiquitin activating enzymes » E1, les « ubiquitin conjugating enzymes » E2 et les « ubiquitin ligases » E3. E1 recrute, active et transfère l'ubiquitine à E2 qui la transporte jusqu'à une ligase E3 chargée de l'attacher sur une protéine cible spécifique. Il existe un nombre important d'enzymes E2 et E3, ceci permet de former de nombreuses chaînes d'ubiquitine et de cibler un large éventail de protéines. Les lysines (K) les plus couramment impliquées dans la formation de chaînes d'ubiquitine sont K48 et K63 (poly-ubiquitination). Les chaînes K48 induisent la dégradation de la protéine cible par le protéasome. Les chaînes K63 ainsi que l'attachement d'une seule ubiquitine (mono-ubiquitination) participent à des fonctions « non dégradatives » : trafic intracellulaire, interaction protéine-protéine, activation de facteurs de la signalisation, endocytose, réparation et réplication de l'ADN, transcription de gènes... L'ubiquitination est une réaction réversible. Les déubiquitinases (DUBs) clivent les chaînes d'ubiquitine de leur substrat, participant ainsi au recyclage de l'ubiquitine mais également à la régulation de l'activité d'un grand nombre de protéines impliquées dans diverses voies de signalisation. Les DUBs sont aussi requises pour générer l'ubiquitine à partir de son précurseur. *D'après Sun, 2008.*

I.3. Les déubiquitinases

Partout où il y a ubiquitination, il y a aussi déubiquitination. Les enzymes qui catalysent cette réaction ont été moins étudiées que les ubiquitine ligases et promettent pourtant d'avoir des fonctions tout aussi décisives dans la signalisation cellulaire (Nijman et al., 2005b).

Les déubiquitinases (DUBs) constituent un important groupe d'enzymes qui clivent spécifiquement les molécules associées à l'ubiquitine après le groupe carbonyle (C=O) du dernier résidu de l'ubiquitine (Amerik and Hochstrasser, 2004 ; figure 1). Les DUBs assurent de nombreuses fonctions de base nécessaires au bon déroulement de la vie cellulaire. Tout d'abord, ces enzymes assurent le recyclage de l'ubiquitine. En effet, les chaînes d'ubiquitine associées aux protéines destinées à la dégradation sont retirées de leurs substrats avant la protéolyse (Pickart, 2001). La déubiquitination des substrats ciblés vers le protéasome est également nécessaire pour conserver un taux de protéolyse normal en aidant à maintenir un « pool » d'ubiquitine libre dans la cellule. La déubiquitination des protéines associées à des polymères K48 courts (moins de quatre ubiquitine), ciblées vers le protéasome, permettrait de les sauver de la dégradation (Lam et al., 1997). Par ailleurs, comme l'ubiquitine est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif comprenant une extension C-terminale, les DUBs sont nécessaires pour hydrolyser la liaison peptidique qui suit la glycine 76 rendant ainsi l'ubiquitine « activable » (figure 2). Les molécules d'ubiquitine libres sont sensibles aux attaques de petits éléments nucléophiles intracellulaires. Certains, comme les polyamines ou la glutathione, sont très abondants, les DUBs sont donc essentielles pour empêcher la titration de l'ubiquitine par ces composants. Enfin la déubiquitination permet de maintenir la sous unité 26S du protéasome libre de polymères d'ubiquitine non attachés à un substrat qui pourraient entrer en compétition, au niveau des sites de liaisons à l'ubiquitine (UBDs pour ubiquitin binding domain) du protéasome, avec les substrats ubiquitinés et empêcher leur dégradation. Les DUBs peuvent aussi agir, de façon plus spécifique, sur des protéines mono- ou poly-ubiquitinées et participer ainsi au contrôle de leur activation par l'ubiquitine.

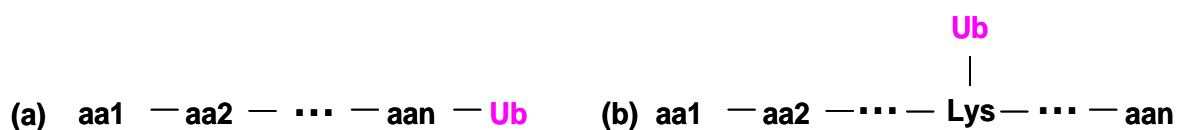


Figure 3. Liaison peptidique et isopeptidique. Représentation schématique d'une liaison peptidique (linéaire) d'ubiquitine en Cter (a) et d'une liaison isopeptidique d'ubiquitine sur une lysine (b). aa : acide aminé

Il a été montré que certaines DUBs ont des rôles dans le développement (Tran et al., 2008), la formation de tumeur (Courtois and Gilmore, 2006), la maladie de Parkinson (Oliveira et al., 2005) ou la régulation de voies de signalisation, dont les voies NF- κ B (Sun, 2008).

I.3.1. Les différentes classes de DUBs

Les DUBs appartiennent à la grande famille des protéases qu'on estime à 561 dans le génome humain (Puente and Lopez-Otin, 2004). Les protéases sont classées en cinq familles suivant leur mécanisme catalytique : protéase aspartique, métallo-protéase, protéase à sérine, à thréonine ou à cystéine. Quelques DUBs sont des métallo-protéases mais la plupart sont des protéases à cystéine.

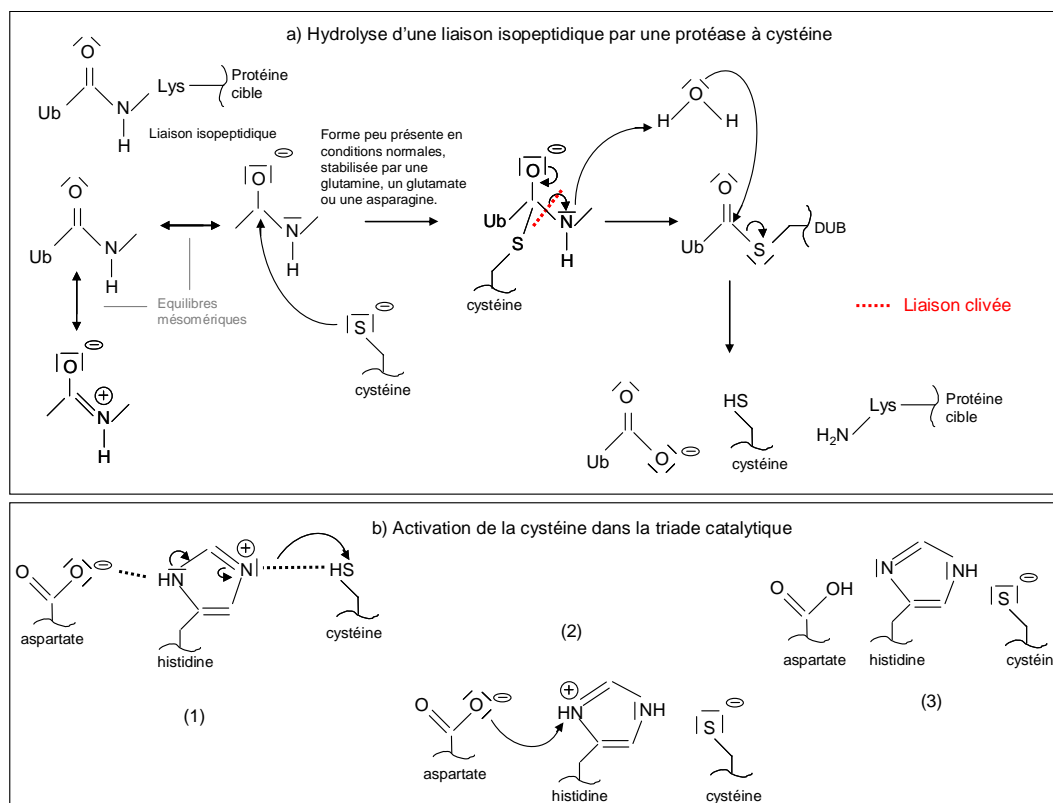


Figure 4. Mécanismes chimiques de l'hydrolyse d'une liaison isopeptidique par une protéase à cystéine (a) et de l'activation de la cystéine catalytique (b).

L'activité enzymatique des protéases à cystéine repose sur le groupe thiol (S-H) de la cystéine du site actif. La déprotonation de la cystéine est assistée par une histidine adjacente polarisée par un résidu aspartate. Ces trois résidus constituent la triade catalytique (Bazan and Fletterick, 1988). Durant la catalyse, la cystéine produit une attaque nucléophile sur le groupe

carbonyle situé dans la liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et la lysine du substrat. L'intermédiaire, qui contient un oxyanion, est stabilisé dans la cavité oxyanion formée par une glutamine, un glutamate ou un résidu asparagine et la chaîne principale de la cystéine catalytique. Le résultat de la réaction est le détachement de la protéine ciblée. Il y a alors formation d'un intermédiaire covalent entre l'ubiquitine et la DUB. Cet intermédiaire réagit avec une molécule d'eau pour redonner la DUB et l'ubiquitine ainsi recyclées (figure 4).

Les DUBs à cystéine sont classées en quatre sous-classes selon leur séquence et la structure de leur domaine catalytique : les ubiquitin-specific protéases (USP), les ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH), les otubain protéases (OTU) et les Machado Joseph disease protéases (MJD). Toutes les DUBs qui sont des métallo-protéases possèdent un domaine JAMM (JAB1/PAB1/MPN-domain-containing metalloenzyme) qui réalise l'hydrolyse en présence de l'ion Zn^{2+} . Les structures secondaires des différentes sous-classes de DUBs présentent une grande diversité (figure 5).

Nijman et ses collaborateurs ont réalisé une étude *in silico* afin de déterminer le nombre de DUBs codées par le génome humain (Nijman et al., 2005b). Ils ont trouvé 95 DUBs potentielles parmi lesquelles 4 UCHs, 58 USPs, 14 OTUs, 5 MJDs et 14 JAMMs.

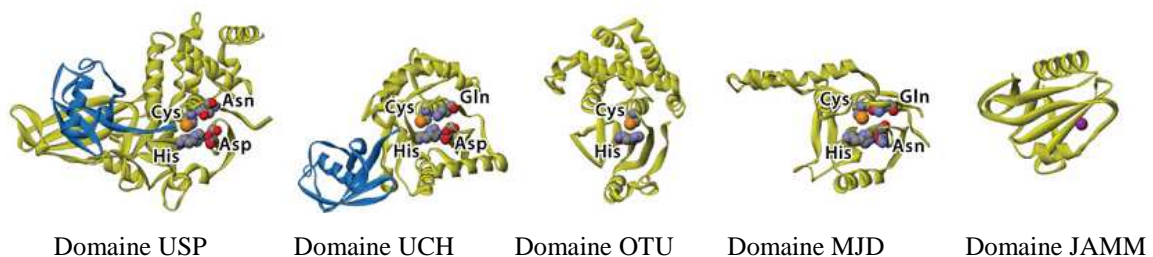


Figure 5. Représentation de la structure des domaines catalytiques des cinq classes de DUBs. Les cinq classes de DUBs présentent une grande diversité dans leur structure secondaire. Les centres catalytiques sont représentés par des sphères de Van der Waals (carbone gris, azote bleu, oxygène rouge, soufre orange, zinc violet). Le domaine OTU d'Otu2 (otubain 2) ne dispose par de l'acide aspartique présent dans la triade catalytique des USPs et des UCHs ni de la glutamine/glutamate/asparagine servant à stabiliser la cavité oxyanion. D'après Nijman et al., 2005b.

I.3.1. a) Les UCHs

Les enzymes de la famille des UCHs ont d'abord été décrites pour cliver des petits peptides ubiquitinés (entre 20 et 30 acides aminés) (Amerik and Hochstrasser, 2004). Cette spécificité est probablement imposée par une boucle désordonnée formée par une vingtaine d'acides aminés occultant partiellement le site catalytique de ces enzymes (Johnston et al., 1997). Cependant des études structurales et biochimiques montrent que certains substrats de grande taille peuvent aussi être pris en charge par les UCHs (Misaghi et al., 2005). Les UCHs

participeraient principalement au recyclage de l'ubiquitine libre. Ces enzymes détacheraient les ubiquitines associées de façon inappropriée à des nucléophiles intracellulaires ou participeraient à la maturation de l'ubiquitine à partir de ses précurseurs. Certaines études attribuent également aux UCHs un rôle dans des processus plus spécifiques dépendant de l'ubiquitine. C'est le cas d'UCH-L1, une UCH exprimée spécifiquement dans les neurones (Jackson and Thompson, 1981) et qui fonctionne également comme une ligase (Liu et al., 2002). Son implication a été mise en évidence dans plusieurs maladies neurodégénératives (Gong and Leznik, 2007). La mutation de l'isoleucine 93 d'UCH-L1 en méthionine (I93M) est impliquée de la forme autosomale dominante de la maladie de Parkinson (Setsuie et al., 2007). Des souris exprimant UCH-L1^{I93M} perdent leur neurones dopaminergiques avec l'âge ce qui correspond à un signe de la maladie de Parkinson (Setsuie et al., 2007). Au contraire, la mutation de la sérine 18 d'UCH-L1 en thréonine (S18Y), fréquente dans les populations japonaises et chinoises (~50% de la population (Liu et al., 2002)), réduit les probabilités de contracter cette pathologie (Carmine Belin et al., 2007). Les deux mutations impliquent une diminution de l'activité ligase d'UCH-L1 mais tandis que la mutation I93M diminue son activité hydrolase, la mutation S18Y l'augmente ; ces changements dans l'activité catalytique d'UCH-L1 pourraient être responsables des différentes implications de cette UCH dans la maladie de Parkinson (Setsuie and Wada, 2007).

I.3.1. b) Les USPs

Les USPs constituent la majeure partie des DUBs. Au cours de l'Evolution, le nombre d'USPs s'est accru de façon conjointe à celui des ligases E3. Ceci suggère qu'une relation intime entre les deux types d'enzymes a entraîné leur évolution commune (Semple, 2003). Le domaine catalytique des USPs est caractérisé par deux motifs courts et bien conservés appelés « boîte histidine » et « boîte cystéine » contenant les résidus indispensables à la protéolyse (Nijman et al., 2005b). La taille du site catalytique varie entre 300 et 800 acides aminés en fonction de la longueur des séquences contenues entre les deux motifs. Ces séquences intermédiaires pourraient jouer un rôle de régulateur de l'activité des USPs. La résolution des structures cristallographiques d'USP7 (Hu et al., 2002) et UCH-L3 (Johnston et al., 1997) a montré que bien qu'ayant très peu d'homologies dans leurs séquences, les sites catalytiques des UCHs et des USPs sont parfaitement superposables tout comme leur triade catalytique (Love et al., 2007 ; figure 6). Un second point remarquable est que les sites actifs de ces deux types d'enzyme, dans leur forme libre (sans ubiquitine), ne sont pas dans une conformation

catalytique active. Ils doivent subir un réarrangement, en présence d'ubiquitine, permettant le bon positionnement des résidus actifs. L'avantage de ce changement de conformation est que ces enzymes sont protéolytiquement inertes face à la plupart des protéines cellulaires et spécifiques de l'ubiquitine ou de certaines protéines ubiquitine-like (Ubl) qui induisent ce changement conformationnel.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux USPs car elles constituent la plus grande partie des DUBs et qu'un grand nombre de ces enzymes n'a encore ni fonction ni substrat connus à ce jour. Il existe des homologues bien conservés chez la drosophile, organisme qui permet de coupler un crible fonctionnel de cette famille de gènes à des études *in vivo*.

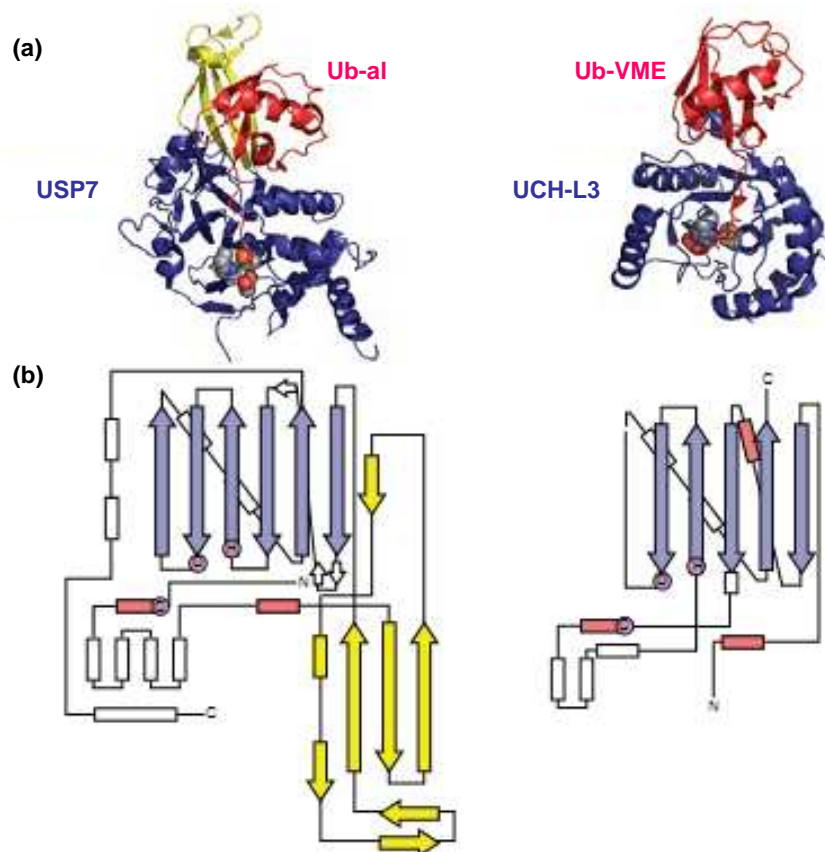


Figure 6. Représentation de la structure des sites catalytiques d'USP7 et UCH-L3.

(a) Représentation en diagramme en ruban de la topologie des sites catalytiques d'USP7 et UCH-L3 cristallisés en présence d'un inhibiteur (Ub-aldéhyde (Ub-al) et Ub-vinylméthyle ester (Ub-VME) respectivement). Les DUBs sont représentés en bleu, les résidus du site actif en sphère de Van der Waals. Les inhibiteurs sont représentés en rouge. (b) Topologie des structures des protéines représentées en hélice α (rectangle) et feuillet β (flèche). Les éléments de la structure secondaire conservés entre les deux protéines sont représentés en rouge (hélices) et bleu (feuillet). Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées par un N et un C, respectivement, les résidus catalytiques sont représentés sous forme de cercles violets. D'après Love et al., 2007.

I.3.1. c) Les OTUs

Les protéines de type OTU tirent leur nom du premier gène *otu* (*ovarian tumor*) découvert chez la drosophile et impliqué dans le développement des ovaires (Goodrich et al., 2004). Les gènes OTU mammifères ont été identifiés ensuite par homologie avec la séquence du gène *otu* (Makarova et al., 2000). La géométrie du site actif des OTUs est différente de celle des USPs et des UCHs (Nanao et al., 2004). En effet, bien que la cystéine et l'histidine catalytiques soient structurellement conservées avec les autres DUBs, le troisième membre de la triade catalytique est une asparagine (Asn). Ceci a été observé dans la protéine Otubain 2 (OTU-domain Ub-al binding protein, Otu2) (Nanao et al., 2004 ; figure 7) dont l'activité catalytique est perdue en cas de mutation de l'Asn226. Ce résidu est conservé chez tous les membres de la famille des OTUs ce qui témoigne de son importance. Par ailleurs, la cavité oxyanion, stabilisée chez les UCHs et les USPs par une asparagine ou une glutamine, est ici stabilisée par un résidu aspartate. Ce moyen de stabilisation est le premier du type observé dans une protéase à cystéine ; il est, par contre, courant dans les protéases à sérine (Blevins and Tulinsky, 1985). Contrairement aux USPs et UCHs dont la structure secondaire se réorganise en présence d'ubiquitine, la géométrie du site actif d'Otu2 se présente en conformation active même en l'absence d'ubiquitine (Nanao et al., 2004). Cependant, une boucle, différente de celle des UCHs, permettrait de limiter l'accès au site actif d'Otu2 et pourrait représenter un nouveau mécanisme d'auto-inhibition (Nanao et al., 2004). Plusieurs OTUs sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire, c'est le cas d'A20, Cezanne et DUBA. A20 et Cezanne régulent négativement la voie NF- κ B (Enesa et al., 2008; Wertz et al., 2004 et voir paragraphe II). DUBA clive les chaînes K63 de la ligase TRAF3 (Tumor necrosis factor associated receptor 3) et réprime ainsi la synthèse d'interferon de type 1 (Kayagaki et al., 2007).

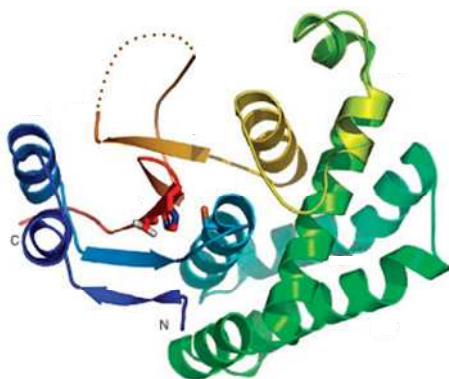


Figure 7. Structure d'Otubain 2. Les couleurs vont du bleu (partie N-terminale) au rouge (partie C-terminale). La triade catalytique (Cys51 ; His224 ; Asn226) est représentée sous forme de bâtonnets. D'après Nanao et al., 2004.

I.3.1. d) Les JAMMs

Le domaine JAMM existe dans les trois grandes classes du vivant : les bactéries, les archées et les eucaryotes. Cependant, les bactéries ne disposent pas d'activité protéase d'ubiquitine et un système analogue de conjugaison ubiquitine-like n'a pas été identifié chez les procaryotes. Ceci suggère que les domaines JAMMs ont adopté de nouvelles fonctions protéases durant l'évolution et indique que probablement, certaines protéases JAMMs humaines ont un rôle dans d'autres processus que ceux impliquant l'ubiquitine. Un alignement de séquence entre les 14 protéines humaines contenant un domaine JAMM montre que sept d'entre elles ont au moins un acide aminé muté parmi les acides aminés conservés nécessaires à la stabilisation de l'ion Zn^{2+} ; ceci indique que ces protéines ne sont probablement pas fonctionnelles. Ce n'est pas le cas de la protéine JAMM, POH1, dont l'homologue Rpn11, chez la levure, a été trouvé en complexe avec la sous-unité 19S du protéasome (Verma et al., 2002). Cette position stratégique lui permet de détacher les polymères d'ubiquitine K48 des protéines destinées à la dégradation. La structure cristallographique des JAMMs n'a rien de commun avec celle des protéases à cystéine car les métallo-protéases mettent en jeu un mécanisme d'hydrolyse différent de celui des protéases à cystéine (figure 5) (Nijman et al., 2005b).

I.3.1. e) Les MJDs

La recherche bioinformatique d'autres classes de DUBs a identifié Ataxin-3 ainsi que quatre Ataxin-3-like protéines (Nijman et al., 2005b). Des expériences *in vitro* ont montré qu'Ataxin-3 sauvage mais pas le mutant pour la cystéine catalytique, était capable de débubiquitiner un substrat synthétique (Burnett et al., 2003). Les similarités de séquence entre le domaine catalytique d'Ataxin-3 et celui des autres DUBs est faible mais des analyses RMN montrent que l'arrangement globale de la triade catalytique est conservé (Nicastro et al., 2005 ; figure 5). L'instabilité d'une répétition des nucléotides CAG (codon de la glutamine) dans le gène codant Ataxin-3 conduit à une maladie neurologique héréditaire connue sous le nom de Machado-Joseph Disease. Comme dans d'autres gènes à répétition de glutamines impliqués dans des maladies neurodégénératives, l'expansion de la répétition de CAG du gène Ataxin-3 induit un mauvais repliement de la protéine conduisant à la formation d'agrégats toxiques pour la cellule (Kawaguchi et al., 1994). La fonction normale d'Ataxin-3 consiste à effectuer un contrôle qualité « ubiquitine dépendant » des protéines (Nicastro et al.,

2005). Il a été récemment montré qu'Ataxin-3 est elle-même ubiquitinée (Todi et al., 2009) et que son ubiquitination pourraient influencer son activité de contrôle qualité. Les MJDs sont probablement apparues tard dans l'Evolution puisqu'il n'existe pas d'homologues chez la levure. A ce jour, on dispose de très peu d'information sur leurs fonctions.

I.3.2. Régulation et spécificité des DUBs

Mises à part les UCHs et les USPs dont la conformation du site catalytique devient active uniquement en présence d'ubiquitine, la plupart des DUBs sont actives dès leur synthèse. Pour éviter des réactions non spécifiques, plusieurs études suggèrent que l'activité de ces protéases serait régulée par divers mécanismes. Par exemple, la protéine JAMM, POH1, doit être incorporée dans une structure protéique plus grande, la sous-unité 19S du protéasome, pour être active (Cope et al., 2002). Il existe également des co-facteurs qui modulent l'activité des DUBs (figure 8b). C'est le cas de Bre5, un co-facteur de la protéine de levure Ubp3 qui est nécessaire à l'activité protéase d'Ubp3 (Cohen et al., 2003) (la nomenclature des « ubiquitin specific proteases » chez la levure est Ubp). L'homologue humain de Bre5, G3BP1, inhibe l'activité d'USP10 *in vitro* (Soncini et al., 2001) indiquant que les co-facteurs peuvent ou bien augmenter ou bien réprimer l'activité des DUBs.

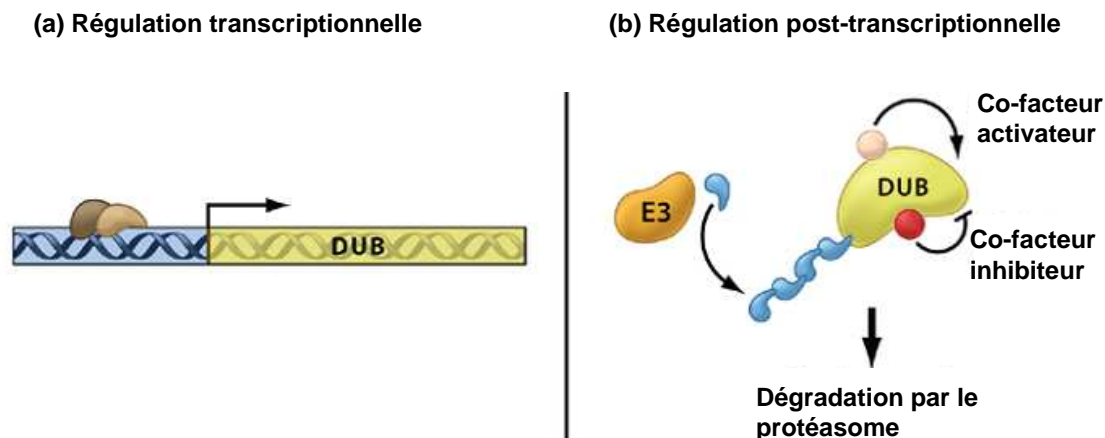


Figure 8. Les mécanismes de régulation des DUBs. La régulation des DUBs peut se faire au niveau transcriptionnel (a) et post-transcriptionnel grâce à des co-facteurs (b). *D'après Nijman et al., 2005b.*

De plus, certaines DUBs sont également régulées au niveau transcriptionnel (figure 8a), parfois suivant le cycle cellulaire comme c'est le cas d'USP1 qui est induit durant la phase S. USP1 déubiquitine son substrat FANCD2 (Fanconi anemia (FA) protein) dont la mono-ubiquitination, qui est requise pour le bon déroulement de la phase S, doit être éliminée

à la fin de cette phase pour permettre la poursuite du cycle cellulaire (Nijman et al., 2005a). On a également observé que la phosphorylation de l'USP, CYLD, suite à une stimulation du récepteur TNFR (tumor necrosis factor receptor) par la cytokine TNF α , était nécessaire pour obtenir l'accumulation de son substrat TRAF2 ubiquitiné K63 (Reiley et al., 2005). La phosphorylation permet, dans le cas de CYLD, d'inhiber son activité hydrolase.

Les recherches concernant les DUBs ont montré que tout comme les E3 ligases, ces enzymes agissent chacune sur un nombre limité de substrats et de voies de signalisation. Ces informations suggèrent que ces enzymes sont très spécifiques et on explique leur spécificité par plusieurs facteurs. D'une part, en plus de leur domaine catalytique, les DUBs contiennent des domaines d'interaction protéiques qui leur permettent de cibler des substrats particuliers (Nijman et al., 2005b). D'autre part, certaines DUBs présentent une préférence pour un type de chaîne, K48 ou K63 (Nijman et al., 2005b; Wertz et al., 2004). C'est le cas, d'UCH-L5 qui clive différents types de chaînes d'ubiquitine impliquées dans des liaisons isopeptidiques mais n'hydrolyse pas les liaisons peptidiques (linéaires) de dimères d'ubiquitine *in vitro* (Yao et al., 2006). De même, la DUB de levure Ubp2 clive préférentiellement les chaînes K63 *in vitro* (Kee et al., 2005). La reconnaissance du substrat se fait donc lorsqu'il y a à la fois reconnaissance de la protéine ciblée et reconnaissance des chaînes d'ubiquitine auxquelles elle est liée. Enfin, la variation du mode d'expression et de la localisation cellulaire des DUBs favorise leur diversité fonctionnelle *in vivo*.

De façon remarquable, le nombre de ligases dépasse largement celui des DUBs. Ceci est différent des tyrosines kinases et phosphatases dont les nombres sont à peu près égaux. La première explication possible serait que toutes les DUBs n'ont pas encore été identifiées ou que tous leurs co-facteurs, qui pourraient augmenter leur spécificité, n'aient pas été trouvés. En effet, par comparaison, les sérine/thréonine kinases surpassent en nombre les sérine/thréonine phosphatases mais de nombreux co-facteurs fournissent une plus grande spécificité à ces phosphatases. Il est aussi possible que les DUBs soient moins spécifiques et régulent en moyenne 10 fois plus de cibles que les ligases. Une autre hypothèse serait que seulement une partie des protéines ubiquitinées sont régulées par une déubiquitination spécifique. En effet, on peut imaginer que la plupart des protéines ciblées vers la dégradation n'ont pas besoin d'être déubiquitinées spécifiquement avant leur arrivée au protéasome et peut-être que les protéines nécessitant une régulation très fine, comme p53 (voir I.4.4.), sont rares. Cependant rien ne permet d'exclure qu'un équilibre très fin entre ubiquitination et

déubiquitination serait nécessaire à la majorité des protéines aussi bien pour la régulation de leur activité que de leur stabilité.

I.3.3. Interaction DUBs/Ligases

Comme la plupart des interactions enzyme-substrat, les interactions DUB / protéine cible sont faibles et transitoires, rendant l'identification des substrats difficile. On peut plus facilement détecter des DUBs en complexe avec des ligases qui s'auto ubiquitinent. Certaines E3 ligases sont en effet ubiquitinées de façon constitutive par leur domaine RING et induisent leur propre dégradation. Par exemple, la ligase NRDP1 stimule son propre turn-over en plus de celui de ses nombreuses cibles. La DUB USP8 s'associe avec NRDP1, la déubiquitine et la stabilise. Ceci suggère que l'interaction d'une DUB avec une ligase peut simplement servir à contrer l'auto-ubiquitination de la ligase et moduler ainsi sa stabilité (Wu et al., 2004 ; figure 9a). De façon intéressante, USP7 stabilise de cette manière la E3 ligase ICPO du virus de l'herpes indiquant que les virus sont capables de détourner les DUBs de la cellule infectée pour stabiliser leurs propres protéines (Kattenhorn et al., 2005).

Les interactions DUB / ligase peuvent aussi autoriser une régulation très fine de la stabilité ou de l'activation d'un substrat. La ligase pVHL (von Hippel-Lindau protein), suppresseur de tumeur, régule la stabilité des facteurs de transcription HIF1 (Hypoxia-inducible factor) impliqués dans l'angiogénèse. USP33 interagit avec cette E3 et module la stabilité de HIF1 par déubiquitination (Li et al., 2005). Comme pVHL régule également la stabilité d'USP33, l'équilibre entre l'ubiquitination de HIF1 par pVHL et sa déubiquitination par USP33 permet un contrôle très précis de la stabilité de ce facteur de transcription (figure 9b).

Parfois une ligase peut également servir d'intermédiaire à une DUB et lui permettre de reconnaître sa cible. C'est le cas d'Ubp2 chez la levure qui a besoin de la ligase Rsp5 pour hydrolyser spécifiquement son substrat sans pour autant interagir directement avec lui (Kee et al., 2005 ; figure 9c).

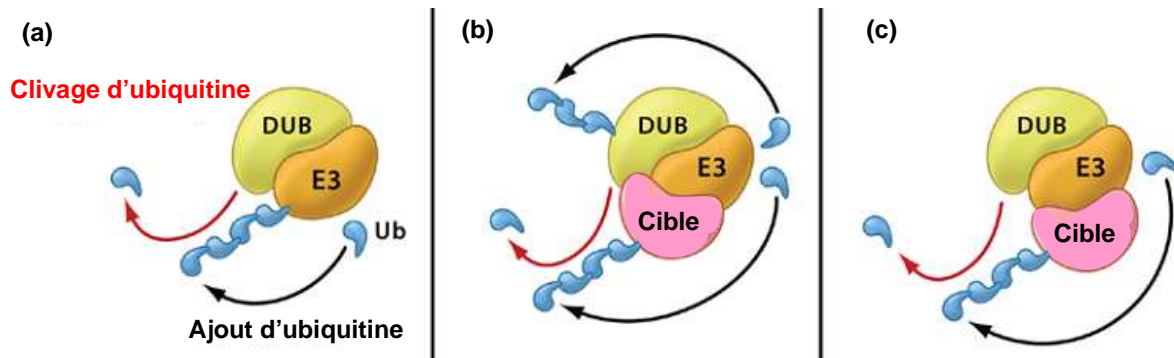


Figure 9. Les différentes interactions DUBs/Ligases. Les DUBs sont souvent trouvées en interaction avec des ligases E3. Ces interactions, qui interviennent entre NRDP1 et USP8 par exemple, servent à contrer l'auto-ubiquitination des E3 (a) ou permettent aux E3 de réguler simultanément leur cible et la DUB agissant sur la même cible, comme dans le cas de pVLH et USP33 (b). Par ailleurs, les interactions DUB/E3 permettent aussi, comme dans le cas d'Ubp2 et Rsp5, de conférer une spécificité de cible à la DUB (c). Les activités Ub-ligase et Ub-protéase sont représentées respectivement par des flèches noires et rouges. *D'après Nijman et al., 2005b.*

I.4. Exemples de processus biologiques régulés par ubiquitination

I.4.1. L'Ubiquitine dans les interactions protéines-protéines

L'ubiquitination influence les interactions de la protéine ciblée avec ses partenaires ; ceci représente l'une des clés pour comprendre comment l'ubiquitination intervient dans la signalisation cellulaire. On dénombre plus de 15 domaines de liaison à l'ubiquitine appelés UBD pour « ubiquitin binding domain » (Hurley et al., 2006 et Annexe 5). Les protéines contenant un ou plusieurs UBDs peuvent ainsi interagir de façon non-covalente avec des protéines mono- ou poly-ubiquitinées. Comme l'ubiquitination était au départ associée à la dégradation, le premier UBD identifié fut une sous-unité du protéasome S5A/RPN10 (Young et al., 1998). Bien que les UBDs présentent des structures différentes, ils interagissent pour la plupart avec l'isoleucine (Ile) 44 de l'ubiquitine et les surfaces d'interaction varient légèrement suivant les UBDs. On a récemment découvert un nouvel UBD, ZnF_A20 (A20 Zinc finger), qui interagit avec l'acide aspartique (Asp) 58 de l'ubiquitine (Penengo et al., 2006). L'affinité de l'interaction est généralement faible ($K_d > 50 \mu\text{M}$) ; elle est plus forte pour les chaînes d'ubiquitine que pour les mono-Ub et il existe une large gamme d'affinité suivant les différents UBDs (de 30nM à 500 μM). Dans les cellules, l'affinité et la spécificité peuvent être augmentées en multipliant le nombre d'UBDs en interaction avec la protéine ubiquitinée ou lorsque plusieurs protéines contenant des UBDs forment un complexe (Haglund and Dikic, 2005). Les différences structurelles entre les chaînes d'ubiquitine peuvent aussi conférer une spécificité aux interactions *in vivo* entre protéines ubiquitinées et protéines contenant des UBDs (Kanayama et al., 2004). Grace aux interactions dynamiques entre les protéines

ubiquitinées et les protéines contenant des UBDs, un réseau « ubiquitine » se forme dans la cellule. Ce réseau permet le rapprochement de protéines qui peuvent alors catalyser des réactions pour participer à la transduction d'un signal. Ce concept a été largement démontré pour la régulation des récepteurs de l'endocytose.

I.4.2. L'ubiquitination dans l'endocytose

La mono- ou la poly-ubiquitination de nombreux récepteurs membranaires sert de signal induisant leur internalisation suivie de leur dégradation lysosomale ou de leur recyclage (Hicke and Dunn, 2003). Par exemple, l'ubiquitine ligase Cbl induit la multi-ubiquitination de récepteurs à tyrosine kinase activés, assurant ainsi leur ciblage vers les lysosomes (Haglund et al., 2003). Par ailleurs, de nombreux régulateurs de l'endocytose possèdent des UBDs qui interagissent avec les mono-Ub et sont requis pour le tri endosomal des cargos constitués de protéines ubiquitinées (Hicke and Dunn, 2003). C'est le cas de Rabex-5, un échangeur de GTPase essentiel pour l'activation de la GTPase Rab5 qui régule la fusion des endosomes. En cas d'activation, les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (EGFR) sont mono-ubiquitinés et recrutent Rabex5 via leur mono-Ub (Penengo et al., 2006). Des études montrent que Rabex-5 contient deux UBDs différents : MIU (motif interacting with ubiquitin) et ZnF_A20, qui interagissent avec l'ubiquitine par l'intermédiaire de deux résidus différents Ile44 et Asp58 (Penengo et al., 2006). Rabex5 est donc capable d'interagir avec deux ubiquitines à la fois et réciproquement deux protéines Rabex5 peuvent interagir avec une seule et même ubiquitine (Penengo et al., 2006). Pour ajouter encore en complexité, la plupart des régulateurs endocytaires contenant des UBDs sont eux-mêmes mono-ubiquitinés et leur attachement à une mono-Ub inhibe leur capacité à se lier à des cargos de protéines ubiquitinées. Une explication possible serait que leur UBD interagit avec leur propre mono-Ub les empêchant alors de reconnaître d'autres protéines ubiquitinées (Hoeller et al., 2006).

Les DUBs sont également impliquées dans l'endocytose à différents niveaux. Chez la levure, la DUB Doa4 recycle l'ubiquitine au niveau des endosomes tardifs pour éviter sa destruction. L'inactivation de Doa4 induit la diminution des réserves en ubiquitine libre ce qui interfère avec de nombreux processus dépendant de l'ubiquitine. La plupart des défauts induits par l'extinction de Doa4 sont restaurés par l'ajout d'ubiquitine (Swaminathan et al., 1999). Le plus proche homologue humain de Doa4 est USP8 dont la fonction fait débat. Alors qu'il est clair que dans des cellules stimulées par l'EGF, USP8 interagit avec les EGFRs et clive leur mono-Ub, le groupe de Komada montre que cette déubiquitination retarde

l'internalisation et donc la dégradation des EGFRs (Mizuno et al., 2005), tandis que le groupe de van Leeuwen montre qu'au contraire la déubiquitination des EGFRs par USP8 favorise leur dégradation (Alwan and van Leeuwen, 2007). Des études complémentaires seront nécessaires pour mettre un terme à la controverse. Toujours concernant la régulation des EGFRs, McCullough et ses collaborateurs ont montré que la protéine au domaine JAMM, AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM), interagit avec les EGFRs ubiquitinés au niveau des endosomes, induit leur déubiquitination et empêche leur dégradation. Cette DUB contrebalancerait ainsi l'effet de la ligase Cbl en retardant la dégradation des récepteurs à l'EGF, favorisant leur recyclage et modulant ainsi le signal EGF (McCullough et al., 2004).

Ainsi, l'ubiquitination constitue un signal autorisant le contrôle du trafic intracellulaire des récepteurs aussi bien que la régulation de leur activité modulant de cette façon, la qualité, l'intensité et la durée du signal.

I.4.3. L'ubiquitination dans le noyau

I.4.3. a) Chromatine et cellules souches

Les cellules souches sont maintenues dans un état indifférencié grâce à un ensemble de signaux provenant des tissus environnants (Morrison and Spradling, 2008). Au sein des cellules embryonnaires ainsi que pendant la différenciation des cellules souches, les changements d'état sont contrôlés au niveau de la chromatine par la compaction des nucléosomes et les modifications chimiques des histones (Spivakov and Fisher, 2007). Ces modifications incluent la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Les gènes du groupe Polycomb (PcG) et du groupe Trithorax (TrxG), identifiés pour leur rôle dans la régulation « chromatine dépendante » des gènes homéotiques chez la drosophile, agissent sur la méthylation des histones au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. En particulier, ils participent à la méthylation K4 ou K27 de l'histone H3 induisant respectivement, l'activation ou la répression de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation.

Récemment, de nouvelles enzymes du « système ubiquitine » agissant sur les histones se sont révélées impliquées dans la différenciation. Par exemple, la ligase RING1B appartenant au complexe PRC1 (Polycomb repressive complex 1), mono-ubiquitine H2A, ce qui induit la répression de gènes par le groupe PcG et permet le maintien de cellules souches

(Stock et al., 2007). Au contraire, chez la levure *S. cerevisiae*, la mono-ubiquitination de H2B par l'enzyme de type E2, Rad6, en association avec la ligase BreI (Hwang et al., 2003) induit la méthylation K4 de H3, modification qui, chez un organisme pluricellulaire, participe à la différenciation. Un homologue de BreI a été identifié chez la drosophile et son rôle dans l'ubiquitination de H2B est conservé (Bray et al., 2005). Réciproquement, on connaît également la DUB impliquée dans la déubiquitination de H2B chez la drosophile. Il s'agit de l'homologue de la protéine humaine USP36, Scrawny. L'activité catalytique de cette USP sur H2B permet la répression de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (Buszczak et al., 2009) et cette fonction la rend essentielle dans maintien des cellules souches. Plus généralement, les études concernant la régulation des histones par l'ubiquitination révèlent des rôles importants de l'ubiquitine dans le noyau, incluant initiation ou répression de la transcription, élongation et réparation de l'ADN (voir paragraphe suivant).

I.4.3. b) Réparation de l'ADN

Le facteur de réplication de l'ADN, PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), forme un étau qui entoure l'ADN durant sa réplication (Haracska et al., 2004). Deux types de modifications par l'ubiquitine déterminent quelles polymérase à ADN se lient à PCNA et quel type de réparation a lieu. La mono-ubiquitination de PCNA sur la lysine 164 induit une réparation « avec erreurs » alors que l'attachement de chaînes K63 sur cette même lysine induit une réparation « sans erreur » (Hoege et al., 2002; Stelter and Ulrich, 2003). De façon intéressante, la lysine 164 est aussi sumoylée. La liaison de la protéine Ub-like, SUMO (small ubiquitin-like modifier), sur PCNA et impliquée dans la synthèse normale de l'ADN durant la phase S (Hoege et al., 2002). Ainsi la même lysine subit trois modifications différentes. Friedberg et al. ont proposé un modèle selon lequel la modification de la lysine 164 de PCNA par une mono-Ub ou une chaîne K63 régulaient respectivement le recrutement d'une polymérase à faible fidélité nécessaire pour remédier rapidement à une lésion de l'ADN ou celui d'une polymérase haute fidélité utile durant la réplication normale de l'ADN (Friedberg et al., 2005).

I.4.4. L'Ubiquitination dans la transduction du signal

En cas de stress génotoxique tel que des lésions à l'ADN, le facteur de transcription p53, « gardien du génome », peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou

l'apoptose (Meek, 2004), empêchant ainsi l'apparition de cancers. Ce rôle essentiel est confirmé par le fait que son activité est perturbée ou même absente dans plus de 50% des cellules tumorales humaines (Pavletich et al., 1993). Dans les cellules normales, p53 est maintenu à un niveau basal dans une forme latente et est stabilisé rapidement en cas de stress. L'ubiquitine ligase Mdm2 (murine double minute-2 gene) induit la dégradation de p53 en lui associant des polymères d'ubiquitine K48 (Honda et al., 1997), ce qui permet de maintenir le niveau de base de p53. Mdm2 induit également sa propre dégradation qui est contrée par l'activité d'USP2. En effet, USP2 stabilise la ligase en lui ôtant ses polymères d'ubiquitine K48. En revanche, USP2 n'agit pas sur p53 (Stevenson et al., 2007). La surexpression d'USP2 induit ainsi une accumulation de Mdm2 et donc la dégradation de p53. USP7 est également connue pour son implication dans la régulation de p53. Les premiers rapports sur le rôle d'USP7 dans la voie de régulation de p53 ont été contradictoires. Dans leur premier article, l'équipe de Gu a montré qu'USP7 interagit avec p53, la déubiquitine, et induit sa stabilisation (Li et al., 2002). Les auteurs ont suggéré que l'activité hydrolase d'USP7 s'oppose à l'activité ligase de Mdm2. Cependant, les travaux suivants ont montré qu'USP7 est plutôt impliquée dans la déubiquitination et la stabilisation de Mdm2 (Cummins et al., 2004). De façon spectaculaire, la suppression de l'activité d'USP7 par knock-out, ou par RNAi, induit la stabilisation de p53 et l'apoptose p53-dépendante (Cummins et al., 2004). La déubiquitinase USP7 se présente donc comme un régulateur très important de la voie p53, à tel point que dans une publication du magazine *Science*, elle a été nommée « l'arbitre final de p53 » (Wood, 2002). Jusqu'à récemment l'ubiquitination de p53 par Mdm2 était considérée seulement comme un moyen de réguler sa stabilité mais des études ont montré que Mdm2 jouait également sur l'activité de p53 (Coutts et al., 2009). Effectivement, Mdm2 est capable de mono-ubiquitiner p53 sur plusieurs lysines de sa partie C-terminale ainsi que de son domaine de liaison à l'ADN et cette multi-ubiquitination induit l'export de p53 vers le cytoplasme en cas de stress cellulaire (Coutts et al., 2009).

I.4.5. Ubiquitination et acétylation : des signaux contradictoires ?

Comme l'association d'ubiquitine s'effectue sur les lysines des protéines ciblées, cette réaction peut interférer avec les fonctions cellulaires dépendant des autres modifications chimiques de ces résidus telles que la méthylation et l'acétylation ou des modifications faisant intervenir des protéines proches de l'ubiquitine telles que la sumoylation ou la neddylation

(Sadoul et al., 2008). Prenons l'exemple de l'acétylation. Cette modification réversible est catalysée par les « histone acetyltransferases » (HATs) qui transfèrent un groupe acétyle sur une lysine de leur substrat, et les « histone deacetylases » (HDACs) qui catalysent la réaction inverse. La modification d'une lysine par un groupe acétyle rendant ce résidu inaccessible à l'ubiquitine, la plupart des exemples de la littérature impliquent l'acétylation dans la stabilisation de protéines (Sadoul et al., 2008). Ceci est vrai pour Smad7, une protéine qui régule négativement les voies du TGF- β (transforming growth factor) (Nakao et al., 1997). La déacétylation de Smad7 par HDAC1 induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Kume et al., 2007). Cependant, l'acétylation par une acétyltransférase peut aussi provoquer la dégradation du substrat. Le facteur de transcription HIF1 est acétylé par ARD1 (Arrest-defective-1) ; cette modification augmenterait son interaction avec la ligase pVHL et en conséquence favoriserait son ubiquitination et sa dégradation (Jeong et al., 2002). L'acétylation peut donc empêcher ou induire l'ubiquitination d'un substrat.

L'équilibre entre acétylation et ubiquitination peut aussi être régulé par une même enzyme. Par exemple, l'acétyl transférase p300, qui participe à l'acétylation de p53 en cas de dommage à l'ADN (Grossman, 2001), dispose également d'une activité ubiquitine ligase qui lui permet de prolonger des polymères d'ubiquitine à partir de mono-Ub associé à p53 par Mdm2 (Grossman et al., 2003). L'acétyltransférase p300 s'ajoute ainsi à la longue liste des régulateurs de p53 et témoigne du lien étroit entre acétylation et ubiquitination.

Alors que plusieurs HATs possèdent une activité ligase, HDAC6 est la première déacétylase disposant d'un domaine de liaison à l'ubiquitine. HDAC6 possède un ZnF-UBP (Zinc finger ubiquitin binding domain) ayant une très forte affinité (60nM) pour les mono-Ub ou les polymères d'ubiquitine (Seigneurin-Berny et al., 2001). Ceci permet à HDAC6 d'interagir avec des agrégats de protéines mal repliées et ubiquitinées et de les transporter vers les agrésomes, structures qui protègent la cellule en cas d'accumulation de protéines anormales ou endommagées (Johnston et al., 1998). En priorité prises en charge par le protéasome, ces protéines deviennent difficilement dégradables par celui-ci lorsqu'elles s'agrègent. C'est à partir de ces agrégats que se forment les agrésomes dont l'élimination, probablement par autophagie (Iwata et al., 2006), est requise pour la survie cellulaire. Des mutations de HDAC6 dans son domaine ZnF-UBP ou déacétylase empêche la formation des agrésomes suggérant que les deux fonctions de HDAC6 sont nécessaires pour l'élaboration de ces structures (Kawaguchi et al., 2003).

Ainsi, ubiquitination et acétylation entretiennent des relations complexes : ces deux systèmes de signalisation peuvent aussi bien avoir des rôles antagonistes que coopérer pour assurer une même fonction cellulaire.

Ces exemples montrent à quel point l'ubiquitination est partout dans la cellule : elle intervient à tous les niveaux, des récepteurs en surface jusqu'aux complexes régulant la transcription et la réparation de l'ADN dans le noyau ainsi que sur de nombreux intermédiaires de la signalisation. Par conséquent, le mauvais fonctionnement des enzymes régulant les modifications par l'ubiquitine est responsable d'un grand nombre de pathologies.

I.5. Implication de l'ubiquitination dans des pathologies humaines

I.5.1. Implication de l'ubiquitination dans le cancer

On trouve dans la signalisation cellulaire de nombreux exemples illustrant le lien entre ubiquitination et cancer. C'est le cas de la régulation de p53 par Mdm2, USP2 et USP7 qui met en évidence le rôle potentiel de la balance ubiquitination/déubiquitination dans l'apparition d'un cancer.

Par ailleurs, certaines mutations de protéines du « système ubiquitine » sont associées à des cancers. Prenons le cas de la ligase BRCA1. Des mutations dans le domaine RING de BRCA1 induisent une prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire (Miki et al., 1994). BRCA1 forme un dimère avec une autre E3, BARD1, et ce complexe présente une activité de ligase *in vitro* (Brzovic et al., 2003). De plus le complexe BRCA1/ BARD1 lie plus facilement des polymères d'ubiquitine à son substrat que BRCA1 seule. Le groupe de Klevit a montré que plusieurs des mutations impliquées dans la prédisposition au cancer induisent une diminution de l'activité E3 ligase du complexe BRCA1/BRAD1 résultant de la perturbation de la formation de l'hétérodimère ou de l'altération du domaine RING de BRCA1 (Brzovic et al., 2001).

I.5.2. Exploitation du « système ubiquitine » par les virus

Les virus utilisent des mécanismes habiles pour forcer leur hôte à faciliter leur propagation. La modification de protéines par ubiquitination durant les infections virales

permet au virus de se répliquer et d'échapper à la réponse immunitaire. Par exemple, deux protéines du virus HIV (Human Immunodeficient Virus), Vif et Vpu (viral protein U), interagissent avec des ubiquitine ligases pour usurper leur activité et promouvoir l'ubiquitination de protéines de la cellule infectée. Vif interagit directement avec une déaminase cytidine ABC3G et facilite sa dégradation par le protéasome (Sheehy et al., 2003). En l'absence de Vif, ABC3G empêche la réplication du virus (Harris et al., 2003). L'immunoprécipitation de Vif dans une lignée cellulaire, issue de lymphocytes T, infectée par le HIV a démontré que Vif interagit avec un complexe contenant l'ubiquitine ligase RBX1 (Yu et al., 2003). Ce complexe est capable d'ubiquitiner *in vitro* la protéine ABCG3 purifiée à partir de cellules transfectées (Kobayashi et al., 2005), ce qui permettrait d'induire sa dégradation.

Par ailleurs, le récepteur CD4, situé à la surface de certaines cellules T est régulé négativement par Vpu (Willey et al., 1992). Comme CD4 est un co-récepteur favorisant l'entrée du virus HIV dans les cellules T, sa régulation négative permettrait d'optimiser la réplication du virus en bloquant l'entrée de virus supplémentaires (Willey et al., 1992). La co-expression de Vpu et de CD4 dans des cellules HeLa résultent en la dégradation de CD4 par le protéasome (Schubert et al., 1998). Le groupe de Benarous a montré, par un criblage double hybride, que Vpu interagit avec la protéine β TrCP (β -transducin repeat containing protein) appartenant au complexe E3 ligase SCF- β TrCP (Skp1-CUL1-F-box ligase containing the F-box protein β TrCP) et que le complexe Vpu/ β TrCP induit l'ubiquitination et la dégradation de CD4 (Margottin et al., 1998).

I.5.3. L'ubiquitination dans les maladies neurodégénératives

Comme cela a été mentionné dans les paragraphes I.3.1. a) et e), des mutations dans les gènes d'*UCH-L1* ou d'*Ataxin 3* conduisent à des pathologies neurodégénératives (Singhal et al., 2008). Un autre exemple est celui de la forme juvénile autosomale-récessive de la maladie de Parkinson. Dans cette pathologie, des mutations dans le gène codant l'ubiquitine ligase PRKN2 (parkin) induisent une altération de son activité ligase *in vitro* (Shimura et al., 2000) suggérant que l'accumulation de ses substrats pourraient contribuer au développement de la maladie.

I.5.4. L'ubiquitination dans l'inflammation et l'oncogénèse

Des mutations dans le gène codant la protéine cylindromatosis (CYLD), un suppresseur de tumeur, sont responsables du syndrome qui porte le même nom et qui se traduit par la formation de tumeurs de la peau (Bignell et al., 2000; Bowen et al., 2005). Des mutations de CYLD sont également associées à la formation de tumeurs dans le syndrome de Brooke–Spiegler ou de la maladie MFT (multiple familial trichoepithelioma) (Bowen et al., 2005; Burrows et al., 1992). Bien qu'à l'origine ces maladies aient été identifiées comme distinctes, des études tendent à montrer qu'elles représentent des variations phénotypiques d'une même pathologie (Poblete Gutierrez et al., 2002). La partie C-terminale de CYLD contient un motif catalytique témoignant de son appartenance à la famille des USPs. CYLD clive les chaînes K63 associées aux protéines TRAF2, TRAF6 et NEMO (NF- κ B essential modulator) des voies NF- κ B (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003) et participe ainsi à la régulation négative de ces voies de signalisation. La réduction ou l'absence d'activité de CYLD autorise l'activation prolongée des voies NF- κ B, ce qui induit une inflammation constitutive, accroît la résistance à l'apoptose et donc participe à la formation de tumeurs (Brummelkamp et al., 2003). L'étude de 25 familles atteintes par le syndrome révèle que 21 d'entre elles présentent des mutations induisant l'altération ou la troncature de la partie C-terminale de CYLD abolissant ainsi son activité catalytique. Ceci suggère un lien entre la maladie et la perte de l'activité catalytique de CYLD.

Deux autres DUBs participent à la régulation négative des voies NF- κ B, il s'agit d'A20 et Cezanne, deux protéines de la famille OTU. A20 est capable d'hydrolyser à la fois les chaînes K48 et K63 *in vitro* mais devient spécifique des chaînes K63 *in vivo*. De plus, A20 dispose d'une activité ligase dans son domaine « zinc finger » capable d'assembler des polymères d'ubiquitine K48 *in vitro* dans des cellules transfectées (Wertz et al., 2004). A20 agit donc comme inhibiteur des voies NF- κ B en retirant les chaînes K63 (activatrices) du Tumor necrosis factor (TNF) receptor interacting protein RIP1 (Receptor interacting protein 1), et ensuite lui assemble des chaînes K48 qui entraînent sa dégradation et donc l'inactivation de la voie (Wertz et al., 2004). A ce jour, des mutations d'A20 sont impliquées dans des maladies inflammatoires (Musone et al., 2008) et des cancers (Novak et al., 2009). De plus, les souris mutantes pour A20 développent des inflammations sévères et sont hypersensibles au lipopolysaccharide (LPS) et au TNF α , activateurs des voies NF- κ B, et meurent prématurément étant donnée leur incapacité à réprimer l'activation des facteurs NF- κ B (Lee et al., 2000).

I.6. Recherche de cibles thérapeutiques parmi les protéines du « système ubiquitine »

Les exemples précédents montrent que les dysfonctionnements des protéines impliquées aussi bien dans l'ubiquitination que dans l'hydrolyse des liaisons à l'ubiquitine sont associés à une grande variété de maladies humaines. C'est pourquoi ces enzymes sont particulièrement intéressantes en tant que cibles thérapeutiques potentielles.

I.6.1. Inhibition du protéasome : un traitement contre le cancer ?

Pour l'instant, la sous-unité 26S du protéasome est la seule cible thérapeutique du « système ubiquitine » ; elle est inhibée par un médicament nommé Velcade, commercialisé depuis 2003. Velcade est un dérivé d'acide boronique qui permet l'inhibition réversible de l'activité de digestion « chymotripsine-like » du protéasome (Nalepa et al., 2006). Il est efficace dans le traitement de certains cancers et notamment dans le myélome multiple (Chauhan et al., 2008). De nombreuses compagnies pharmaceutiques tentent de développer des inhibiteurs du protéasome plus puissants que Velcade. Cependant, l'inhibition du protéasome s'est avérée relativement toxique durant les essais cliniques ; ceci indique qu'il serait peut être plus efficace d'inhiber des cibles plus spécifiques (Chauhan et al., 2005).

I.6.2. Ciblage des enzymes de type E1 et E2

Cibler les « activating enzyme » E1 permettrait de bloquer tout le système d'ubiquitination, ce qui est encore moins spécifique que d'inhiber le protéasome. De plus, inactiver les E1 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (Finley et al., 1984). Cibler ces enzymes semblent donc à priori un choix risqué. Cependant, une équipe a recherché des inhibiteurs de E1 et a mis en évidence une molécule intéressante : PYR-41. Cette inhibiteur induit préférentiellement l'apoptose dans des cellules transformées exprimant la forme sauvage de p53 en empêchant sa dégradation (Yang et al., 2007). Il pourrait donc être un nouvel agent thérapeutique contre le cancer dans le cas où p53 est présent. De plus, PYR-41 bloque également l'ubiquitination de TRAF6 et celle d'I κ B (inhibitor of κ B), l'inhibiteur de NF- κ B, empêchant sa dégradation et inactivant ainsi les voies NF- κ B. Il pourrait donc servir d'agent anti-inflammatoire appliqué localement.

Certains groupes pharmaceutiques misent sur le ciblage des « conjugating enzymes » E2. Comme ces enzymes interviennent dans une part importante du processus d'ubiquitination,

à travers leur activité enzymatique, elles pourraient être des cibles intéressantes. Cependant, ces protéines disposent d'un cœur enzymatique très conservé et ne possèdent pas de poches catalytiques clairement définies ce qui rend la recherche d'inhibiteurs difficile.

I.6.3. Vers des cibles plus spécifiques : les ubiquitines ligases E3

De part la complexité de la réaction d'ubiquitination et l'absence de poche catalytique permettant la liaison de petites molécules, trouver des inhibiteurs des E3 constitue un réel défi. Néanmoins, les recherches visant à faire des E3 ligases des cibles thérapeutiques se poursuivent et certains résultats ont été obtenus sur la régulation de p53. Deux types de stratégies ont été employées pour inhiber spécifiquement l'interaction Mdm2 / p53. Se basant sur la structure de cette interaction, certaines industries pharmaceutiques ont développé des petites molécules, comme Nutlin, RITA, MI-63 et SyI-155, pour bloquer l'interaction entre la ligase et son substrat (Yang et al., 2009). Le traitement de cellules avec ces molécules entraîne l'accumulation de p53 et la mort des cellules tumorales en culture. Certains de ces inhibiteurs empêchent la croissance de tumeurs dans des souris nues et sont bien tolérés par les animaux. Des essais cliniques pourraient être réalisés prochainement (Yang et al., 2009). La seconde stratégie consiste à inactiver l'activité ligase de Mdm2. L'équipe de Jensen a recherché des inhibiteurs de l'auto-ubiquitination de Mdm2 *in vitro*. Leur crible a identifié une famille de composants, incluant HLI98, qui empêche l'ubiquitination de p53 par Mdm2 *in vitro* et en cellules (Yang et al., 2005). Cependant ces composants ne sont pas suffisamment solubles pour être testés *in vivo*. Récemment, un homologue plus soluble de HLI98, inhibiteur de Mdm2 a été caractérisé (Kitagaki et al., 2008). Il sera intéressant de le tester *in vivo* pour sonder son effet anticancéreux dans des animaux modèles. Encore une fois, ces inhibiteurs ne peuvent être efficaces que dans les cancers où le gène *p53* est présent, ce qui n'est pas le cas dans de très nombreux cancers (Pavletich et al., 1993).

Contrairement aux ubiquitines ligases, les DUBs ont un mécanisme d'action plus simple et une poche catalytique capable de lier de petites molécules. La société Hybrigenics a récemment découvert plusieurs petites molécules capables d'inhiber USP7 et USP8 et qui pourraient avoir des applications en oncologie (Petroski, 2008).

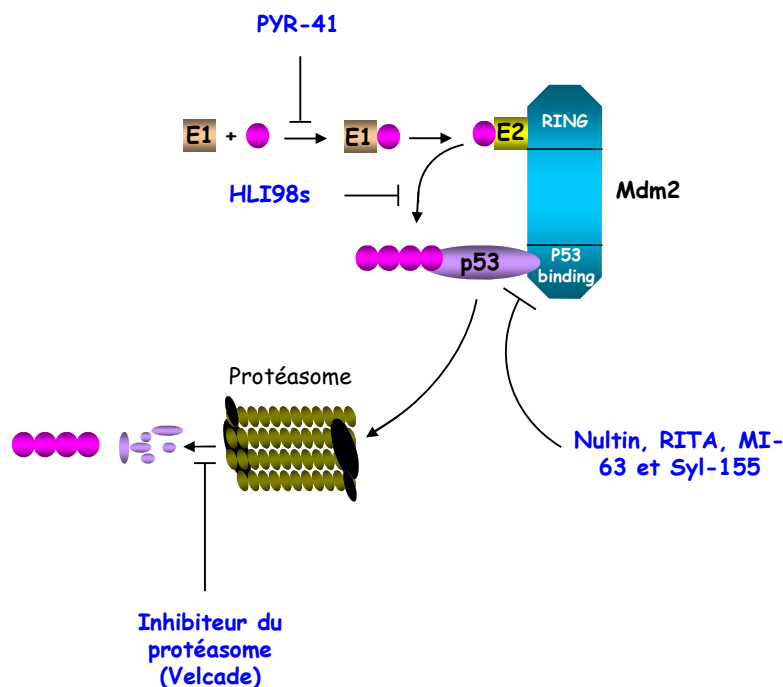


Figure 10. Représentation de différents types d'inhibiteurs du « système ubiquitine ». Représentation des inhibiteurs bloquant les E1 (PYR-41), l'activité catalytique de Mdm2 (HLI98), l'interaction Mdm2/p53 (Nultin, RITA, MI-63 et Syl-155) ou la dégradation par le protéasome (Velcade). D'après Yang et al., 2009.

I.6.4. Stratégie d'identification d'inhibiteurs de DUBs.

Il existe à ce jour des inhibiteurs du site catalytique des USPs et UCHs tels que l'ubiquitine aldéhyde (Hershko and Rose, 1987) mais aucun inhibiteur spécifique d'une ou d'un petit nombre de DUBs n'a encore été découvert. Comme pour les ligases, deux stratégies sont envisageables : inhiber l'activité enzymatique des DUBs ou empêcher leur interaction avec leur substrat. Pour cela il faut disposer de bons moyens de détection de l'activité enzymatique des DUBs. Les techniques couramment utilisées reposent sur le clivage de fusions linéaires d'ubiquitine qui peuvent être produites en bactéries (liaison Ub-glutathione transférase par exemple (Baker et al., 1994)) ou synthétisées chimiquement (tétramères d'ubiquitine). Ces essais nécessitent d'analyser les produits de la réaction sur gel d'acrylamide ce qui est laborieux et coûteux. Pour l'HTS (high-throughput screening), on peut utiliser un substrat fluorescent comme l'Ub-AMC (Ub-7-amino-4-méthylcouramine) qui mime la partie C-terminale de l'ubiquitine (Dang et al., 1998). L'AMC fluoresce lorsqu'il a été détaché de l'ubiquitine. L'inconvénient de l'utilisation de l'Ub-AMC est qu'il est difficilement hydrolysable par la plupart des USPs. De plus, la longueur d'onde d'excitation de l'Ub-AMC se situe dans l'ultra-violet (340nm) et excite également les cycles aromatiques des acides aminés ce qui donne lieu à 20% de faux positifs (Tirat et al., 2005). Le FRET

(fluorescence resonance energy transfert) a également été développé pour réaliser des criblages HTS (Horton et al., 2007). Dans ce cas, le substrat consiste en une YFP (yellow fluorescent protein) fusionnée avec l'ubiquitine en partie N-terminale et une extension C-terminale contenant une cystéine associée à un atome de terbium. En présence d'une DUB la partie C-terminale contenant le terbium est clivée, ce qui résulte en une diminution du signal de fluorescence. L'utilisation du FRET demande des réactifs et un équipement particuliers et est difficile à adapter en plaques multi-puits.

Ces procédés de recherche d'inhibiteurs font intervenir des substrats très éloignés des cibles physiologiques de la plupart des isopeptidases, c'est-à-dire des mono- ou poly-Ub attachées à une protéine. L'équipe de Goldenberg a développé un substrat plus physiologique sur la base de l'observation selon laquelle la plupart des USPs qui hydrolysent des chaînes isopeptidiques sont également capables de cliver des fusions linéaires d'ubiquitine en partie N-terminale d'une protéine. Ceci permet l'utilisation de protéines qui requièrent d'avoir leur partie N-terminale libre pour être actives. C'est le cas de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui doit avoir sa partie N-terminale libre pour cliver les phospholipides (Goldenberg et al., 2008). Quand PLA₂ est fusionnée avec une ubiquitine dans sa partie N-terminale, elle est inactive. En présence d'une DUB, l'ubiquitine est clivée de la partie N-terminale de PLA₂ qui devient alors active sur son substrat. En utilisant un substrat qui devient fluorescent lorsqu'il est clivé par PLA₂, on peut suivre l'activité catalytique des DUBs. Ce test présente une bonne sensibilité due au couplage des activités catalytiques des DUBs et de PLA₂. De plus, la longueur d'onde des rayonnements émis par les substrats de PLA₂ perturbe moins les acides aminés que dans les expériences avec l'Ub-AMC. Ce système devrait permettre de découvrir rapidement des inhibiteurs efficaces et spécifiques de chacune des DUBs (Goldenberg et al., 2008). Cependant, il faut garder à l'esprit que souvent l'activité catalytique d'une DUB *in vitro* ne reflète pas son activité *in vivo* comme c'est le cas pour A20 et CYLD (Kovalenko et al., 2003; Massoumi et al., 2006; Trompouki et al., 2003; Wertz et al., 2004).

Par ailleurs, des ARN interférents inactivant un grand nombre de DUBs ont été utilisés avec succès pour réaliser des cribles cellulaires visant à identifier la fonction des DUBs dans différentes voies de signalisation (Brummelkamp et al., 2003; Nijman et al., 2005a; Zhao et al., 2009). Ce genre de crible devrait permettre dans un premier temps, dans le cadre de la recherche fondamentale, d'identifier les fonctions puis les substrats de ces protéases et dans un deuxième temps, d'autoriser la recherche d'inhibiteurs spécifiques de leurs interactions.

En conclusion, le « système ubiquitine » fait l'objet de nombreuses recherches visant le développement de cibles thérapeutiques. Certaines industries pharmaceutiques développent des inhibiteurs peu spécifiques, ciblant le protéasome ou les enzymes de type E1 ou E2. De tels inhibiteurs ont fait leurs preuves : Velcade, qui inhibe le protéasome, est efficace contre certains cancers ; les inhibiteurs d'E1 induisent préférentiellement la mort des cellules transformées, indiquant que ces cellules sont plus sensibles à une perturbation du « système ubiquitine ». D'autres laboratoires tentent de développer des molécules plus spécifiques inhibant les ligases E3 ou les DUBs. Comme le montre l'identification de petites molécules inhibant l'interaction entre Mdm2 et p53, cette stratégie pourrait s'avérer efficace d'ici les prochaines années.

II. L'ubiquitination dans la signalisation NF- κ B

II.1. Les voies NF- κ B dans la signalisation cellulaire

Les protéines de la famille NF- κ B (Nuclear factor kappa B) sont des facteurs de transcription. Ils sont connus pour leur implication dans la réponse immunitaire et l'inflammation ; ils jouent aussi un rôle important dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose (Chen, 2005). Les facteurs NF- κ B sont activés par des stimuli très variés : bactéries, virus, stress oxydant, cytokines inflammatoires... Dans des conditions normales, ils sont capables d'induire une réponse adaptée à diverses agressions et participent à la bonne santé de l'organisme. En revanche, la dérégulation des voies NF- κ B peut entraîner de graves conséquences telles que des maladies inflammatoires (asthme, arthrite rhumatoïde) (Perkins, 2000), le développement ou la progression de cancers (Courtois and Gilmore, 2006) ainsi que certaines maladies neurodégénératives (Gibson and Huang, 2005). Dans ces pathologies, NF- κ B présente une activité constitutive conduisant à une surexpression des gènes cibles.

Ces facteurs de transcription sont présents dans la majorité des cellules sous forme inactive ; leur activation entraîne des réponses variables suivant le contexte cellulaire (Perkins, 2000). Il s'agit de facteurs de transcription dimériques constitués de membres de la famille Rel tels que REL-A (aussi connu sous le nom de p65), c-REL, REL-B, p50 et p52 (Li and Verma, 2002). Tous les facteurs NF- κ B contiennent un domaine REL fortement conservé responsable de la liaison à l'ADN, de la dimérisation, de la translocation nucléaire ainsi que de l'interaction avec les protéines I κ B (inhibitor of κ B). En l'absence de stimulation, les facteurs NF- κ B sont maintenus dans le cytoplasme par leur inhibiteur I κ B ou sont présents sous forme de précurseurs inactifs (p100). Les protéines I κ B, incluant I κ B α , β et ϵ , se lient aux facteurs NF- κ B via un domaine répété d'ankyrine et bloquent ainsi leur translocation nucléaire et leur activité transcriptionnelle. La partie C-terminale de p105 et p100 contient aussi un domaine répété I κ B-like d'ankyrine qui doit être dégradé pour générer les sous-unités REL matures, respectivement p50 et p52. Les voies de signalisation NF- κ B sont classées en voies canonique ou non-canonique selon le mode d'activation impliquant soit la dégradation de I κ B et de p105 (canonique) soit la maturation de p100 (non canonique) (Pomerantz and Baltimore, 2002 ; figure 11). Dans la voie de signalisation canonique, principale voie d'activation de NF- κ B, les facteurs de transcription sont activés en cas d'infection

microbienne ou par des cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire des récepteurs TNFR (tumor necrosis factor receptor), TLRs (toll like receptors) ou du récepteur IL-1R (récepteur à interleukine-1). La liaison du ligand par ces récepteurs induit l'activation du complexe IKK (I κ B kinase) formé de deux sous unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous unité régulatrice NEMO (NF- κ B essential modulator, aussi appelé IKK γ). Des études génétiques ont montré que IKK β mais pas IKK α phosphoryle l'inhibiteur I κ B sur deux sérines *in vivo*. Cette double phosphorylation induit l'ubiquitination K48 de I κ B et sa dégradation par le protéasome (Chen et al., 1995), libérant ainsi le dimère de facteurs NF- κ B constitué de REL-A et p50.

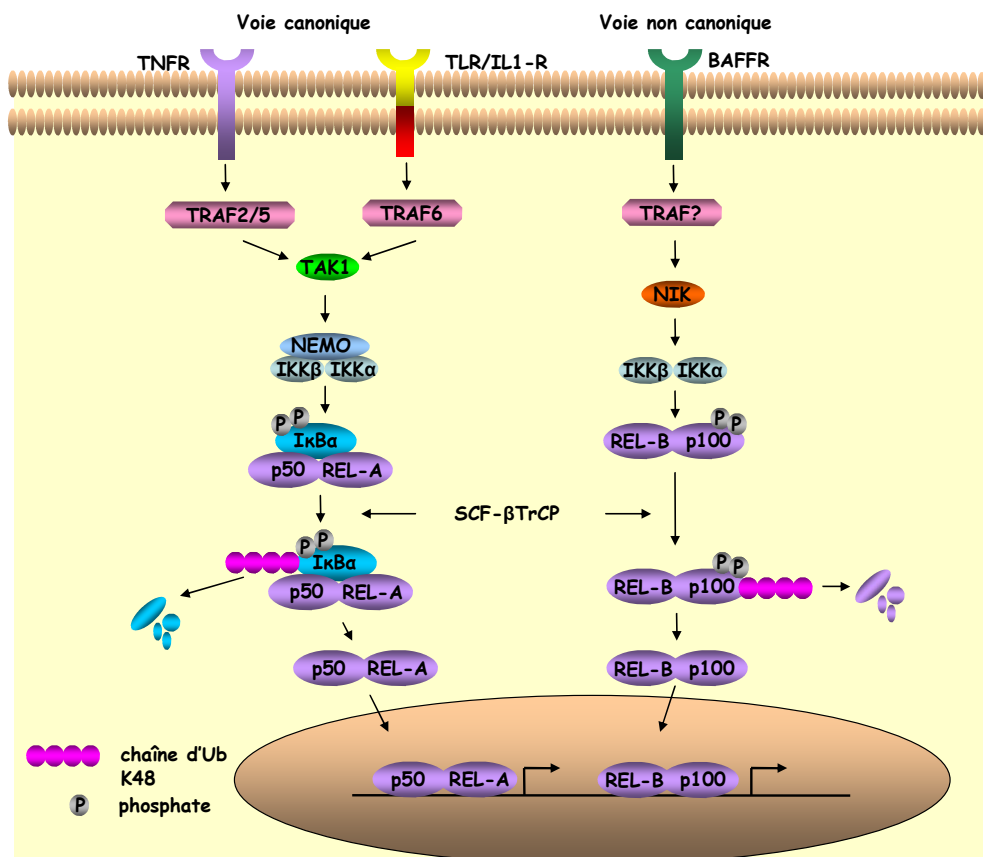


Figure 11. Voies d'activation canonique et non canonique des facteurs NF- κ B. Dans la voie canonique d'activation des facteurs NF- κ B (à gauche), la stimulation des récepteurs TNFR, TLRs ou IL-1R par leurs ligands respectifs active les protéines TRAFs (TNFR associated factors). Ceci entraîne l'activation de la kinase TAK1 qui phosphoryle IKK β . IKK β phosphoryle ensuite l'inhibiteur I κ B ce qui résulte en sa poly-ubiquitination K48 par le complexe ligase SCF- β TrCP (Skp1-CUL1-F-box ligase containing the F-box protein β TrCP (β -transducin repeat containing protein)) et conduit à sa dégradation par le protéasome. Ceci libère le dimère de facteurs NF- κ B, p50 et REL-A, qui entrent dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles impliqués dans l'immunité, l'inflammation et la survie cellulaire. Dans la voie non canonique (à droite), un sous ensemble de récepteurs de la superfamille des TNFRs, incluant le récepteur des cellules B, BAFFR, active la kinase NIK qui phosphoryle IKK α qui, à son tour, phosphoryle le précurseur NF- κ B, p100. Celui-ci est alors ubiquitiné K48 par le complexe ligase SCF- β TrCP et est partiellement dégradé pour donner sa forme mature p52. p52 et son partenaire RELB sont alors transloqués dans le noyau et activent la synthèse de leurs gènes cibles impliqués notamment dans la maturation des cellules B. *D'après Chen, 2005*

La voie de signalisation non canonique existe principalement dans les lymphocytes B ou T et s'active en réponse à la stimulation de l'un des récepteurs de la superfamille des TNFRs tels que BAFFR ou CD40. La stimulation de ces récepteurs active la protéine kinase NIK qui à son tour active IKK α . IKK α phosphoryle p100 sur deux résidus sérine de sa partie C-terminale conduisant à la dégradation sélective de son domaine I κ B-like par le protéasome (Xiao et al., 2001). La sous-unité mature p52 et son partenaire REL-B sont alors transloqués dans le noyau pour réguler l'expression de leurs gènes cibles.

L'ubiquitination joue un rôle crucial dans les voies de signalisation canonique et non canonique de NF- κ B agissant aussi bien comme signal d'activation que de dégradation (paragraphe II.2. et II.3.).

II.2. Régulation « dégradation » dépendante des voies NF- κ B

L'ubiquitination de I κ B est réalisée par une E2 de la famille des Ubc4/5 (ubiquitin conjugating enzyme 4 ou 5) (Chen et al., 1995) en association avec le complexe ligase SCF- β TrCP (Skp1-CUL1-F-box ligase containing the F-box protein β TrCP (β -transducin repeat containing protein)) (Margottin et al., 1998). Deux protéines β TrCPs sont impliquées dans ce processus, β TrCP1 et β TrCP2. Leur fonction sont redondantes car la délétion de l'une d'elles dans des souris n'empêche que partiellement la dégradation de I κ B α (Guardavaccaro et al., 2003). β TrCP1/2 se lie spécifiquement, par l'intermédiaire de la séquence répétée WD40 de sa partie C-terminale, à la forme phosphorylée d'I κ B α . β TrCP1/2 se lie également au reste du complexe SCF par sa F-box. Le complexe SCF contient la ligase de type RING, ROC1/RBX1, qui interagit avec Ubc4/5 pour ajouter des polymères d'ubiquitine sur deux résidus lysines très conservés de la partie N-terminale d'I κ B α . I κ B α , ainsi ubiquitiné, reste associé au facteur NF- κ B mais est sélectivement dégradé par le protéasome alors que le facteur NF- κ B est épargné et relâché dans le cytoplasme (Chen et al., 1995 ; figure 11). Dans des cellules infectées par le HIV, la protéine virale Vpu empêche la dégradation d'I κ B α en cas d'activation de la voie du TNFR par TNF α (tumor necrosis factor α). En effet, Vpu est phosphorylée sur le même motif de résidus qu'I κ B α et interagit à sa place avec β TrCP. Vpu est résistant à la dégradation par β TrCP et inhibe ainsi de façon compétitive la dégradation d'I κ B α par β TrCP (Bour et al., 2001). Ceci permet à Vpu d'inactiver la voie du TNFR et on comprend l'adaptation du virus qui lui permet d'inhiber cette cascade de signalisation essentielle dans le combat contre le HIV.

L'ubiquitination impliquant la dégradation est aussi responsable de la maturation des facteurs p105 et p100 en p50 et p52 respectivement. p105 peut être maturé au niveau traductionnel ou post traductionnel, les deux processus nécessitent le protéasome (Chen, 2005). La maturation co-traductionnelle de p105 semble être un procédé constitutif qui ne requiert ni phosphorylation ni ubiquitination et qui engendre la plus grande part de p50, facteur constitutivement présent dans les cellules non stimulées. Certains produits, tels que le LPS (lipopolysaccharide), activent le complexe IKK qui phosphoryle p105 dans sa partie C-terminale et induit sa maturation post-traductionnelle (Ciechanover et al., 2001).

A l'opposé de p105, la maturation de p100 est régulée par la voie NF- κ B non canonique et dépend de sa phosphorylation et de son ubiquitination. La stimulation de certains récepteurs des cellules B de la famille des TNFRs active IKK α qui phosphoryle p100 sur deux résidus sérine de sa partie C-terminale. Ceci entraîne le recrutement du complexe ligase SCF- β TrCP qui associe des chaînes d'ubiquitine K48 à p100 (Xiao et al., 2001). Par conséquent, la partie I κ B-like de p100 est sélectivement dégradée par le protéasome, générant la forme mature de p100, p52 (figure 11).

P100 et p105 sont seulement partiellement dégradées par le protéasome. On ne sait pas actuellement comment le protéasome « choisit » de ne dégrader qu'en partie une protéine. Concernant p100 et p105, il semble que leur chaîne K48 recrute le protéasome sur leur région interne riche en glycine formant une boucle. La dégradation commence au niveau de cette boucle et se propage vers les parties C- et N- terminales de la protéine tagguée. Généralement la protéine peut se déplier entièrement et donc être dégradée en totalité. Dans le cas de p100 et p105, leur domaine RHD (Rel homology domain) est difficile à déplier. Ainsi, après avoir initié la dégradation depuis la boucle riche en glycine, le protéasome parcourt sans difficulté la protéine du côté C-terminal mais s'arrête du côté N-terminal lors de sa rencontre avec la structure RHD rigide (Rape and Jentsch, 2004).

Dans la suite, je me limiterai à la description des voies TLRs/IL-1R et du TNFR qui constituent les principales voies d'activation des facteurs NF- κ B et sont conservées chez la drosophile.

II.3. Régulation « dégradation » non dépendante des voies NF- κ B

En cas de stimulation des récepteurs en amont des voies NF- κ B, les protéines TRAFs (TNFR-associated factors) sont parmi les premières molécules à participer à la transduction

du signal. Ces protéines jouent un rôle charnière dans l'activation des voies NF- κ B via de nombreux récepteurs et en particulier via les récepteurs du TNFR, les TLRs et le récepteur IL-1R (Chung et al., 2002 ; figure 12). Sept protéines TRAFs ont été identifiées dans le génome humain. Exceptée TRAF1, toutes ces protéines sont des E3 ligases (Deng et al., 2000) qui contiennent un domaine RING dans leur partie N-terminale, suivi par plusieurs UBDs de type « zinc finger » (ZF). Parmi toutes les protéines TRAFs, ce sont TRAF2 et TRAF6 qui ont été le plus abondamment étudiées. TRAF2 est recrutée au niveau du récepteur TNFR par l'intermédiaire d'une liaison avec la protéine TRADD (TNFR-associated via death domain) (Chen and Goeddel, 2002). TRADD et TRAF2 interagissent avec RIP (receptor-interacting protein), une protéine kinase qui participe à la signalisation NF- κ B. TRAF6, quant à elle, est essentielle dans les voies IL-1R et TLRs (Wu and Arron, 2003) pour l'activation de IKK et de la Jun-terminal kinase (JNK) dont les voies du même nom sont impliquées dans l'inflammation et l'apoptose (Deng et al., 2003).

Plusieurs études biochimiques et génétiques ont situé IKK au centre de l'activation des voies NF- κ B mais l'ensemble des mécanismes par lesquels ce complexe est régulé commencent seulement à être découverts (Adhikari et al., 2007; Sun and Ley, 2008).

II.3.1. Activation de IKK par TRAF6 dans les voies IL-1R/TLRs

Dans les voies de signalisation IL-1R et TLRs, la stimulation des récepteurs par l'IL-1 β ou des composants bactériens tels que le LPS, entraîne le recrutement de MyD88, une protéine adaptatrice qui recrute les kinases IRAK1 (IL-1R associated kinase 1) et IRAK4. IRAK1 se lie ensuite à TRAF6 qui, par conséquent, active les voies en aval, dont celles impliquant IKK et JNK. Des expériences de biochimie ont montré que TRAF6 n'active pas directement IKK mais passe par deux activateurs : TRIKA1 et TRIKA2 (TRAF6-regulated IKK activator 1 et 2) (Deng et al., 2000). TRIKA1 est formé de deux E2, Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) et Uev1a (ubiquitin E2 variant 1a). Ce complexe s'associe à TRAF6 pour catalyser la formation de polymères d'ubiquitine K63 et les conjuguer à TRAF6 elle-même et à NEMO (Deng et al., 2000).

TRIKA2 est un complexe trimérique contenant TAK1 (TGF- β (transforming growth factor β)-activated kinase 1) et deux protéines adaptatrices, TAB1 (TAK1-binding protein 1) et TAB2 (ou son homologue TAB3) (Wang et al., 2001). Le domaine C-terminal de TAB1 se lie à TAK1 et est indispensable à son activation (Conner et al., 2006). TAB2 et TAB3 contiennent deux UBDs, un domaine CUE (Cue1-homologous) en partie N-terminale et un

domaine « novel zinc finger » (NZF) en partie C-terminale (Kanayama et al., 2004). Alors que le domaine CUE n'est pas indispensable à l'activation des voies NF- κ B, le domaine NZF est essentiel. Cet UBD reconnaît spécifiquement les chaînes d'ubiquitine K63. Des délétions dans ce domaine abolissent l'activation de TAK1 et IKK alors que le remplacement de ce domaine par un autre UBD restaure sa fonction. Ceci montre que l'UBD de TAB2/3 est nécessaire à l'activation de TAK1 et IKK. De plus, pour être activé, le complexe TAK1/TAB2/3 nécessite l'ubiquitination de TRAF6 catalysée par TRIKA1 et TRAF6 elle-même (Wang et al., 2001). Concernant l'ubiquitination de TRAF6, l'équipe de Chen a également montré que la dimérisation forcée de la ligase induit son auto ubiquitination K63 et l'activation de IKK (Wang et al., 2001). Une mutation sur la lysine 124 de TRAF6 empêche son auto-ubiquitination et l'activation des kinases en aval (Lamothe et al., 2007).

Ces études conduisent au modèle suivant : suite à l'activation des TLRs et IL-1R, TRAF6 est recrutée au niveau des récepteurs et forme des oligomères. L'oligomérisation de TRAF6 active sa fonction ligase et résulte en la poly-ubiquitination K63 de TRAF6 et de NEMO. TRAF6 ubiquitinée recrute TAK1 par l'intermédiaire de TAB2, ce qui résulte en l'activation de TAK1 par autophosphorylation (Chen, 2005). TRAF6 ubiquitinée recrute également IKK grâce à l'UBD, UBA (ubiquitin binding adaptor), de NEMO qui reconnaît spécifiquement les chaînes K63 (Wu et al., 2006 ; Ea et al., 2006) ; ceci conduit à la phosphorylation de IKK par TAK1 sur les sérines 177 et 181 et donc à son activation (Wang et al., 2001 ; figure 12). Le complexe TAK1/TAB2 ainsi activé phosphoryle également MKK6 (MAP (mitogen-activated protéine) kinase kinase 6) conduisant à l'activation des voies JNK et p38 (Wang et al., 2001). De façon intéressante, le complexe TAK1/TAB1, qui peut également activer les voies JNK et p38, ne peut pas activer IKK. Ainsi, TAB2/3 et non TAB1 est nécessaire à l'activation d'IKK par TRAF6 *in vitro*. Ceci suggère que l'ubiquitination de TRAF6 n'est pas seulement requise pour l'activation du complexe TAK1/TAB1/TAB2/3 mais aussi pour l'activation d'IKK par TAK1. Elle permettrait en effet de faciliter la phosphorylation d'IKK par TAK1 en assurant leur rapprochement physique via les chaînes K63 de TRAF6.

Comme décrit dans le modèle précédent, on considère généralement que TRAF6 ubiquitiné recrute IKK ; cependant, de récentes études montrent qu'IRAK1 est conjugué à des chaînes d'ubiquitine K63 et que son ubiquitination est nécessaire à l'activation des voies TLRs et IL-1R. IRAK1 pourrait donc servir, à la place de TRAF6, de plateforme de liaison pour IKK et peut-être pour d'autres protéines (Sun and Ley, 2008).

II.3.2. Activation de IKK par TRAF2 dans la voie du TNFR

En réponse à une stimulation par la cytokine TNF- α , des cellules déficientes en TRAF2 présentent un sévère défaut de signalisation de la voie JNK mais pas des voies NF- κ B (Lee et al., 1997). L'activation normale des voies NF- κ B dans les cellules déficientes en TRAF2 est probablement dû au fait que TRAF2 est redondante avec TRAF5. En effet, l'activation des voies NF- κ B est abolie dans des cellules double-mutantes pour TRAF2 et TRAF5 (Tada et al., 2001). TRAF2/5 est donc requise pour l'activation de la voie du TNFR par le TNF α . Dans cette voie de signalisation, la protéine RIP1 est poly-ubiquitinée K63 suite à la stimulation par le TNF- α (Newton et al., 2008; Wertz et al., 2004). L'ubiquitination de RIP1 n'est pas détectée dans des cellules déficientes en TRAF2 indiquant que TRAF2 est probablement responsable de la poly-ubiquitination de RIP1 (Lee et al., 2004). Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans des études de surexpression, le domaine RING de TRAF2 est indispensable à l'activation des voies NF- κ B (Baud et al., 1999). La poly-ubiquitination de RIP1 a lieu sur sa lysine 377 (Ea et al., 2006), une mutation sur ce résidu empêche son ubiquitination et l'activation de IKK, ce qui suggère que l'ubiquitination de RIP1 est nécessaire à l'activation d'IKK. Une équipe a montré qu'en cas de surexpression de TRAF2, la ligase induit son auto-ubiquitination K63 en association avec TRIKA1 (Ubc13/Uev1a) (Shi and Kehrl, 2003). Cependant, cette ubiquitination ne semble pas nécessaire à l'activation de la voie et connaître son rôle physiologique nécessite plus d'investigations (Adhikari et al., 2007). En outre, un dominant négatif d'Ubc13 bloque l'activation des voies NF- κ B par TRAF2 et TNF- α (Deng et al., 2000). Ceci suggère que TRAF2 a besoin d'Ubc13 pour activer la voie NF- κ B, probablement pour ubiquitiner RIP1. Deux études indépendantes ont montré que NEMO contient un UBD (Ea et al., 2006; Wu et al., 2006) interagissant préférentiellement avec les chaînes K63. Des mutations dans ce domaine empêchent la liaison de NEMO aux chaînes d'ubiquitine K63 et bloquent l'activation d'IKK par le TNF- α .

Toutes ces expériences conduisent au modèle suivant : en cas de stimulation par TNF α , TRAF2/5 est recrutée au niveau des récepteurs. En association avec TRIKA1 (Ubc13/Uev1a), cette ligase conjugue des polymères d'ubiquitine K63 à la protéine adaptatrice RIP1 (receptor interacting protein) qui, par l'intermédiaire de sa chaîne d'ubiquitine, recrute TAK1 et IKK ce qui induit leur activation (figure 12).

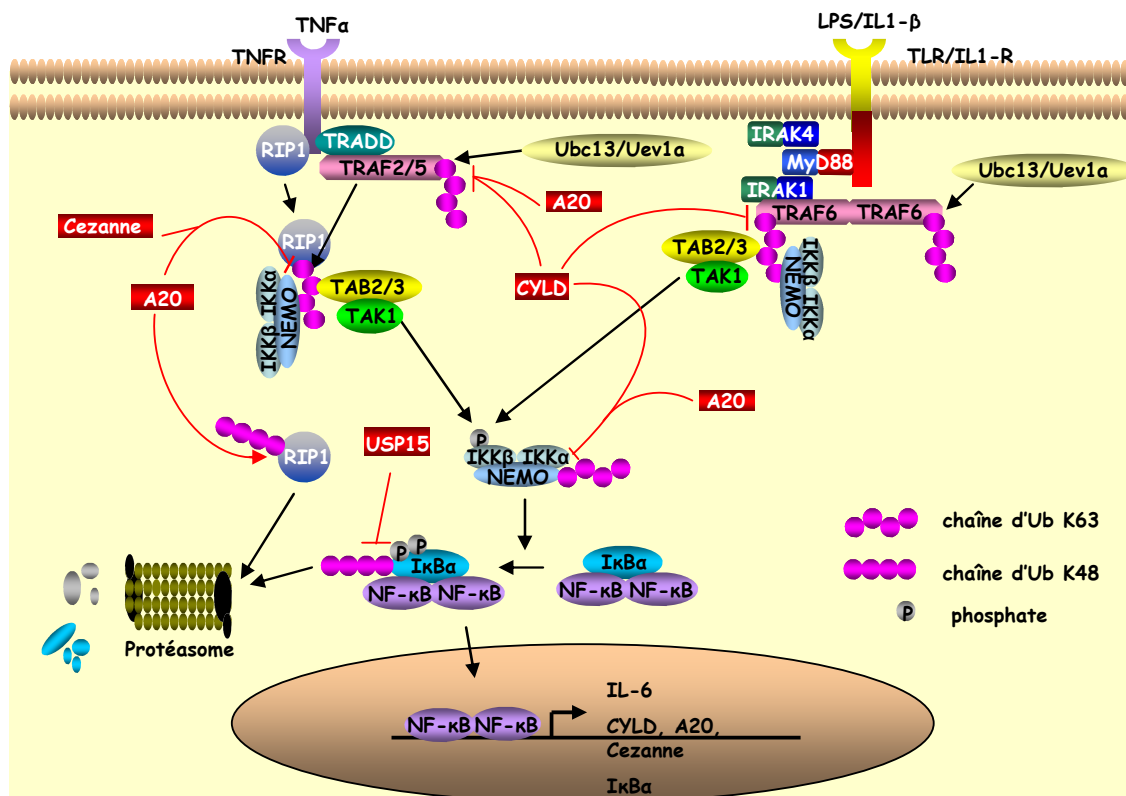


Figure 12. Modèle d'activation des voies du TNFR et des TLRs/IL-1R chez les mammifères. La stimulation du récepteur TNFR par le TNF α induit l'activation de la ligase TRAF2 ou TRAF5 qui, avec la participation du complexe d'E2 Ubc13/Uev1a, attache des polymères d'ubiquitine K63 à RIP1. RIP1 ubiquitiné recrute TAK1 par l'intermédiaire de son partenaire TAB2 ou TAB3. La chaîne K63 de RIP1 recrute également le complexe IKK par l'intermédiaire de NEMO, autorisant la phosphorylation et donc l'activation d'IKK par TAK1. IKK phosphoryle ensuite I κ B α qui est alors poly-ubiquitiné K48 ce qui induit sa dégradation par le protéasome et la libération des facteurs NF- κ B. Ces facteurs de transcriptions entrent alors dans le noyau et induisent la synthèse de gènes impliqués aussi bien dans l'immunité et l'inflammation que dans l'inhibition des voies NF- κ B. Trois de ces inhibiteurs sont des DUBs : CYLD, A20 et Cezanne. Ces DUBs clivent les chaînes K63 « activatrices » de plusieurs composants des voies NF- κ B dont RIP1, IKK et les ligases TRAF2 et TRAF6. A20 fonctionne également comme une ubiquitine ligase capable de lier des chaînes d'ubiquitine K48 à RIP1 entraînant sa dégradation par le protéasome. Les voies de signalisation IL-1R et TLRs activent IKK par l'intermédiaire de la ligase TRAF6 qui s'auto-ubiquitine K63. TRAF6 ubiquitinée sert alors de plateforme pour recruter TAK1 et IKK et induire leur activation. *D'après Adhikari et al., 2007*

Bien qu'abondamment décrit, le fonctionnement des voies TLRs/IL-1R et TNFR n'est encore pas complètement connu. Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les mécanismes de l'ubiquitination qui régulent l'activité de TAK1 et IKK. En particulier, on ne connaît pas le rôle de l'ubiquitination de NEMO et de sa capacité à lier les chaînes d'ubiquitine dans l'activation d'IKK. On ne sait pas comment les protéines ubiquitinées K63, RIP1 et TRAF6, conduisent à l'activation de TAK1 et IKK. On ignore aussi comment l'oligomérisation de TRAF6 induit son activation de ligase et son rôle dans l'activation du complexe TAK1/TAB1/TAB2. Il est également nécessaire de mieux comprendre la fonction de l'ubiquitination de TRAF2 dans la signalisation du TNF α et de prouver qu'elle agit bien comme une ligase sur RIP1.

II.3.3. Régulation négative des voies NF- κ B par déubiquitination

Etant données les conséquences néfastes de l'activation prolongée des voies NF- κ B, il est primordial que ces voies de signalisation soient régulées négativement pour éviter une activation constitutive et pour assurer le retour à la normale après une infection. Les DUBs contribuent à cette régulation en contrant l'action des ligases citées dans les paragraphes précédents.

II.3.3.a) CYLD clive les chaînes d'ubiquitine K63 de TRAF2, TRAF6 et NEMO

CYLD est un membre de la famille des USPs qui régule négativement les voies NF- κ B en ciblant des membres de la famille TRAF, TRAF2 et TRAF6 et la sous-unité NEMO de IKK ; ceci a été montré dans des expériences de surexpression en cellules (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). CYLD est induit en cas de stimulation des récepteurs par le TNF α ou l'IL-1 β (Jono et al., 2004). Un point commun entre toutes les cibles de CYLD est qu'elles sont liées à des polymères d'ubiquitine K63 qui sont nécessaires à leur activation et donc à celle des voies NF- κ B. De nombreuses preuves biochimiques suggèrent que CYLD est spécifique des chaînes K63 (Kovalenko et al., 2003; Massoumi et al., 2006). Le site catalytique de CYLD est très éloigné structurellement des autres USPs et semble avoir une structure particulièrement adaptée pour le clivage des chaînes K63 (Komander et al., 2008). Cependant, il n'est pas certain que CYLD clive exclusivement ce type de polymères car il s'est avéré capable de cliver des chaînes d'ubiquitine K48 *in vitro* (Trompouki et al., 2003) et *in vivo* (Reiley et al., 2006; Xue et al., 2007). Des études récentes montrent que la liaison de CYLD à TRAF6 requiert une protéine adaptatrice p62 qui induit la deubiquitination de TRAF6 par CYLD et module ainsi l'activité de la DUB (Wooten et al., 2008).

II.3.3.b) A20 clive les chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1, TRAF6 et NEMO et associe des polymères d'ubiquitine K48 à RIP1

A20 est une OTU qui réprime constitutivement les voies NF- κ B en clivant les chaînes K63 de RIP1, TRAF6 et NEMO. Ceci a été montré dans des expériences de surexpression en cellules (Boone et al., 2004; Mauro et al., 2006; Wertz et al., 2004). Le gène A20 est induit en

cas d'infection, notamment par le LPS et le TNF α (Hu et al., 1998; Krikos et al., 1992). La particularité de A20 est qu'elle fonctionne à la fois comme une DUB et comme une ligase (Wertz et al., 2004). En effet, A20 catalyse la liaison de polymères d'ubiquitine K48 sur RIP1 par l'intermédiaire de son domaine ZF, ce qui cible RIP1 vers la dégradation par le protéasome. En parallèle, A20 retire les chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1 ce qui, d'une part, inactive le signal transmis par RIP1 et d'autre part, facilite sa conjugaison à des polymères K48 (Wertz et al., 2004). Il semble que l'ubiquitination K48 de RIP1 par A20 demande l'intervention d'une autre E3 ligase, ITCH (Itchy homologue E3 ubiquitin protein ligase) qui s'associe avec A20 (Shembade et al., 2008). Bien qu'A20 semble spécifique des chaînes K63 *in vivo* (Wertz et al., 2004), A20 est capable de couper les deux types de chaînes K48 et K63 *in vitro* avec une préférence pour les K48 (Komander et al., 2008; Lin et al., 2008); il est donc généralement difficile de déduire des tests *in vitro* une préférence physiologique pour un type de chaîne. Une étude *in vitro* récente montre que, plutôt que de désassembler le polymère d'ubiquitine K63 de TRAF6, A20 retire la chaîne intacte de son substrat. Ce mécanisme permet à A20 d'hydrolyser très efficacement les polymères K63 de TRAF6 (Balakirev and Wilkinson, 2008; Lin et al., 2008). Il est probable que la spécificité d'A20 pour des cibles ubiquitinées K63 ne vienne pas intrinsèquement de son site catalytique mais soit due à son interaction spécifique avec des protéines ubiquitinées. La spécificité d'A20 semble aussi dépendre de co-facteurs tels que ABIN1 (A20 binding inhibitor of NF- κ B 1) qui interagit physiquement avec A20 et est nécessaire à son recrutement sur NEMO (Mauro et al., 2006). L'inactivation d'ABIN1 par ARN interférence empêche A20 de cliver les chaînes d'ubiquitine K63 de NEMO.

II.3.3.c) Cezanne clive les chaînes d'ubiquitine K63 de RIP1

Cezanne (cellular zinc finger anti-NF- κ B) a été identifié sur la base de son homologie de séquence avec A20 (Evans et al., 2001). Comme A20, Cezanne est une OTU qui régule négativement la voie du TNFR (Evans et al., 2001). En réponse à l'activation de TNFR, l'expression de Cezanne est induite et la protéine est recrutée au niveau des récepteurs où elle pourrait déubiquitiner RIP1 empêchant ainsi la transduction du signal (Enesa et al., 2008).

II.3.3.d) USP15 clive les chaînes d'ubiquitine K48 de I κ B α

Contrairement à A20, Cezanne et CYLD qui ciblent des éléments en amont de la voie NF- κ B, USP15 clive les chaînes d'ubiquitine K48 associées à l'inhibiteur I κ B α . Ceci a été montré *in vitro* à partir de la protéine USP15 purifiée et de son substrat I κ B, purifié à partir d'extrait de cellules stimulées par le TNF α et traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132. USP15 empêche ainsi la dégradation de I κ B α et permet le maintien des facteurs de transcription inactifs dans le cytoplasme (Schweitzer et al., 2007).

L'ubiquitination participe à l'activation des voies NF- κ B à tous les niveaux de la transduction du signal. La liaison de molécules d'ubiquitine sert à la fois de signal d'activation pour certains intermédiaires des voies NF- κ B, de support physique d'interaction entre protéines ou encore de signal de dégradation permettant la translocation des facteurs NF- κ B. Cette activation est, en partie, régulée négativement par les DUBs qui contrecarrent l'action des E3 ligases. Les DUBs assurent ainsi la répression constitutive du signal et le retour à la normale après une infection. Ces voies de signalisation sont conservées chez la drosophile où elles participent efficacement à la réponse immunitaire. La partie suivante illustre cette conservation ainsi que celle des protéines du « système ubiquitine » impliquées dans la régulation de ces cascades de signalisation.

III. Conservation des voies NF- κ B chez la drosophile et leur rôle dans l'immunité

Chez la drosophile il existe deux voies impliquant des facteurs NF- κ B-like, Toll et Imd (Immune deficiency), respectivement très similaires aux voies des TLRs/IL-1R et du TNFR. Ces voies de signalisation contribuent efficacement à l'immunité de l'organisme en induisant l'expression de peptides anti-microbiens dans les cellules épithéliales, les cellules sanguines circulantes, et dans le corps gras, organe souvent comparé au foie des mammifères. (Ferrandon et al., 2007). Sept familles différentes de peptides antimicrobiens ont été caractérisées chez la drosophile (Meister et al., 2000). Elles peuvent être assemblées en trois groupes qui se distinguent par leur spectre d'action *in vitro*. Les Défensines constituent un exemple de peptides antibactériens particulièrement actifs contre les bactéries à Gram positif. La Drosomycine et la Metchnikowine sont des peptides antifongiques ; alors que la Diptéricine, l'Attacine, la Cécropine et la Drosocine sont principalement actifs contre les bactéries à Gram négatif. Les peptides antimicrobiens sont pour la plupart cationiques, ce qui leur permettrait de s'accumuler sur la paroi bactérienne chargée négativement, de déstabiliser la membrane plasmique en s'y insérant et entraîner ainsi la lyse bactérienne (Shai, 1999).

III.1. La voie Toll

La voie Toll fait intervenir le récepteur du même nom (Figure 13), elle est essentielle pour lutter contre les infections par des bactéries à Gram positif et des champignons (Rutschmann et al., 2002). Il a également été mis en évidence un rôle important de cette voie dans la résistance aux virus (Zambon et al., 2005). Historiquement, la voie Toll a d'abord été identifiée pour son rôle dans l'établissement de l'axe dorso-ventral chez l'embryon (Belvin and Anderson, 1996) ; puis son implication dans la réponse immunitaire a été caractérisée (Lemaitre et al., 1996).

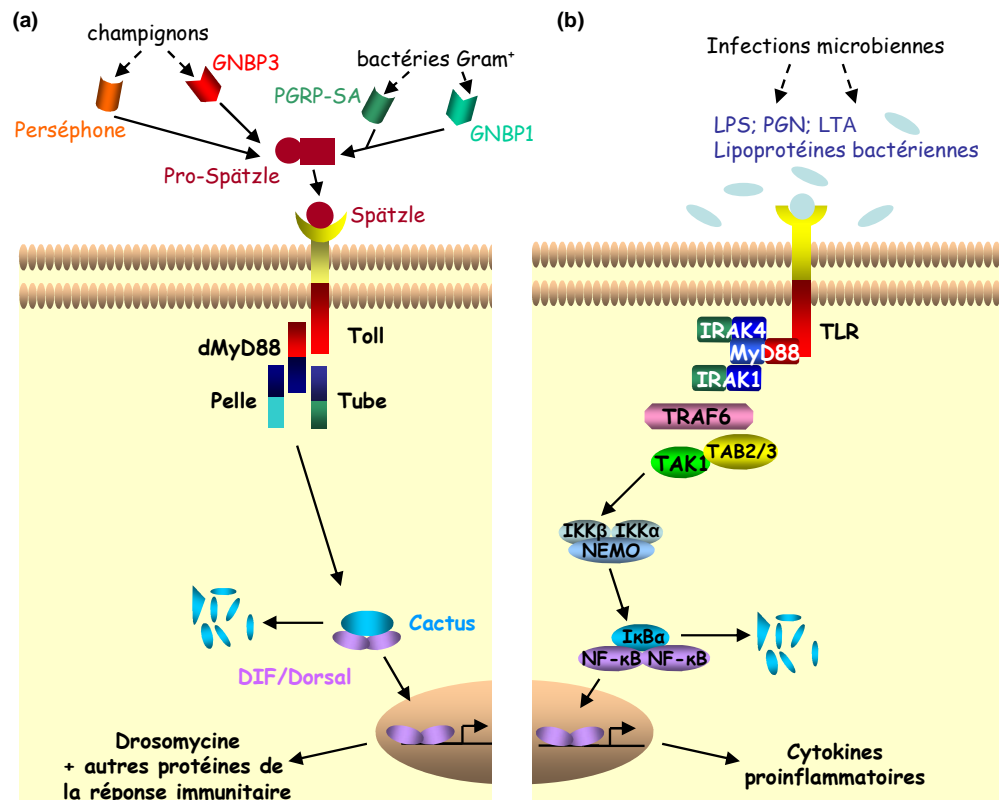


Figure 13. Modèle d'activation des facteurs NF- κ B par les voies Toll/TLRs chez la drosophile et les mammifères respectivement. L'activation indirecte du récepteur Toll par les champignons et les bactéries à Gram positif chez la drosophile (a) et l'activation directe des TLRs par les motifs microbiens chez les mammifères (b) induit la synthèse de Drosomycine et de molécules pro-inflammatoires. LPS : lipopolysaccharide ; PGN : peptidoglycane ; LTA : acide lipotéichoïque. D'après Lemaître et Hoffmann, 2007 et Adhikari et al., 2007.

Lors d'une infection, l'activation de la voie Toll nécessite divers partenaires extracellulaires. Les champignons sont reconnus par le récepteur circulant GNBP3 (Gram negative binding protein 3) (Gottar et al., 2002) ou induisent l'activation de la sérine protéase Perséphone (Ligoxygakis et al., 2002b); alors que les bactéries à Gram positif interagissent avec le complexe GNBP1/PGRP-SA (peptidoglycan recognition receptor protein SA) et PGRP-SD (Bischoff et al., 2004). Cette reconnaissance permet l'activation d'une cascade de prophénoloxydases qui aboutit au clivage de la cytokine pro-Spätzle. Spätzle se fixe alors au récepteur Toll qui, contrairement aux TLRs, ne reconnaît pas directement les motifs microbiens (Lemaître et al., 1996). Ceci induit la dimérisation du récepteur Toll (Nicolas et al., 1998) qui recrute alors trois protéines contenant un « death domain », dMyD88, Tube et Pelle, cette dernière étant également une sérine/thréonine kinase (Tauszig-Delamasure et al., 2002). Par un mécanisme qui n'est pas encore complètement caractérisé, Cactus, une protéine I κ B-like est phosphorylée ce qui induit son ubiquitination K48 et sa dégradation par le protéasome (Nicolas et al., 1998). Des modèles proposent que Pelle phosphoryle Cactus mais

la preuve de cette réaction reste à fournir (Yang and Steward, 1997). En conséquence de la dégradation de Cactus, les facteurs de transcription de la famille Rel, DIF (Dorsal-related Immune Factor) et Dorsal, transloquent dans le noyau (Lemaitre et al., 1995b) où ils activent la synthèse de peptides antimicrobiens dont la Drosomycine, spécifique des bactéries à Gram positif et des champignons (Lemaitre et al., 1996). DIF et Dorsal semblent avoir des fonctions redondantes dans le contrôle de la Drosomycine durant le stade larvaire alors que DIF est suffisant pour l'activation de la voie Toll chez les adultes (Rutschmann et al., 2000). De nombreux éléments de la voie Toll sont induits en cas d'infection (De Gregorio et al., 2002; Lemaitre et al., 1996). C'est le cas de l'inhibiteur Cactus qui établit ainsi une boucle de rétroaction négative de cette cascade (Nicolas et al., 1998). Le génome de la drosophile code huit autres récepteurs Toll dont la plupart ne semble pas impliquée dans la réponse immunitaire (Ooi et al., 2002). Seul le membre de la famille Toll, *w18*, est induit en cas d'infection et serait nécessaire à la synthèse de tous les peptides antimicrobiens au stade larvaire. Les mutants *w18* présentent des défauts de maturation du corps gras qui pourraient expliquer l'effet général sur les peptides antimicrobiens (Ligoxygakis et al., 2002a; Williams et al., 1997).

La fonction de la voie Toll dans l'immunité ne se limite pas à l'induction des peptides antimicrobiens. D'après des analyses transcriptomiques sur puces à ADN, près de 400 gènes semblent régulés suite à une infection bactérienne ou fongique (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio et al., 2002; Irving et al., 2001). L'activation de la voie Toll n'est pas uniquement linéaire, il existerait différents branchements en aval du récepteur. Notamment, une étude suggère une activation de la voie JNK par la voie Toll chez la drosophile adulte (Boutros et al., 2002). L'équipe de Perrimon a montré que l'expression du gène *flightin* (*fln*), codant une protéine structurale du cytosquelette et activé en cas de blessure septique, est diminuée dans des mutants *JNKK* (*JNK kinase*) ou *Toll* en cas d'infection par du LPS. Ceci montre que *fln* est sous le contrôle des voies JNK et Toll, ce qui suggère que la voie Toll agit en amont de la voie JNK pour induire l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux blessures septiques (Boutros et al., 2002).

III.2. La voie Imd

La voie Imd (immune deficiency) est stimulée par les bactéries à Gram négatif et induit notamment la synthèse de la Diptéricine (Lemaitre et al., 1995a ; figure 14). Cette voie a été caractérisée à la suite de l'identification de la mutation *immune deficiency (Imd)* qui empêche l'expression de plusieurs gènes codant des peptides antimicrobiens mais n'affecte pas la synthèse de Drosomycine (Lemaitre et al., 1995a). Les mouches mutantes pour *Imd* sont sensibles aux infections à Gram négatif mais restent relativement résistantes aux bactéries à Gram positif et aux champignons. *Imd* code une protéine contenant un « death domain » tout comme RIP1 et sa surexpression induit la synthèse de peptides antimicrobiens en l'absence d'infection (Georgel et al., 2001). Des études supplémentaires ont permis l'identification d'autres composants de la voie de signalisation impliquant Imd. En amont de la voie on trouve un récepteur PGRP-LC (Peptidoglycan recognition protein LC) qui lie directement les motifs bactériens tels que le PGN de type DAP (Peptidoglycane de type acide meso-diaminopimelique, typique des bactéries à Gram négatif) et recrute la protéine adaptatrice Imd (Choe et al., 2005). Imd interagit ensuite avec dFADD qui se lie à la caspase DREDD (Hu and Yang, 2000). L'équipe de Hultmark a proposé que DREDD s'associe avec le facteur NF- κ B, Relish, qui comme les protéines NF- κ B mammifères, p100 et 105, est composé d'un domaine Rel et d'une partie inhibitrice I κ B-like riche en ankirine. DREDD cliverait la partie I κ B-like de Relish après que celle-ci ait été phosphorylée (Stoven et al., 2000). Après le clivage de Relish, son domaine Rel entre dans le noyau pour activer ces gènes cibles alors que le domaine inhibiteur reste dans le cytoplasme (Silverman et al., 2000). Relish est phosphorylé par le complexe dIKK (Silverman et al., 2000), dIKK lui-même serait activé par dTAK1 et son adaptateur dTAB2 dans un processus qui ferait intervenir Imd et peut-être dFADD. La ligase dIAP2 (drosophila inhibitor of apoptosis 2) pourrait activer dTAK1 par l'intermédiaire de son domaine RING (Leulier et al., 2006). Pour l'instant, les mécanismes reliant Imd au complexe dIKK ainsi que les rôles précis de dTAK1 et dTAB2 ne sont pas connus.

Plusieurs études transcriptomiques globales par puces à ADN ont révélé que cette voie contrôle l'expression d'environ 250 gènes impliqués dans le stress et la réponse immunitaire (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio et al., 2002; Irving et al., 2001).

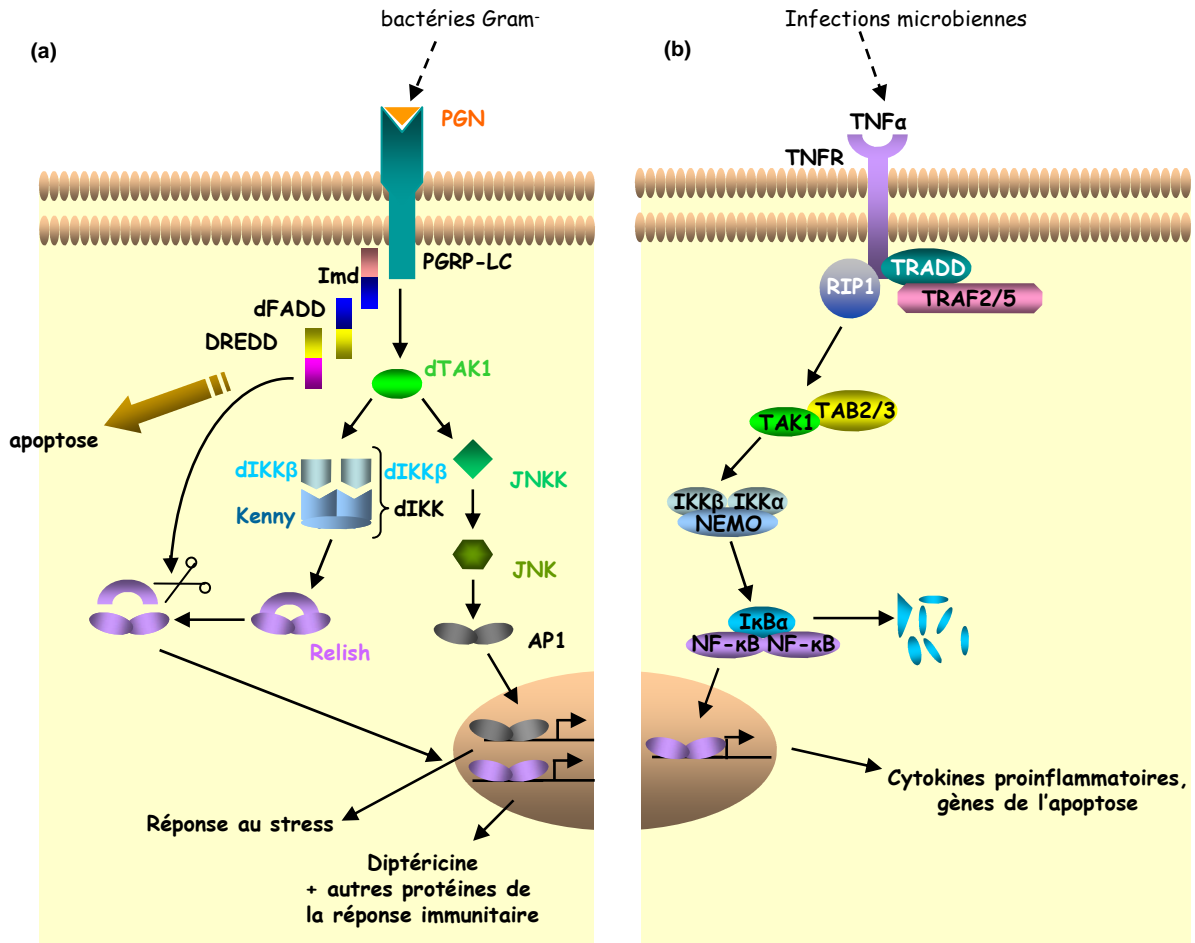


Figure 14. Modèle d'activation des facteurs NF- κ B par les voies Imd/TNFR chez la drosophile et les mammifères respectivement. L'activation de NF- κ B par la voie Imd (bactéries à Gram négatif) chez la drosophile (a) et la voie du TNFR chez les mammifères (b) induit la synthèse de Diptéricine et une réponse inflammatoire et/ou pro-apoptotique. D'après Lemaitre et Hoffmann, 2007 et Adhikari et al., 2007.

La voie Imd active aussi la voie JNK par l'intermédiaire de *dTAK1* qui pourrait directement phosphoryler *JNKK* (JNK kinase) (Silverman et al., 2003). La voie JNK est impliquée chez la drosophile dans la morphogénèse, l'immunité et l'apoptose (Stronach and Perrimon, 1999), elle participe également à la réparation tissulaire mais ne semble pas avoir un rôle direct sur l'expression des peptides antimicrobiens *in vivo* (Park et al., 2004). Il existe une inter-régulation entre la voie JNK et la voie Imd : la répression de la voie JNK après son activation dépend de l'activité de *Relish* et de la dégradation de *dTAK1* par le protéasome (Park et al., 2004 et paragraphe III.4.2). Réciproquement, il a été montré un rôle de la voie JNK dans le contrôle négatif de l'activation de *Relish* (Kim et al., 2005a).

Contrairement à la voie Toll, la voie Imd ne semble pas impliquée dans le développement car les mutants des différents éléments de cette voie tels que *PGRP-LC*, *Imd* ou *dTAK1* sont parfaitement viables (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

III.3. Interaction entre les voies Toll et Imd

Des études sur puces à ADN utilisant les doubles mutants *Imd/Toll* ont montré que ces voies régulent près de 80% des gènes induits par blessure septique, reflétant leur importante contribution dans la survie des mouches en cas d'infection (De Gregorio et al., 2002).

Ces deux voies étant les seules cascades activées par des ligands bactériens, on peut se demander si elles peuvent coopérer pour répondre plus efficacement contre certains pathogènes. Ceci serait rendu possible par la formation d'hétérodimères Dif/Relish par exemple. Des données allant dans ce sens montrent qu'il serait en effet réducteur de considérer un modèle sélectif d'activation des voies Toll et Imd par des bactéries à Gram positif et négatif respectivement.

En effet, les pathogènes à Gram négatif sont capables d'activer une légère expression transitoire de la Drosomycine (figure 15). De même, la voie Toll est nécessaire à la réponse aux infections par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif (Lau et al., 2003). La voie Toll ainsi que la voie Imd participent toutes deux, et probablement en synergie, à la réponse immunitaire en réponse à une infection par *P. aeruginosa* (Lau et al., 2003). Une étude en cellules S2 a d'ailleurs prouvé que ces voies peuvent coopérer pour induire efficacement l'expression des peptides antimicrobiens (Tanji et al., 2007).

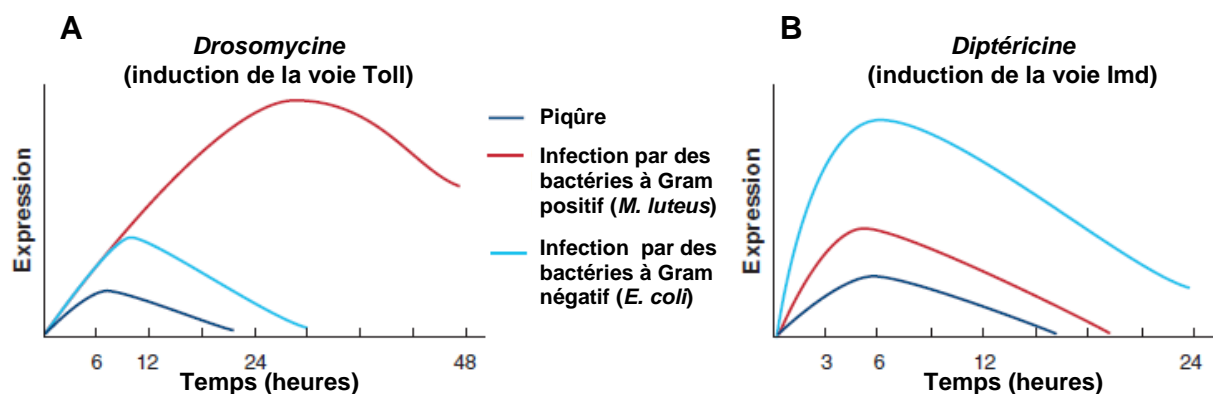


Figure 15. Induction des gènes codant la Drosomycine et la Diptéricine en réponse à une infection par *Micrococcus luteus* (bactérie à Gram positif) et *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif). La Diptéricine est induite rapidement et de manière transitoire suite à une infection par *E. coli* (A), tandis que la Drosomycine montre un profil d'expression tardif et supporté en réponse à une infection par *M. luteus* (B). *D'après Lemaitre et Hoffmann, 2007.*

Inversement, la voie Imd est également impliquée dans la lutte contre certaines bactéries à Gram positif comme *Micrococcus luteus* : une mutation seule d'un élément des

voies Toll ou Imd ne suffit pas à rendre les mouches sensibles ; elles le deviennent en cas de double mutation *spaetzle/relish* (De Gregorio et al., 2002). D'autres résultats montrent que différentes espèces de champignons ou de bactéries à Gram positif induisent une expression sélective des peptides antimicrobiens dépendant de Dif et/ou Relish (Hedengren-Olcott et al., 2004).

III.4. L'ubiquitination dans les voies Toll et Imd

III.4.1. L'ubiquitination dans la répression des voies Toll et Imd

Au début des années 2000, on connaissait la plupart des composants des voies Toll et Imd mais on ignorait encore les mécanismes qui réprimaient les gènes codant les peptides antimicrobiens en l'absence d'infection ou qui les régulaient négativement après une infection. Afin de rechercher des régulateurs négatifs de la voie Imd, l'équipe de Lemaître a réalisé un crible des mutations induisant constitutivement l'expression de la Diptéricine (Khush et al., 2002). Ce crible a mis en évidence SkpA dont l'inactivation induit l'expression constitutive de la Diptéricine mais pas de la Drosomycine. SkpA est un homologue de Skp1 un composant du complexe SCF- β TrCP (*Skp1-CUL1-F-box* ligase containing the F-box protein β TrCP). Les mutations identifiées dans SkpA touchent une zone conservée nécessaire à l'interaction avec les autres protéines du complexe SCF et empêcherait donc la formation de ce complexe. Chez la drosophile, SkpA fonctionne avec la protéine Slimb contenant un domaine F-box et la protéine Cullin-like, Cullin1 (dCul1), dans un complexe SCF (Bocca et al., 2001). De façon intéressante, des larves mutantes pour *Slimb* (Jiang and Struhl, 1998), *dCul1* ou *DTSS5* (Covi et al., 1999) qui affecte la sous unité 26S du protéasome, présentent les mêmes phénotypes que les mutants *SkpA*. Ceci suggère que le complexe ubiquitine ligase SCF^{SkpA/dCul1/Slimb} réprime la voie Imd en ciblant un élément de cette voie vers la dégradation par le protéasome. Comme l'homologue mammifère de Slimb est présent dans un complexe SCF induisant à la fois la maturation et la dégradation de p105 (Karin and Ben-Neriah, 2000), les auteurs ont testé et prouvé l'interaction entre SCF^{SkpA/dCul1/Slimb} et Relish. Ils en déduisent qu'en l'absence d'infection, Relish (la protéine entière ainsi que sa partie Rel active seule) serait régulé par le complexe SCF^{SkpA/dCul1/Slimb} qui induirait sa dégradation par le protéasome (Khush et al., 2002).

En ce qui concerne la régulation négative de la voie Toll en l'absence d'infection, c'est un tout autre mécanisme qui a été mis en évidence par le groupe de Govind. Il fait intervenir

une E2, Ubc9, catalysant non pas l'attachement d'ubiquitine à des protéines cibles mais la liaison de SUMO (small ubiquitin-like modifier) (Chiu et al., 2005). Alors que SUMO est structurellement très proche d'une molécule d'ubiquitine et que l'ubiquitination et la sumoylation font appel au même genre de processus enzymatiques (E1 -> E2 -> E3), la conjugaison de SUMO ou d'ubiquitine sur une même protéine peut avoir des effets opposés. C'est ce qui se passe avec Ubc9. L'inactivation d'*Ubc9* dans des larves de drosophiles induit une expression constitutive de la Drosomycine suggérant son implication dans la répression de voie Toll. En outre, des études d'épistasie montrent qu'Ubc9 agit en amont de l'inhibiteur Cactus et des facteurs Dif et Dorsal. En accord avec la fonction d'Ubc9 chez les mammifères (Hay et al., 1999), les auteurs proposent qu'Ubc9 sumoyle Cactus, l'empêchant d'être phosphorylé et donc dégradé, participant ainsi à la rétention des facteurs NF- κ B dans le cytoplasme (Chiu et al., 2005). Cette hypothèse nécessite, pour être confirmée, la mise en évidence de la sumoylation de Cactus.

L'équipe de Lemaître a découvert une protéine virale bloquant la dégradation de Cactus en étudiant les effets de l'expression de la protéine virale Vpu *in vivo* chez la drosophile. Ils ont montré que l'expression de Vpu dans le corps gras de mouches adultes les rend sensibles aux infections par des champignons mais pas par des bactéries à Gram négatif. Ceci indique que Vpu pourrait être impliquée dans la régulation de la voie Toll. Des expériences de surexpression de Vpu en cellules de drosophile montrent que cette protéine empêche la dégradation de Cactus. Seule la forme phosphorylée de Vpu est capable d'inhiber la voie Toll, ceci indique que Vpu agirait de la même façon sur Cactus que sur l'inhibiteur I κ B α mammifère (Bour et al., 2001), c'est à dire en prenant sa place au niveau de l'interaction avec la protéine β TrCP du complexe ligase SCF- β TrCP, empêchant ainsi son ubiquitination et sa dégradation (Leulier et al., 2003). La protéine β TrCP de drosophile qui serait impliquée dans ce mécanisme n'a cependant pas encore été identifiée et il ne s'agirait pas de Slimb impliquée dans la régulation négative de la voie Imd (Khush et al., 2002; Leulier et al., 2003).

III.4.2. Régulation de dTAK1 par l'ubiquitination et terminaison du signal

Le mécanisme d'activation de dTAK1 chez la drosophile, encore méconnu aujourd'hui, a été partiellement élucidé par l'équipe de Maniatis. Sur la base du fait qu'en cellules humaines, l'activation de TAK1 et dIKK requiert une ligase TRAF et le complexe d'E2, Ubc13/Uev1a, ils ont trouvé les homologues de ces deux E2 chez la drosophile. Comme

en cellules de mammifères, ces deux protéines s'associent. Leur inactivation par ARN interférence en cellules de drosophile induit une diminution de la synthèse de Diptéricine mais n'affecte pas le niveau de Drosomycine en réponse aux infections, suggérant que leur rôle se limite à la voie Imd. Des expériences en cellules montrent également que le complexe dUbc13/dUev1a est nécessaire à l'activation de dIKK et des expériences d'épistasie en cellules indiquent que le complexe agit en aval d'Imd et en amont de dTAK1. Ceci suggère que la fonction du complexe est conservée. Cependant la ligase analogue à TRAF2 ou TRAF6 susceptible d'interagir avec dUbc13/dUev1a pour catalyser la formation de polymères K63 n'a pas encore été caractérisée. La protéine de drosophile dTRAF2, homologue à TRAF6, est la seule protéine TRAF de drosophile ayant un domaine RING et semblerait a priori un bon candidat. Cependant, cette protéine ne paraît pas impliquée dans les voies Toll ou Imd d'après les expériences du groupe de Maniatis (Zhou et al., 2005). En revanche, l'équipe de Manley dévoile une interaction entre dTRAF2 et Pelle (Shen et al., 2001) et le groupe de Chung montrent que les mutants dTRAF2 ne sont pas capables d'induire une réponse antimicrobienne optimum en cas d'infection par des bactéries *Escherichia coli* (Cha et al., 2003). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier le rôle de dTRAF2 dans les voies Toll et Imd. L'équipe de Meier a suggéré que la ligase dIAP2, indispensable à la résistance aux bactéries à Gram négatif, pourrait remplir la fonction de TRAF6 mammifère (Leulier et al., 2006). Leurs expériences d'épistasie suggèrent que dIAP2, intervient au niveau de dTAK1, ce qui renforce leur hypothèse.

En plus de participer à l'activation de la voie Imd, dTAK1 est également indispensable à l'activation de la voie JNK et sa dégradation est requise pour terminer le signal JNK (Park et al., 2004). La ligase responsable de l'ubiquitination de dTAK1 n'avait pas été identifiée lors de l'étude du groupe de Vasserman. L'équipe d'Aigaki a identifié la ligase POSH (plenty of SH3) dont la mutation implique un retard dans l'activation et la terminaison de l'induction de puckered (puc) et de la Diptéricine respectivement sous le contrôle des voies JNK et Imd (Tsuda et al., 2005). Ceci indique que POSH est requise pour une activation et une terminaison rapide de la réponse immunitaire induite par ces deux voies de signalisation. Des expériences de Pull-down et de double hybride ont prouvé que POSH interagit avec dTAK1 et qu'elle induit sa dégradation par son activité ligase. Etant donnée la position charnière de dTAK1, sa dégradation conduit à la terminaison des deux voies JNK et Imd ; cependant leurs cinétiques d'extinction sont très différentes. Les gènes induits par la voie JNK répondent de façon transitoire (une heure) alors que ceux transcrits en réponse à la voie Imd s'expriment sur une longue durée (plusieurs heures). Cette différence peut s'expliquer par le fait que

l'activation de la Jun kinase repose sur une phosphorylation, modification rapidement réversible alors que celle de Relish repose sur son clivage irréversible. De plus, la partie Rel de Relish, transloquée dans le noyau, peut rester liée à ces gènes cibles longtemps après la terminaison du signal dans le cytoplasme (Park et al., 2004). La différence des cinétiques d'activation des voies JNK et NF- κ B est conservée chez les mammifères et pourrait s'expliquer par un mécanisme analogue (Park et al., 2004).

III.4.3. Implication des DUBs dans la voie Imd

A ce jour aucune DUB n'est connue pour être impliquée dans la régulation de la voie Toll et seulement dCYLD participe à la régulation de la voie Imd. Il s'agit de l'homologue de CYLD chez la drosophile. Le groupe de Mosialos a montré que l'inactivation de *dCYLD* induit une expression constitutive de la Diptérine mais pas de la Drosomycine suggérant son implication dans la voie Imd uniquement. Par ailleurs, la surexpression de dCYLD inhibe l'expression de la Diptéricine dans des mouches infectées par des bactéries *Escherichia coli* et il interagit physiquement avec Kenny, l'orthologue fonctionnel de la sous unité NEMO chez la drosophile. La mutation de *dCYLD* rend les mouches sensibles à des infections par des bactéries aussi bien à Gram positif que négatif. Ceci peut être expliqué par le fait que les mutants *dCYLD* présentent des défauts morphologiques important du corps gras (Tschritzis et al., 2007). L'équipe de Xu a montré que dCYLD avait également un rôle dans la voie JNK. Les mutants *dCYLD* et *dTRAF2* présentent une réduction de l'activation de *puckered* en cas de stimulation de la voie JNK indiquant que ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de cette voie. Leurs expériences d'épistasie *in vivo* situent dCYLD en amont de dTRAF2 et ils observent que dCYLD déubiquitine dTRAF2 *in vivo* assurant ainsi la régulation négative de la voie JNK (Xue et al., 2007). Ce dernier exemple illustre bien la conservation de la fonction des DUBs dans la signalisation NF- κ B ainsi que la conservation de leurs interactions avec leurs partenaires.

Les études chez la drosophile confirment et renforcent les modèles obtenus à partir d'expériences en cellules humaines et réciproquement. La grande conservation des voies de signalisation, de leurs régulateurs et des processus de régulation confirme la pertinence de ce modèle pour rechercher des protéines inhibitrices des voies NF- κ B et analyser leurs fonctions *in vivo* dans un organisme entier.

PARTIE B

RESULTATS

I. La déubiquitine dUSP36/Scrawny cible Imd pour empêcher l'activation de la réponse immunitaire chez la drosophile

I.1. Résumé de l'article

Avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs lignées contenant des insertions P{UAS} ont été testées pour leur sensibilité à des infections par des bactéries à Gram négatif. Ces lignées ont été croisées avec des lignées inductrices daGal4 permettant l'expression ubiquitaire du gène ciblé par l'insertion des séquences UAS (voir annexe 1). La descendance a été infectée par piqure septique par la bactérie pathogène à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*. Ce crible a mis en évidence la lignée P{Mae-UAS.6.11.}UY1507. Cette lignée contient une séquence UAS en amont du gène *CG5505* de drosophile qui code une USP homologue à la protéine humaine USP36. L'équipe a construit une lignée transgénique P{UAS-*dUsp36*} et a montré que l'expression de dUSP36, sous le contrôle d'un promoteur HS, induit une diminution de l'expression de la *Diptéricine (Dipt)* et rend les mouches sensibles en cas d'infection par des bactéries à Gram négatif (voir article, Figure 1).

Afin de confirmer la fonction de *dUsp36 in vivo*, l'équipe a créé un mutant pour ce gène, *dUsp36⁴⁴³*, ainsi qu'une lignée P{UAS-*dUsp36-IR*} capable d'inactiver *dUsp36 in vivo* par ARN interférence. La mutation, ainsi que l'inactivation dans le corps gras, de *dUSP36* sont létales au stade larvaire indiquant que dUSP36 est nécessaire durant le développement. Nous avons donc utilisé un système de sauvetage conditionnel permettant le développement des mouches mutantes pour *dUSP36* en présence du transgène exprimant dUSP36 et dans lesquelles l'inactivation de ce transgène est induite au stade adulte uniquement (voir article et annexe 1). De la même façon, l'inactivation de *dUsp36* par ARN interférence dans les mouches contenant l'élément P{UAS-*dUsp36-IR*} n'a été induite qu'au stade adulte. Les mouches n'exprimant plus dUSP36 présentent une expression constitutive de *Dipt*, ce qui traduit une activation permanente de la voie Imd. De même, les mouches dans lesquelles *dUsp36* est spécifiquement inactivé dans le corps gras expriment en permanence la *Dipt* et *puckered* (voir article figure 2). Ceci suggère que l'absence de dUSP36, dans le corps gras, induit une activation constitutive des voies Imd et JNK. dUSP36 est donc requis, dans le corps gras, pour empêcher l'activation constitutive des voies Imd et JNK en l'absence d'infection.

Des expériences de biochimie ont montré que dUSP36 est capable d'hydrolyser la liaison peptidique d'un substrat mono-ubiquitiné et de cliver des polymères d'ubiquitine de type K48 et K63 *in vitro*. La mutation de la cystéine et de l'histidine catalytique de dUSP36 rend impossible l'hydrolyse des substrats ubiquitinés (voir article figure 3). Contrairement à la forme sauvage, la surexpression d'une forme mutée de dUSP36 *in vivo* n'empêche pas l'activation de la voie Imd et n'affecte pas la sensibilité des mouches en cas d'infection par des bactéries à Gram négatif (voir article figure 4). Ces expériences suggèrent que dUSP36 est une DUB active et que son activité catalytique est essentielle pour son rôle dans la répression de la voie Imd. dUSP36 pourrait donc agir en déubiquitinant un élément de la voie Imd.

L'effet de la perte d'expression de dUSP36 sur les deux voies Imd et JNK suggère que dUSP36 agit en amont de dTAK1. J'ai réalisé des expériences d'épistasie *in vivo* afin de situer le niveau d'action de dUSP36 dans la voie Imd. La surexpression de certains éléments de la voie Imd comme PGRP-LC, Imd ou dTAK1 induit une activation constitutive de la voie qui peut être visualisée par l'expression de *Dipt*. J'ai co-exprimé dUSP36 avec PGRP-LC, Imd ou dTAK1 et mesuré par QPCR le niveau d'induction de *Dipt*. L'expression de dUSP36 diminue le niveau de *Dipt* induit par l'expression de PGRP-LC, mais n'a pas d'effet sur le niveau de *Dipt* induit par Imd ou dTAK1 (voir article figure 5A et S2). Ceci suggère que dUSP36 agit en aval de PGRP-LC et en amont de dTAK1 et Imd. Ainsi, si dUSP36 agit en amont ou sur Imd, la dérégulation de la voie observée dans les mouches mutantes pour dUSP36 doit dépendre d'Imd. Pour tester cette hypothèse, nous avons inactivé de façon conditionnelle à la fois Imd et dUSP36 dans le corps gras. L'induction constitutive de *Dipt* observée en cas d'inactivation de dUSP36 n'est plus observée si on inactive également Imd (voir article figure 5B). La dérégulation de la voie Imd induite par l'inactivation de dUSP36 requiert donc strictement Imd.

Des expériences de co-immunoprécipitation et de pull-down ont montré que dUSP36 interagit avec Imd via sa partie C-terminale. Ceci indique qu'Imd est une cible de dUSP36. Lors des expériences d'épistasie *in vivo*, nous n'avons pourtant pas observé de répression par dUSP36 de l'activation de la voie induite par l'expression d'Imd. Le manque d'effet de dUSP36 pourrait être dû à un excès de substrat. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait trouver des conditions induisant une expression d'Imd plus faible sans affecter le niveau d'expression de dUSP36. Or, comme ces deux gènes sont sous le contrôle d'un même promoteur, cela requiert la construction de nouvelles souches.

Comme Imd contient un death domain, comme la protéine adaptatrice RIP1, et qu'il joue également le rôle de protéine adaptatrice dans la voie Imd, ces deux protéines pourraient être régulées suivant le même mécanisme. Nous avons en effet observé que, comme RIP1, Imd est ubiquitiné quand il est exprimé dans des cellules S2 de drosophile. Lorsqu'on co-exprime dUSP36, on perd les formes ubiquitinées d'Imd et la quantité totale d'Imd diminue. Si on ajoute un inhibiteur du protéasome, on restaure une quantité normale d'Imd dans la cellule et on retrouve une partie de l'ubiquitination d'Imd (voir article figure 6). Cette partie correspond probablement aux formes d'Imd ubiquitiné K48, les autres formes étant toujours hydrolysées par dUSP36. Ceci suggère que dUSP36 hydrolyse les polymères K63 liés à Imd et induit indirectement son ubiquitination K48 et sa dégradation par le protéasome (voir article, modèle figure 7). Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier en utilisant, par exemple, des anticorps spécifiques des polymères K63 et K48.

Puisque l'inactivation de *dUSP36* provoque une dérégulation constitutive de la voie Imd, il est très probable qu'en conditions normales la voie Imd soit maintenue à un niveau de base régulé par l'équilibre entre l'ubiquitination et la déubiquitination d'Imd. dUSP36 serait donc nécessaire au maintien du niveau basal d'Imd. Il reste à déterminer par quels mécanismes dUSP36 est inhibé en cas d'activation de la voie. En effet, si un niveau constant de dUSP36, en l'absence d'infection, est requis pour maintenir une inhibition constante de la voie Imd, un signal spécifique, probablement déclenché par l'infection, doit permettre de bloquer l'activité de dUSP36 pour permettre le déclenchement de la réponse immunitaire. On a observé que cette régulation ne se fait pas au niveau transcriptionnel puisque le niveau de transcrits de *dUsp36* n'est pas diminué en cas d'infection. La régulation négative de dUSP36 se fait donc probablement au niveau de la protéine ; cette hypothèse est renforcée par le fait que dUSP36 contient un domaine PEST caractéristique des protéines instables et qui pourrait induire sa dégradation en cas d'infection (Kim et al., 2005b).

I.2. Article : Thevenon et al.,**The Ubiquitin Specific Protease dUSP36/Scrawny targets IMD to prevent *Drosophila* immune signalling**

Thevenon Dominique, Engel Elodie, Avet-Rochex Amélie, Gottar Marie, Bergeret Evelyne, Tricoire Hervé, Benaud Christelle, Baudier Jacques, Taillebourg Emanuel and Fauvarque Marie-Odile.

Title: The Ubiquitin Specific Protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent *Drosophila* immune signalling

Thevenon Dominique^{1,2,3}, Elodie Engel^{1,2,3}, Avet-Rochex Amélie^{1,2,3,*}, Gottar Marie^{1,2,3,**}, Bergeret Evelyne^{1,2,3}, Tricoire Hervé⁴, Benaud Christelle^{1,2,3}, Baudier Jacques^{1,2,3}, Taillebourg Emmanuel^{1,2,3} and Fauvarque Marie-Odile^{1,2,3}.

Affiliations

¹ CEA, iRTSV, LTS, F-38054 Grenoble, France

² INSERM U873, F-38054 Grenoble, France

³ Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France

⁴ IJM, CNRS UMR7592, Université Paris 7, F-75205 Paris, France

Present addresses:

*CNRS, UMR 5547, 31062 Toulouse, France

** Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland.

Contact

Marie-Odile Fauvarque: email, marie-odile.fauvarque@cea.fr

Phone +33 4 3878 2637, Fax +33 4 3878 5052

Key words: IMD; NF- κ B; JNK, PGRP-LC, ubiquitin

Running title: *Drosophila* USP36 prevents IMD-dependent signals

- SUMMARY-

Ubiquitin proteases have recently emerged as key regulators of signal transduction through the removal of ubiquitin monomers or polymers which modify the stability or activity of proteins. Starting from a genetic screen, we describe the drosophila Ubiquitin Specific Protease 36 (dUSP36) function in the negative regulation of the Immune deficiency (IMD) pathway. We show that dUSP36 is an active ubiquitin protease which overexpression suppresses fly immunity against Gram-negative pathogens via its catalytic activity. In the opposite, *dUsp36* loss-of-function provokes IMD-dependent constitutive activation of IMD-downstream pathways, namely Jun kinase (JNK) and NF- κ B, but not of the Toll pathway. Moreover, dUSP36 interacts with IMD and prevents its constitutive ubiquitination while promoting its K48 ubiquitin-dependent proteasomal degradation in drosophila cultured S2 cells. Our findings show that IMD-dependent signals need to be permanently repressed via IMD deubiquitination and identifies dUSP36 as a novel actor in this crucial step of signal transduction.

Introduction

Innate immunity relies on the constitutive expression of immune sensors, such as pathogens recognition receptors (PRRs), and their ability to immediately activate signals in blood cells and immune organs (Janeway and Medzhitov, 2002). In particular, the transcription factors of the Nuclear Factor-kappa B family (NF- κ B) regulate the expression of a set of stress and immune response genes, such as pro-inflammatory cytokines, pro- and anti-apoptotic genes or growth factors (Hoffmann and Baltimore, 2006). As such, deregulation of NF- κ B pathways can provoke inflammatory diseases and cancer formation (Karin and Greten, 2005). NF- κ B factors act as a surveillance system that is permanently repressed through their association in the cytoplasm with I- κ B inhibitory molecules. Several pathways stimulate NF- κ B, including the Toll-like Receptors (TLR) and the Tumor Necrosis Factor-Receptor (TNF-R) pathways. Upon activation, these receptors signal through scaffolding proteins that are subjected to ubiquitination. Depending on their nature, ubiquitin chains can target protein for degradation or modify their activated status (Terzic et al., 2007). In particular, conjugation of lysine-63-linked polyubiquitin chains (K63-polyUb) to the scaffolding protein RIP1 is required downstream of the TNF-R for the activation of TGF β -Activated Kinase 1 (TAK1) and I- κ B kinase (IKK) (Ea et al., 2006; Legler et al., 2003). IKK then triggers the phosphorylation of I- κ B and its subsequent proteasomal degradation through the linkage of K48-polyUb chains by the E3 ubiquitin ligase SCF (Chen et al., 1996), thus releasing free NF- κ B for nucleus translocation. Ubiquitination thus regulates the NF- κ B pathway at several levels (reviewed in Sun, 2008; Terzic et al., 2007). A few deubiquitinases (namely: CylD, A20 and Cezanne) have been described to mediate transient inhibition of ubiquitin-dependent activation of the NF- κ B pathway (Brummelkamp et al., 2003; Enesa et al., 2008; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003; Wertz et al., 2004).

In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, two conserved immune signalling pathways, Toll and IMD (Immune deficiency), are strongly induced in fat body cells upon infection and contribute to a robust innate immunity (Ferrandon et al., 2007; Lemaitre and Hoffmann, 2007). The Toll pathway is mainly activated by Gram-positive bacteria and fungi and results in the activation of the NF- κ B-like *Drosophila* Immune Factor (DIF) which induces a set of antimicrobial peptide genes, including *Drosomycin* (*Drs*) (Lemaitre et al., 1996). The IMD pathway contains many intermediates similar to those found in the TNF-R pathway; it is activated predominantly by Gram-negative bacteria and results in the activation of another set of antibacterial peptides genes, including *Diptericin* (*Dipt*) and *Attacin* (*AttA*) (Georgel et al.,

2001; Lemaitre et al., 1995; Onfelt Tingvall et al., 2001; Vidal et al., 2001). The IMD pathway is induced by the direct recognition of peptidoglycan via the receptor PGRP-LC/ird7 that interacts with the IMD protein (Choe et al., 2005; Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002). IMD acts as a scaffolding molecule similarly to its human ortholog RIP1 and mediates the activation of TAK1 which then drives the activation of two different downstream pathways (Boutros et al., 2002; Georgel et al., 2001; Vidal et al., 2001). On one hand, the immediate and transient activation of the Jun Kinase (JNK) pathway induces genes encoding proteins required for wound repair and the down-regulatory phosphatase *puckered* (*puc*). On the other hand, TAK1 phosphorylates Kenny (KEY), the *Drosophila* IKK γ , itself mediating the phosphorylation of Relish (Rel) (Kleino et al., 2005; Silverman et al., 2000). Rel contains both the NF- κ B-like sequence and the inhibitory motifs specific for I- κ B, the removal of which requires the proteolytic cleavage by the caspase Dredd (Leulier et al., 2000). As in mammalian cells, a set of conserved ubiquitin ligases regulates the *Drosophila* Toll and IMD pathways (Chiu et al., 2005; Khush et al., 2002; Tsuda et al., 2005; Zhou et al., 2005). The orthologous *Drosophila* CylD is the sole deubiquitinase which function has been assessed in *Drosophila* immune response: it specifically binds KEY and its overexpression down-regulates antimicrobial peptide genes expression (Tsichritzis et al., 2007). As in human cells, *Drosophila* CylD also targets JNK signalling and produces developmental defects (Xue et al., 2007). At the present date however, deubiquitinases that would act on upstream elements of the IMD pathway still remain to be identified.

In this study, we described the function of *Drosophila* Ubiquitin Specific Protease 36 (dUSP36) in *Drosophila* immunity against Gram-negative pathogens. dUSP36/Scrawny (*Scny*) has also recently been shown to be required for stem cell maintenance and Histone H2A deubiquitination (Buszczak et al., 2008). Since we show that *dUsp36/scny* is homologous to human *USP36* (*hUSP36*) (Kim et al., 2005; Kim et al., 2004; Quesada et al., 2004), we shall use in this study the nomenclature *dUsp36* to indicate its inclusion in the USPs gene family (Nijman et al., 2005). We provide several evidences that dUSP36 is required to negatively regulate the IMD pathway both in cultured *drosophila* S2 cells and in adult flies. Notably, overexpression of dUSP36 suppresses *Drosophila* immunity and antimicrobial peptide gene expression via its catalytic activity. Moreover, we created null *dUsp36*^{Δ43} allele and, using conditional rescue during development, or conditional expression of silencing transgene in adult fat body cells, we observed that loss of *dUsp36* expression induces a constitutive deregulation of the IMD and JNK pathways, but not of the Toll

pathway. By overexpressing experiments, we further show that dUSP36 acts downstream of PGRP-LC and upstream of IMD *in vivo*. Moreover, dUSP36 forms a complex with IMD and prevents its constitutive ubiquitination in S2 cells while promoting its proteasomal degradation. Therefore, dUSP36 likely prevents signal transduction by editing activating ubiquitin chains on IMD then promoting linkage of K48-linked polyubiquitin chains.

Results

Overexpressing *dUsp36* suppresses fly immunity to Gram-negative pathogens

In a gene candidate approach for genes involved in the *Drosophila* immune response (Monnier et al., 2002) (see experimental procedure), we selected the insertion P{Mae-UAS.6.11.}UY1507 upstream *CG5505* (Fig.1A). Blast analysis revealed two close homologous proteins in the human genome: hUSP36 and hUSP42. The longest isoform of the *CG5505* transcription unit, *CG5505-RD*, (Fig. 1B) encodes a predicted protein possessing the highest homology with hUSP36. Indeed, in addition to the catalytic domain characteristic for the USP family of deubiquitinases (black box), two other conserved domains presenting 40 and 42% identity with hUSP36 were detected in the N-terminal and C-terminal parts (Fig.1B, Boxes 1 and 2). These domains are not present in hUSP42 and do not share any similarities with previously identified domains. We thus conclude that *hUSP36* is the closest homolog to *CG5505*. Compared to a set of 4 other insertions tested conjointly, the insertion UY1507 caused sensitivity to the Gram-negative virulent strain *Pseudomonas aeruginosa* in combination with the ubiquitous driver daGal4 (Supplemental Fig.1A). It further displayed a marked reduction in the induction of *Dipt* upon infection with various Gram-negative bacterial strains in combination with the fat body specific driver YolkGal4 (Supplemental Fig. 1B). To confirm that fly sensitivity to bacterial infection observed with the UY1507 insertion was due to the overexpression of *dUsp36*, we constructed P{UAS-*dUsp36*} transgenic flies and overexpressed *dUsp36* through the heat-shock driver line, HSGal4. Indeed, flies overexpressing *dUsp36* presented a lower survival rate upon infection with *P. aeruginosa* compared to control flies (Fig. 1C). Similar results were obtained with the moderately pathogenic bacteria *E. cloacae* (see below) whereas *dUsp36* overexpressing flies resisted normally to non pathogenic bacteria such as *E. coli* and *A. tumefaciens* (data not shown). In addition, overexpressing *dUsp36* decreased both the induction of the IMD-target gene *Dipt* at

6 and 9 hours post-infection (Fig. 1D) and of the JNK-target gene *puc* at 45 min post infection (Fig. 1E). This result indicates that *dUsp36* overexpression prevents the activation of the IMD and the JNK pathways resulting in increased fly sensitivity to Gram-negative pathogens.

dUSP36 is required in the fat body to prevent constitutive activation of IMD and JNK pathways

To decipher the *in vivo* function of dUSP36, we created the null mutation *dUsp36*^{Δ43} by remobilizing the P{UAS} transposon (Fig. 1A). *dUsp36*^{Δ43} homozygotes were lethal at early larval stage (ET, unpublished observations). Lethality of *dUsp36*^{Δ43} mutants was rescued by expressing the UAS-*dUsp36* construct under the control of the ubiquitous daGal4 driver, allowing for the recovery of viable adult flies. This indicates that loss of *dUsp36* is responsible for lethality of *dUsp36*^{Δ43} homozygotes. To elucidate the requirement of dUSP36 in the immune response at the adult stage, the lethality of *dUsp36*^{Δ43} mutants was rescued by expressing the UAS-*dUsp36* transgene during development under the control of the daGal4 driver, itself conditionally inactivated at the adult stage by the Gal80 thermo-sensitive (Gal80ts) inhibitor of Gal4 (*dUsp36*^{Δ43cond}) (McGuire et al., 2003). A twenty fold increase of *Dipt* expression was observed in *dUsp36*^{Δ43cond} flies placed 4 days at 18°C compared to flies of the same genotype maintained at 30°C. This increase was not observed in control flies raised at 18°C or 30°C (Fig. 2A). This indicates that loss of *dUsp36* expression at the adult stage results in a constitutive activation of the IMD pathway.

To further investigate the *in vivo* function of dUSP36, we constructed P{UAS-*dUsp36-IR*} transgenic lines expressing inverted repeat cDNA sequences to inactivate *dUsp36* expression *in vivo* (Fig. 1A). Ubiquitous expression of this construct resulted in early larval lethality thus indicating that it efficiently silenced *dUsp36*. Silencing of *dUsp36* in fat body cells using the driver line c564Gal4 (Hrdlicka et al., 2002) also resulted in larval lethality indicating that dUSP36 function in the fat body is vital during development. Expression of UAS-*dUsp36-IR* transgene was then conditionally induced with the Gal80ts inhibitor 48 hours after pupal eclosion by raising adults for 4 days at 30°C. Silencing *dUsp36* in the adult fat body of non infected flies resulted in *Dipt*, *AttA* and *puc* induction reaching 70% of the maximal induction levels observed in control *E. coli* infected flies (Fig. 2B). This result indicates that the IMD and JNK pathways are constitutively activated in *dUsp36* silenced fat body cells. Since the JNK pathway is activated downstream of IMD, this result suggests that deregulation of the

JNK pathway results from ectopic IMD activation. In contrast to *Dipt*, *AttA* and *puc*, no significant induction of *Drs* was observed in flies raised in similar conditions (Fig 2B). Our *in vivo* study demonstrates that dUSP36 is required in fat body to specifically and permanently prevent the constitutive activation of the IMD and JNK pathways.

dUSP36 suppresses fly immunity via its catalytic activity

Many intermediates of the mammalian TNF-R pathway, including RIP1, the homolog of IMD, are activated through the linkage of ubiquitin monomers or K63 poly-ubiquitin chains, whereas K48 poly-ubiquitin chains would promote their degradation (Ea et al., 2006; Legler et al., 2003; Terzic et al., 2007). In *Drosophila*, a set of evolutionary conserved ubiquitin ligases and proteases regulate the IMD pathway (Chiu et al., 2005; Khush et al., 2002; Tschritzis et al., 2007; Tsuda et al., 2005; Zhou et al., 2005). This raises the question whether dUSP36 would act on the IMD pathway through its catalytic activity. In order to test the catalytic activity of dUSP36 on various ubiquitin substrates, its catalytic domain was expressed as a recombinant protein in bacteria expressing the Ub- β -gal fusion protein. As observed for human USP36 (hUSP36) (Kim et al., 2004; Quesada et al., 2004), dUSP36 cleaved Ub- β -gal (Fig. 3A). In order to assess whether dUSP36 and hUSP36 would also digest ubiquitin polymers, purified recombinant catalytic domains of these proteins were incubated with synthetic K48 and K63 tetra-ubiquitin chains. Both human and *Drosophila* proteins digested these two tetra-ubiquitin isoforms *in vitro* resulting in the apparition of ubiquitin trimers and the accumulation of ubiquitin monomers (Fig. 3B).

The catalytic domain of dUSP36 contains two short and well-conserved motifs which include the Cys and His residues critical for catalysis at position 111 and 369, respectively. Mutations of this conserved residues, Cys to Ser (C111S, indicated C*) and His to Asn (H369N, indicated H*), were introduced into the dUSP36 sequence and resulted in a total loss of hydrolysis of ubiquitin substrates (Fig. 3A,B). Finally, proteolysis of poly-Ub chains was inhibited by the non-hydrolysable Ub-aldehyde inhibitor as assessed by the absence of tri-Ub chains (Fig. 3C).

All together, our results indicate that human and *drosophila* USP36 proteins are active deubiquitinating enzymes both on mono and poly-Ub substrates *in vitro*.

Unlike the wild type dUSP36, overexpressing the catalytic mutant form did not inhibit *Dipt* induction following fly infection (Fig. 4A) and did not affect fly sensitivity to infection with *E. cloacae* (Fig. 4B). Our experiments demonstrate that dUSP36 negatively regulates the IMD

pathway *in vivo* and suppresses fly immunity through its catalytic activity. Thus, we conclude that the deubiquitinating activity of dUSP36 is essential for inhibition of the IMD pathway.

dUSP36 *in vivo* function depends on IMD

It has been previously demonstrated that over-expressing upstream components of the IMD pathway, such as PGRP-LC, IMD or TAK1, resulted in the ectopic activation of antimicrobial peptide encoding genes in the absence of immune challenge, including *Dipt* (Choe et al., 2002; Georgel et al., 2001; Vidal et al., 2001). In order to determine at which level dUSP36 is acting on the IMD pathway, dUSP36 was coexpressed with either PGRP-LC, IMD or TAK1 in double transgenic lines, and the activation of *Dipt* was analyzed by quantitative RT-PCR. Over-expressing *dUsp36* reduced the level of *Dipt* expression induced by over-expressing PGRP-LC (Fig. 5A) but not that induced by either TAK1 or IMD (Supplemental Fig. S2). These results indicate that dUSP36 acts downstream of PGRP-LC and upstream of TAK1 and IMD to inhibit the IMD pathway activation. If this is the case, deregulation of the IMD pathway in *dUsp36*-silenced fat body cells should strictly depend on the presence of IMD. To test this hypothesis, both genes were simultaneously silenced at the adult stage in fat body cells. We first verified that the *UAS-Imd-IR* transgene used in our study efficiently silenced *Imd*. Indeed, compared to control flies, silencing *Imd* in fat body cells prevented *Dipt* expression following *E. coli* infection (Supplemental Fig. S3). We then conditionally silenced *dUsp36*, either alone or in combination with *Imd*, in the adult fly body through the *Ga80ts* system described above. As previously mentioned, silencing *dUsp36* in the adult fat body resulted in a constitutive deregulation of the IMD pathway whereas no deregulation of *Dipt* gene expression occurred in double *dUsp36* and *Imd* silenced flies (Fig. 5B). Our results indicate that deregulation of the IMD pathway mediated by silencing *dUsp36* strictly requires IMD.

dUSP36 forms a complex with IMD and prevents its constitutive ubiquitination in drosophila cells while promoting its degradation

The analysis of the *in vivo* function of dUSP36 suggests that it permanently prevents signal transduction from components situated at the top of the pathway such as PGRP-LC or IMD which associate in a same complex (Choe et al., 2005). We thus used a co-immunoprecipitation assay in transfected drosophila S2 cells to investigate the ability of

dUSP36 to interact with IMD or PGRP-LC. Additional test was performed as a negative control with KEY. Remarkably, IMD co-immunoprecipitated dUSP36 whereas neither PGRP-LC nor KEY co-precipitated dUSP36 in the same experimental conditions (Fig. 6A). This indicates that IMD and dUSP36 interact when co-expressed in drosophila cells. To further map the interaction domain of dUSP36 with IMD, we performed a GST pull down assay with two truncated forms of the dUSP36 proteins corresponding to the N-terminal half, containing the catalytic domain, and the C-terminal part. In this assay, the C-terminal part, but not the N-terminal part, of dUSP36 did specifically retain the recombinant IMD protein, which indicates that dUSP36 interacts with IMD through its C-terminal domain (Fig. 6B).

It has been shown that K63-linked polyubiquitin on RIP1 supports downstream signalling events resulting in NF- κ B activation and that K63-linked chains are replaced with K48-linked chains by A20, which has a dual function as a deubiquitinase and K48-promoting E3 ligase (Ea et al., 2006; Legler et al., 2003; Newton et al., 2008). We observed that, like its mammalian counterpart, IMD is constitutively ubiquitinated when expressed in drosophila immune competent S2 cells. Coexpression of dUSP36 collapsed ubiquitinated forms of IMD and decreased the total amount of IMD detected in the cell lysate, thus indicating that dUSP36 deubiquitinates IMD and promotes IMD degradation (Fig. 6C). Blocking the proteasome restored a normal amount of IMD protein and a partial amount of ubiquitinated forms of IMD (Fig.6C), which likely correspond to K48-linked polyubiquitinated IMD whereas ubiquitinated chains other than K48, would still be hydrolysed by dUSP36. All together, these results suggest that dUSP36 edits activating K63-linked polyubiquitin chains on IMD then indirectly promoting K48-linked ubiquitination and subsequent degradation of IMD (Fig. 7).

Discussion

Our work identifies dUSP36 as a deubiquitinating enzyme which negatively regulates the IMD-dependent signalling pathway in *Drosophila*. We show that dUSP36 is required to prevent constitutive activation of the IMD pathway in the absence of microbial infection. Indeed, silencing *dUsp36* in S2 cells or in the adult fat body induces a constitutive expression of IMD-dependent antimicrobial peptide encoding genes. The JNK pathway is also deregulated by silencing *dUsp36* as shown by elevated expression of the JNK target gene *puc*. Deregulation of the JNK pathway might be a consequence of IMD activation since JNK can be activated through TAK1, itself activated by IMD, a hypothesis further supported by the

fact that dUSP36 acts upstream IMD (see below) (Vidal et al., 2001). In contrast, no significant change in expression was observed for *Drs*, a target gene of the Toll pathway. These results indicate that dUSP36 requirement in innate immune signals is specific for the IMD pathway. Since *dUsp36* silencing during development, or *dUsp36* loss of function allele, resulted in larval lethality, dUSP36 might be required in developmental and cellular processes other than innate immune signalling (this study) or stem cells maintenance (Buszczak et al., 2008) that stay to be determined.

Overexpressing dUSP36, but not a catalytic inactive mutant form, inhibits the activation of the IMD pathway in Gram-negative bacteria infected flies resulting in increased fly sensitivity, indicating that dUSP36 acts on the IMD pathway through its catalytic activity. We further provide evidence that dUSP36 negatively regulates the IMD pathway at the level of IMD via its deubiquitinating activity. First, overexpressing dUSP36 reduced by half the constitutive activation of the pathway provoked by overexpressing PGRP-LC, but not that produced by overexpressing either IMD or TAK1. It should be mentioned that the lack of effect of dUSP36 overexpression on the phenotype induced by overexpressing IMD might result from an excess of IMD substrate. Second, constitutive activation of the IMD pathway induced by dUSP36 silencing strictly depends on the presence of IMD. Finally, dUSP36 associates with IMD through its C terminal domain and prevents the detection of ubiquitinated IMD in S2 cells while promoting its proteasomal degradation. Since blocking the proteasome restored a normal amount of IMD but only partially the total amount of ubiquitinated forms of IMD, it is likely that IMD, like its mammalian counterpart is subjected to both K48- and K63-linked ubiquitination and that dUSP36 promotes K48-linked polyubiquitination and degradation of IMD by editing K63-polyubiquitin chains. The fact that *dUsp36* loss of function provokes a constitutive deregulation of the IMD pathway argues in favour of the existence of a steady state of the IMD pathway which is maintained at a very low basal level through the ubiquitination/deubiquitination reversible chemical modification (Fig. 7).

In a scheme where dUSP36 would be required to prevent the constitutive deregulation of the IMD pathway, it remains to be determined how the activity of dUSP36 is itself regulated. Whereas a constant basal level of dUSP36 might insure a permanent negative regulation of the pathway, a specific signal might block dUSP36 activity during infection. The dUSP36 sequence presents PEST domains which are characteristic for unstable proteins and might drive transient dUSP36 degradation upon infection (Kim et al., 2005). The hypothesis that dUSP36 inhibition might be achieved at the protein level is supported by the fact that we

did not detect any transcriptional changes of *dUsp36* transcript upon infection (data not shown). In contrast, several data indicate that the mouse homolog DUB-1 gene expression is up-regulated by inflammatory cytokines (Baek et al., 2004; Zhu et al., 1996), which does not exclude additional mechanisms of regulation at the protein level.

Three independent study of the negative regulator PIRK recently pointed out how negative regulation of the IMD pathway at the level of the complex formed by PGRP-LC and IMD is a crucial step in the negative control of signal transduction (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008). However, despite the identification of ubiquitin ligases promoting IMD activation (Zhou et al., 2005), evidences for ubiquitination of IMD were lacking and ubiquitin proteases acting on upstream elements of the IMD pathway still remained to be identified (Tsichritzis et al., 2007). Our study identifies dUSP36 as a novel deubiquitinating enzyme involved in the negative control of innate immune signalling via IMD deubiquitination. Since, hUSP36 is deregulated in activated lymphocytes and in ovarian cancer cells (Kim et al., 2004; Li et al., 2008), our finding opens the possibility that deregulation of hUSP36 contributes to inflammation and oncogenesis in mammals via the TNF-R pathway.

Experimental procedures

Fly strains, screening and infections

Flies were raised on standard culture medium at 25°C except if indicated. We screened a subset of 120 P{Mae-UAS.6.11}UY insertions selected for their modified stress response (Monnier et al., 2002). UY lines were crossed with the daGal4 driver line and the progeny were infected by septic injury with a diluted exponential phase culture of *Pseudomonas aeruginosa* (Fauvarque et al., 2002) to select more resistant or sensitive lines. A second readout assay was conducted by analysing *Dipt* expression upon infection by Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, or *Enterobacter cloacae*.

Mapping the UY1507 insertion was performed by genomic PCR. Jumpout of the UY1507 element were conducted following standard procedure (Robertson et al., 1988). One lethal deletion was recovered among 160 independent excised lines analysed and sequenced by PCR amplification.

Transgenic lines were constructed in the P{UAST} vector (Brand and Perrimon, 1993). P{UAS-dUsp36} contains the *CG-5505-RB* cDNA subcloned from LD40339 (obtained from DGRC). P{UAS-dUsp36-IR} expresses *dUsp36* cDNA sequences cloned in inverted repeats designed from (<http://flyrnai.org>) (Flockhart et al., 2006). P{UAS-*Imd*-IR} was recovered from the VDRC (n°# 9253) (Dietzl et al., 2007). Other stocks were recovered from the *Drosophila* Bloomington stock center.

Heat-shock driven expression of transgenes was achieved by crossing flies with the HspGal4 (HSGal4) driver line and progeny was submitted to sequential temperature changes: 30 min 37°C, 30 min 18°C, 30 min 37°C, 1 hour 28°C, 25°C 12 hours.

Northern Blots and Real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted from adult flies using RNA^{plus} from QBiogene. Northern blots were probed with a ³²P-labelled fragment of *dUsp36*, *Dipt* or *Act* cDNA. For real-time PCR analysis, cDNAs were synthesized with AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene). An amount of cDNA equivalent to 0.01 µg of total RNA was subjected to 40 cycles of PCR amplification consisting of a 10s incubation at 95°C and 30s at 60°C. Output was monitored using SYBR Green core reagents and the Mx3000P instrument (Stratagene). All the results were normalized to the *rpl32* RNA level. The primer sequences were designed using PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

***In vitro* deubiquitinating assays**

Mutations in the dUSP36 catalytic domain were introduced using QuickChange XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Catalytic domain of hUSP36{1-542} or of dUSP36{41-457}, wild type or mutated (dUSP36C111,H369N), were expressed as GST-fusion proteins in transformed *E. coli* BL21 PlysS. To assess proteolytic cleavage of ubiquitin, GST-fusion proteins were coexpressed with Ub- β -gal fusion protein for 4 hours at 28°C. Bacteria were lysed in 100 μ l Laemmli solution. Samples were subjected to SDS-PAGE (6% gel) and western blotting with a rabbit anti β -Gal antibody (ROCKLAND). To assess proteolytic cleavage of ubiquitin tetramers, GST-fusion proteins were induced for 1 hour at 25°C and purified on Gluthatione Sepharose 4B (Amersham Bioscience) from *E. coli* lysates prepared in 2ml of Triton buffer (150mM NaCl, 40mM Tris pH 7.4, 0.6% Triton x 100, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 4mM DTT, protease inhibitor cocktail SIGMA, 1 mg/ml Lysozyme). One μ g of fusion proteins fixed on sepharose 4B was incubated with either K48-or K63-linked polyubiquitin substrates (Boston Biochem, Inc) in 20 μ l of Phosphate buffer saline containing 5 mM MgCl₂, 2mM DTT for 18 hours at 37° with agitation. Samples were subjected to SDS-PAGE (11% gel) and western blotting with a rabbit anti Ubiquitin-protein conjugates antibody (BIOMOL International)

Immunoprecipitation and immunoblotting

Co-immunoprecipitation were performed following standard procedures in S2 cotransfected cells with 10 μ g of Myc tagged full length *dUsp36* construct in pAc/HisB vector (Invitrogen) (dUSP36-Myc) and 10 μ g of V5-tagged full length of either IMD, PGRP-LC (Choe et al., 2005) or KEY (Tsichritzis et al., 2007). Pull Down assay were performed in S2 cells transfected with the IMD-V5 construct and lysed after 48h. The lysate was employed in a GST-Usp36 Nter or Cter pull down assay. The pull downs were blotted with antibody against V5 to detect bound IMD. To reveal ubiquitinated forms of IMD, we constructed a S2 drosophila cells *pAc-HA-Ub* ubiquitin expression vector from a CMV-based expression vector of an octameric HA Nter-tagged-ubiquitin precursor protein (kindly provided by Dr M. Treier). We then coexpressed 4 μ g of *pAc-HA-Ub* with 1 μ g of *pAc-Imd-V5* with, our without, 5 μ g of *pAc-dUsp36-Myc*. To block K48-linked ubiquitin chains mediated degradation of proteins by the proteasome, MG132 was added to cell culture at 20 μ M final concentration for 4 hours. Lysates were immunoprecipitated with anti-V5 antibody and

revealed with anti-HA antibodies. Western blot with whole cell lysates were revealed with anti-V5 to detect IMD-V5 and anti-Tubulin (internal loading control).

Acknowledgement

We thank Elodie Riveron and Virginie Ribaud as rotater students, Nicole Assard for technical help and all members of the TS laboratory, Dr V. Monnier for sharing flies, Pr JL Imler, Dr V. Quesada, Dr M. Hochstrasser, Dr KH Baek, Dr KV Anderson, Dr M. Treier and Dr G. Courtois, Dr P. Ligoxygakis for sending vector constructs, Dr F. Leulier, Dr B. Lemaitre, the DGRC, VDRC, and Bloomington stock center for sending flies. This work was supported by Region Rhone-Alpes (Emergence 2002) including a doctoral grant to AAR

References

- Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Erturk-Hasdemir, D., Paquette, N., and Silverman, N. (2008). Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS Pathog* 4, e1000120.
- Baek, K. H., Kim, M. S., Kim, Y. S., Shin, J. M., and Choi, H. K. (2004). DUB-1A, a novel deubiquitinating enzyme subfamily member, is polyubiquitinated and cytokine-inducible in B-lymphocytes. *J Biol Chem* 279, 2368-2376.
- Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 711-722.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M., Dirac, A. M., and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424, 797-801.
- Buszczak, M., Paterno, S., and Spradling, A. C. (2008). *Drosophila* Stem Cells Share a Common Requirement for the Histone H2B Ubiquitin Protease Scrawny. *Science*.
- Chen, Z. J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84, 853-862.
- Chiu, H., Ring, B. C., Sorrentino, R. P., Kalamarz, M., Garza, D., and Govind, S. (2005). dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev Biol* 288, 60-72.
- Choe, K. M., Lee, H., and Anderson, K. V. (2005). *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1122-1126.
- Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D., and Anderson, K. V. (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* 296, 359-362.

- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., *et al.* (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* *448*, 151-156.
- Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G., and Chen, Z. J. (2006). Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* *22*, 245-257.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J. C., Haskard, D. O., Dean, J. L., and Evans, P. C. (2008). NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem* *283*, 7036-7045.
- Fauvarque, M. O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M., and Attree, I. (2002). Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb Pathog* *32*, 287-295.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* *7*, 862-874.
- Flockhart, I., Booker, M., Kiger, A., Boutros, M., Armknecht, S., Ramadan, N., Richardson, K., Xu, A., Perrimon, N., and Mathey-Prevot, B. (2006). FlyRNAi: the *Drosophila* RNAi screening center database. *Nucleic Acids Res* *34*, D489-494.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (2001). *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell* *1*, 503-514.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D., and Royet, J. (2002). The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* *416*, 640-644.
- Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* *210*, 171-186.
- Hrdlicka, L., Gibson, M., Kiger, A., Micchelli, C., Schober, M., Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* *34*, 51-57.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* *20*, 197-216.
- Karin, M., and Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* *5*, 749-759.
- Khush, R. S., Cornwell, W. D., Uram, J. N., and Lemaitre, B. (2002). A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol* *12*, 1728-1737.
- Kim, M. S., Kim, Y. K., Kim, Y. S., Seong, M., Choi, J. K., and Baek, K. H. (2005). Deubiquitinating enzyme USP36 contains the PEST motif and is polyubiquitinated. *Biochem Biophys Res Commun* *330*, 797-804.
- Kim, M. S., Yoo, K. J., Kang, I., Chung, H. M., and Baek, K. H. (2004). A novel cysteine protease HeLa DUB-1 responsible for cleaving the ubiquitin in human ovarian cancer cells. *Int J Oncol* *25*, 373-379.

- Kleino, A., Myllymaki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L. M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S., and Ramet, M. (2008). Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *J Immunol* *180*, 5413-5422.
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., *et al.* (2005). Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *Embo J* *24*, 3423-3434.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., and Courtois, G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* *424*, 801-805.
- Legler, D. F., Micheau, O., Doucey, M. A., Tschopp, J., and Bron, C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* *18*, 655-664.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* *1*, 353-358.
- Lhocine, N., Ribeiro, P. S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaitre, B., Gstaiger, M., Meier, P., and Leulier, F. (2008). PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe* *4*, 147-158.
- Li, J., Olson, L. M., Zhang, Z., Li, L., Bidder, M., Nguyen, L., Pfeifer, J., and Rader, J. S. (2008). Differential display identifies overexpression of the USP36 gene, encoding a deubiquitinating enzyme, in ovarian cancer. *Int J Med Sci* *5*, 133-142.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* *302*, 1765-1768.
- Monnier, V., Girardot, F., Cheret, C., Andres, O., and Tricoire, H. (2002). Modulation of oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* by gene overexpression. *Genesis* *34*, 76-79.
- Newton, K., Matsumoto, M. L., Wertz, I. E., Kirkpatrick, D. S., Lill, J. R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S. S., Fellouse, F. A., *et al.* (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* *134*, 668-678.
- Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773-786.
- Onfelt Tingvall, T., Roos, E., and Engstrom, Y. (2001). The *imd* gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep* *2*, 239-243.

- Quesada, V., Diaz-Perales, A., Gutierrez-Fernandez, A., Garabaya, C., Cal, S., and Lopez-Otin, C. (2004). Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 54-62.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-470.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* 14, 2461-2471.
- Sun, S. C. (2008). Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol* 8, 501-511.
- Terzic, J., Marinovic-Terzic, I., Ikeda, F., and Dikic, I. (2007). Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. *Biochem Soc Trans* 35, 942-945.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424, 793-796.
- Tschritzis, T., Gaentzsch, P. C., Kosmidis, S., Brown, A. E., Skoulakis, E. M., Ligoxygakis, P., and Mosialos, G. (2007). A *Drosophila* ortholog of the human cylindromatosis tumor suppressor gene regulates triglyceride content and antibacterial defense. *Development* 134, 2605-2614.
- Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N., and Aigaki, T. (2005). The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep* 6, 1082-1087.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* 15, 1900-1912.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., *et al.* (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-699.
- Xue, L., Igaki, T., Kuranaga, E., Kanda, H., Miura, M., and Xu, T. (2007). Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev Cell* 13, 446-454.
- Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J., and Maniatis, T. (2005). The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem* 280, 34048-34055.
- Zhu, Y., Pless, M., Inhorn, R., Mathey-Prevot, B., and D'Andrea, A. D. (1996). The murine DUB-1 gene is specifically induced by the betac subunit of interleukin-3 receptor. *Mol Cell Biol* 16, 4808-4817.

Figure legend

Figure 1: *dUsp36* overexpression suppresses flies immunity

A. Map of UY1507 insertion into the *CG5505* transcription unit. Three predicted isoforms *CG5505-RB*, *-RC* and *-RD* are indicated (from <http://flybase.org/reports/FBgn0035633.html>). The UY1507 insertion is situated just upstream of the two isoforms *CG5505-RB* and *-RC*. Grey box corresponds to the coding sequence and black box indicates the USP conserved catalytic domain. Black line indicates the extension of *dUsp36*^{Δ43} deficiency. Double strand line indicates location of inverted repeats used to silence *dUsp36* *in vivo* (P{UAS-*Usp36-IR*}). B. Percentage of sequence identity between *CG5505-RC* encoded protein (dUSP36) and hUSP36 predicted protein. In addition to the USP domain (black box, 37% identity), the two sequences align over two other conserved domains (Boxes 1 and 2 showing 42% and 40% identity respectively). C. Forty flies of 5 days old were infected with *P. aeruginosa* 12 hours following heat shock treatment and their survival kinetics was followed over 48 hours. The mutant *Key* is used as a Gram-negative sensitive control. Heat-Shock (HS) driven expression of the UY1507 insertion (HS>UY1507) or of the *dUsp36* transgene (HS>Usp36) results in fly sensitivity to *P. aeruginosa* as compared to HSGal4/+ control flies (p<0,001, Chi-2 test). D,E. Quantitative analysis of *Dipt* (D) and *puc* (E) mRNAs by real-time PCR in non-infected (NI) flies or at 45 min (45'), 6 hours or 9 hours post-infection with *E. coli*. Results are expressed as % of the maximal induction level observed in control HS/+ flies (100%). Significant difference of p<0,05 (*) or of p<0,01 (**) compared to HS/+ control flies (Student's-t test).

Figure 2: dUSP36 is required to prevent constitutive induction of the IMD pathway *in vivo*

Quantitative analysis of *Dipt*, *AttA*, *Drs* and *puc* mRNAs by real-time Quantitative PCR. A. Control flies issued from perfect excision of UY1507 (Rev8) or UAS-dUsp36/+;daGal4/Gal80ts;*dUsp36*^{Δ43}/*dUsp36*^{Δ43} flies (indicated *dUsp36*^{Δ43cond}) were raised at 30°C during development then a set of flies was placed 4 days at 18°C at the adult stage - preventing UAS-dUsp36 expression- and was compared to control siblings maintained at 30°C. Temperature change has no effect on *Dipt* expression as observed in Rev8 flies placed at either 18 or 30°C. Significant difference between *dUsp36*^{Δ43} flies raised at 30°C compare to 18°C p<0,05 (*) (Student's-t test). B. Fat-body directed silencing of *dUsp36* was induced at the adult stage by raising c564Gal4/Gal80ts,UAS-*Usp36-IR* flies at 18°C during development

and rearing adult for 4 days at 30°C before conducting the experiment (siUsp36, hatched bars). Histograms present the fold induction of each indicated gene mRNAs compared to c564Gal4/+ control flies raised in similar conditions (black bars). Significant difference with control flies of $p < 0,01$ (**). Maximal expression levels (100%) were independently monitored in control flies infected by *E. coli* at either 6 hours (*Dipt*, *AttA*) or at 45 min (*puc*) post-infection. Maximal *Drs* expression level was independently quantified in *M. luteus* infected flies at 24 hours post-infection (grey bar).

Figure 3: hUSP36 and dUSP36 are active ubiquitin proteases

Proteolysis of Ub-βgal (A) or K48 and K63-linked tetra ubiquitin chains resulting in the apparition of ubiquitin trimers and the accumulation of ubiquitin monomers (B,C) by hUSP36{1-542} and dUSP36{41-457} catalytic domains (indicated hUSP36 and dUSP36). Substrate cleavage was analysed by western blotting with anti-βgal antibodies (A) or anti-Ub antibodies (B,C). Mutating the two catalytic conserved residue Cys to Ser (C111S) and His to Asn (H369N) in the dUSP36 sequence (indicated dUSP36C*H*) prevented ubiquitin hydrolysis (A,B). C. The addition of 0.5 μM Ub aldehyde (UbAld) prevents the processing of K48 and K63 tetra-Ub by dUsp36.

Figure 4: dUSP36 suppresses fly immunity through its catalytic activity

A. Quantitative analysis of *Dipt* mRNAs by real-time PCR in non-infected (NI) flies or at 6 hours post-infection with *E. coli*. Results are expressed as % of the induction level observed in control HS/+ flies (100%). HS driven expression of *dUsp36* (in UAS-dUSP36/Y;HSGal4/+ flies) strongly reduces *Dipt* induction following infection (HS>Usp36). In contrast, HS driven expression of the double mutant dUsp36C*H* form has no effect on *Dipt* expression level as observed in two independent transgenic lines (HS>Usp36C*H* #3 and #5). Significant differences of $p < 0,01$ (**) or $p < 0,05$ (*). B. Forty flies of 5 days old were infected with *E. cloacae* 12 hours following heat shock treatment and their survival kinetics was followed over 48 hours. The mutant *Key* is used as a Gram-negative sensitive control. HS driven expression of the UY1507 insertion (HS>UY1507) or of the *dUsp36* transgene (HS>Usp36) result in fly sensitivity to *E. cloacae* as compared to HSGal4/+ control flies ($p < 0,01$ Chi-2 test). In contrast HS driven expression of the catalytically inactive mutant dUsp36C*H* (HS>Usp36C*H*) did not affect fly resistance to *E. cloacae* infection.

Figure 5: dUSP36 function depends on IMD *in vivo*

Quantitative analysis of *Dipt* mRNAs by real-time PCR. A. Flies were heat-shocked for one hour at 37°C and *Dipt* expression was analyzed at 4 and 8 hours following HS. Results are given as the percentage of the maximal induction level of *Dipt* transcripts observed in HSGal4/+ control flies at 8 hours following HS. The induction of *Dipt* expression induced by overexpressing PGRP-LC (HS>PGRP-LC) is reduced by half at 4 hours post infection when coexpressing dUsp36 (HS>dUsp36,PGRP-LC). B. Conditional silencing in adult fat body of *dUsp36* (c564>Usp36-IR) (genotype: c564Gal4/Gal80ts,UAS-*Usp36-IR* flies) or of *dUsp36* and *Imd* jointly (c564>*dUsp36-IR,Imd-IR*) (genotype: c564gal4/Gal80ts,UAS-*Usp36-IR*;UAS-*Imd-IR*/+) in non infected flies (NI). To achieve conditional silencing, flies were raised at 18°C during development and 30°C for 4 days before analysis of *Dipt* transcripts. Results are expressed as the fold induction level compared to c564Gal4/+ flies rose in similar conditions. The constitutive deregulation of *Dipt* gene expression caused by silencing *dUsp36* in (c564>Usp36-IR) is totally prevented by co-silencing *Imd* (c564>*Usp36-IR,Imd-IR*). Significant differences with control are indicated: p<0,05 and p<0,01 (**) (Student's-t test).

Figure 6: dUSP36 forms a complex with IMD and prevents its constitutive ubiquitination while promoting its proteasomal-dependent degradation

A. *Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding for either PGRP-LC-V5, IMD-V5 or KEY-V5 and dUSP36-Myc. Cells extracts were co-immunoprecipitated with anti-V5 antibodies and analysed by western blot with anti-Myc and anti-V5 antibodies. Presence of dUSP36-Myc recombinant proteins in the input was assessed by western blot of cell extracts with anti-Myc antibodies. B. S2 cells were transfected with the expression construct encoding IMD-V5 and lysed after 48 h. Cells lysates were precleared and subjected to either immunoprecipitation with an antibody against V5 or to GST pull down assays using GST fusion proteins with either the dUSP36[41-457] N-Terminal part (dUSP36 Nter) or the dUSP36[418-968] C-terminal part (dUSP36 Cter) or with GST alone (GST). Lysates were coloured with Ponceau red to visualize GST-fusion proteins in the input (bottom part). C. HA-tagged ubiquitin and IMD-V5 expression vector were co-transfected with or without the dUSP36-Myc expression vector. Proteasomal degradation of proteins was blocked by MG132 (right panels). Lysates were immunoprecipitated with anti-V5 antibodies and IMD-V5-ubiquitinated forms were revealed with anti-HA antibodies. IMD-V5 level in the inputs was monitored by immunoblotting with anti-V5 antibodies and anti-tubulin antibodies serve as internal loading control.

Figure 7: Proposed model for ubiquitin dependent regulation of IMD

Linkage of K63- (or other type) linked polyubiquitin chains on IMD would promote signalling to TAK1 whereas linkage of K48-linked polyubiquitin chains on IMD would promote its degradation. The activated status of the IMD pathway would be permanently maintained at a very low basal level by dUSP36 which deubiquitinates IMD then promoting its K48-linked ubiquitination and subsequent degradation.

Legends to Supplemental Figures**Supplemental Figure 1: Selection of a P{UAS} insertion into CG5505**

A. Forty flies of 5 days old were infected by septic injury with an exponential phase culture of *P. aeruginosa* and their survival was followed over 2 days. Flies daGal4/UY1507 (da>UY1507) presented a sensitive phenotype compared to a set of 4 other UY (#1-4) insertions or to daGal4/+ control flies ($p < 0,001$, Chi-2 test). B. Northern blot analysis of *CG5505*, *Dipt* and *Act* (loading control) transcripts in non-infected flies (NI) or flies infected with various Gram-negative bacteria as indicated. In combination with the fat body specific driver *YolkGal4* (Georgel et al., 2001), two *CG5505* transcripts of the *CG5505-RB* and *-RC* corresponding sizes (3.2 and 3.8 kb) were highly overexpressed (NI panels). These flies displayed a marked reduction in the induction of *Dipt* upon infection with various Gram-negative bacterial strains

Supplemental Figure 2: dUSP36 acts upstream TAK1 and IMD

Quantitative analysis of *Dipt* mRNAs by real-time PCR. A-B. Flies were heat-shocked for one hour at 37°C and *Dipt* expression was analyzed at 4 and 8 hours following HS. Results are given as the percentage of the maximal induction level of *Dipt* transcripts observed in HSGal4/+ control flies at 8 hours following HS. The induction of *Dipt* expression induced by overexpressing IMD (A) or TAK1 (B) is not affected by co-expressing dUSP36. Since we showed that IMD would be a substrate for dUSP36 (see Fig. 6), the lack of effect of dUSP36 overexpression on the phenotype induced by overexpressing IMD might result from an excess of IMD substrate

Supplemental Figure 3: The UAS-*Imd-IR* construct blocks activation of the IMD pathway

Flies were infected with *E. coli* and *Dipt* expression was analyzed at 6 hours post infection. Results are expressed as the fold induction level of *Dipt* compared to non infected c564Gal4/+ control flies. The UAS-*Imd-IR* construct prevent *Dipt* induction following *E. coli* infection. Significant differences of $p < 0,01$ (**).

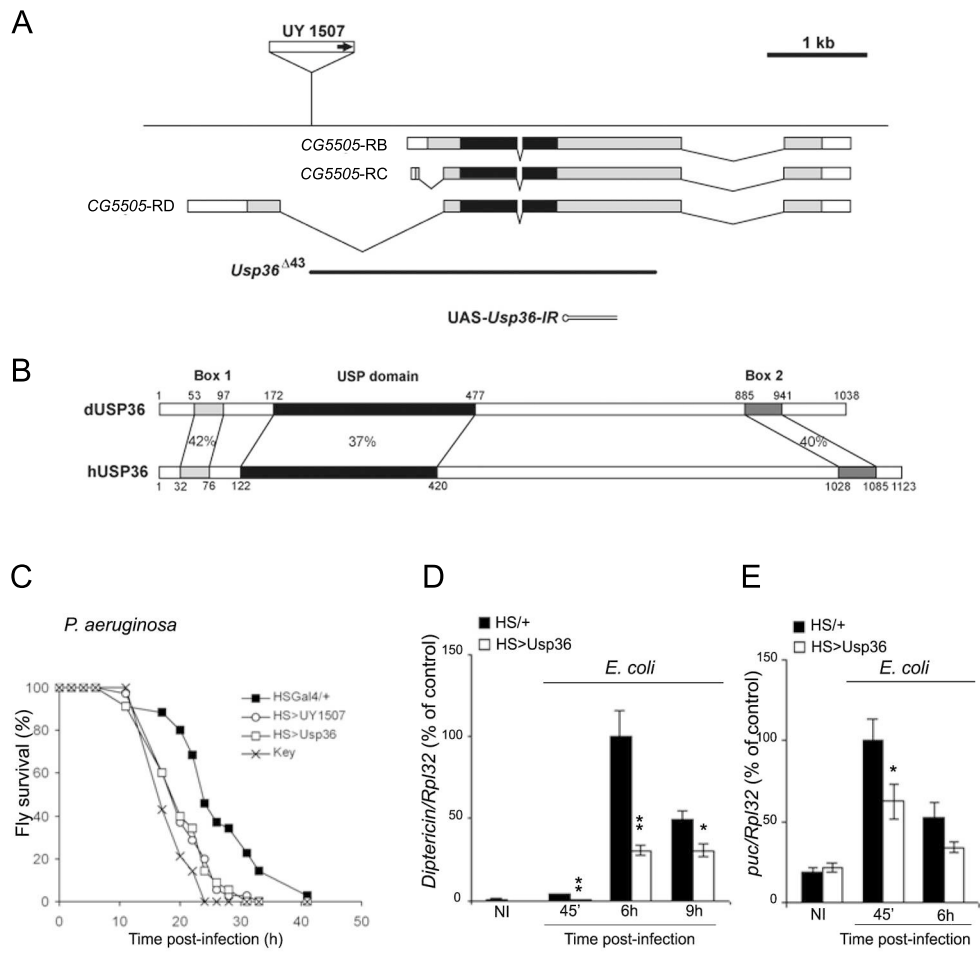


Figure 1

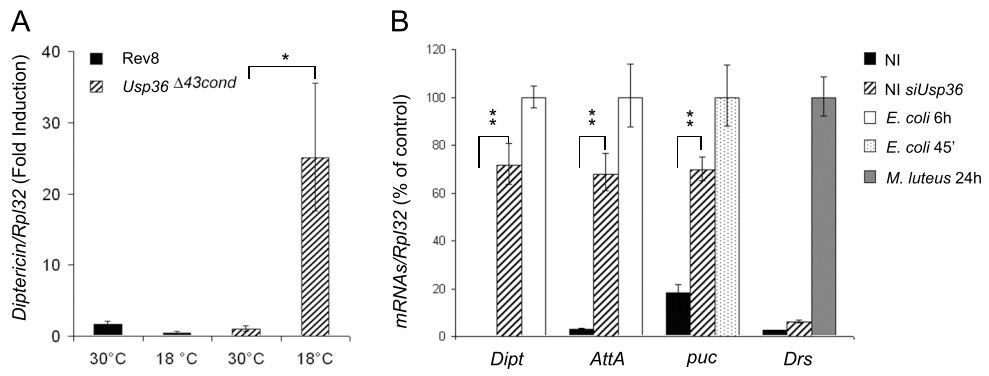


Figure 2

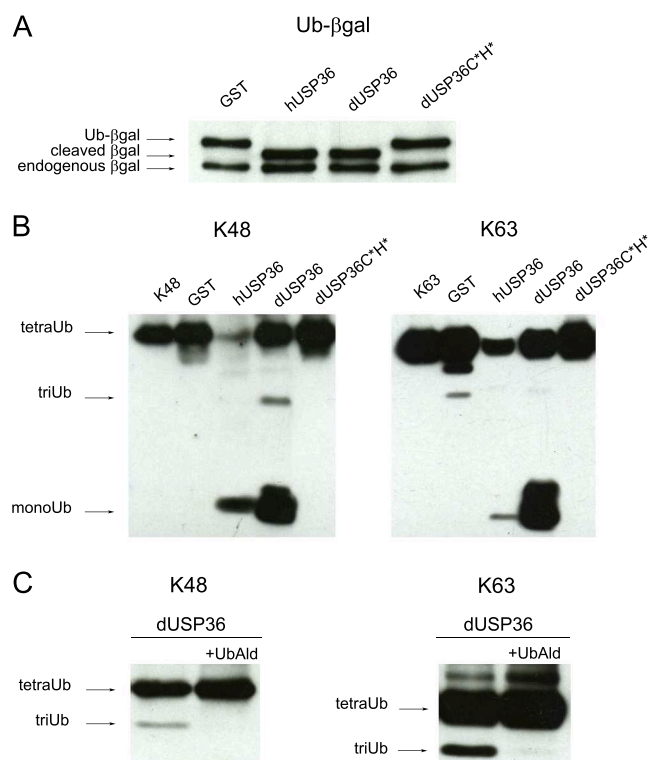


Figure 3

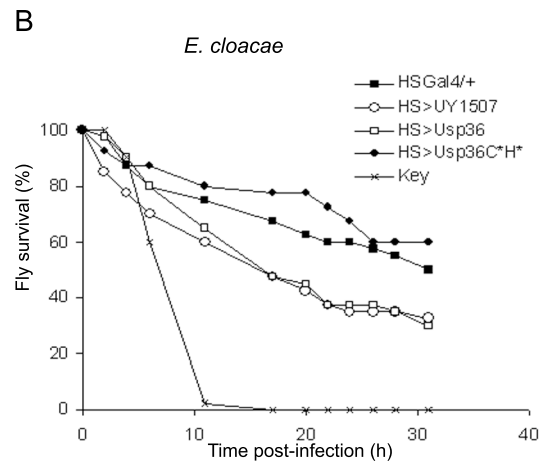
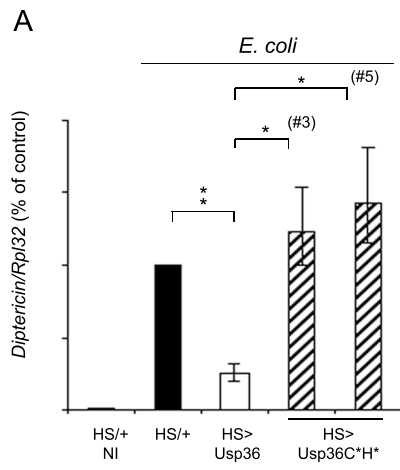


Figure 4

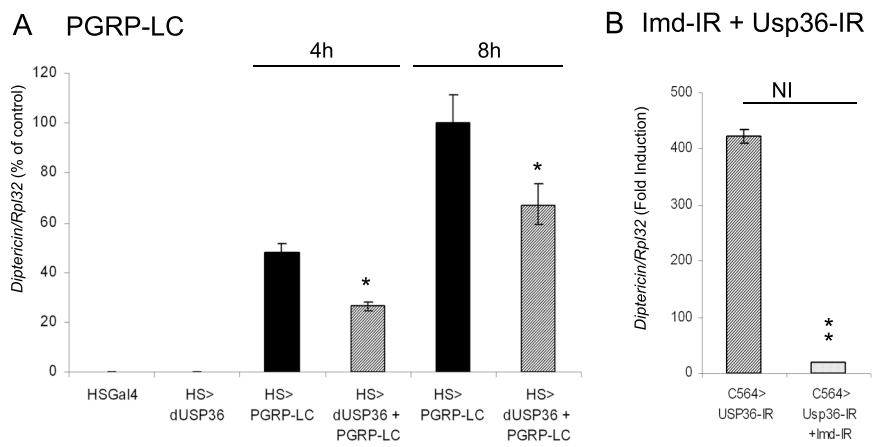


Figure 5

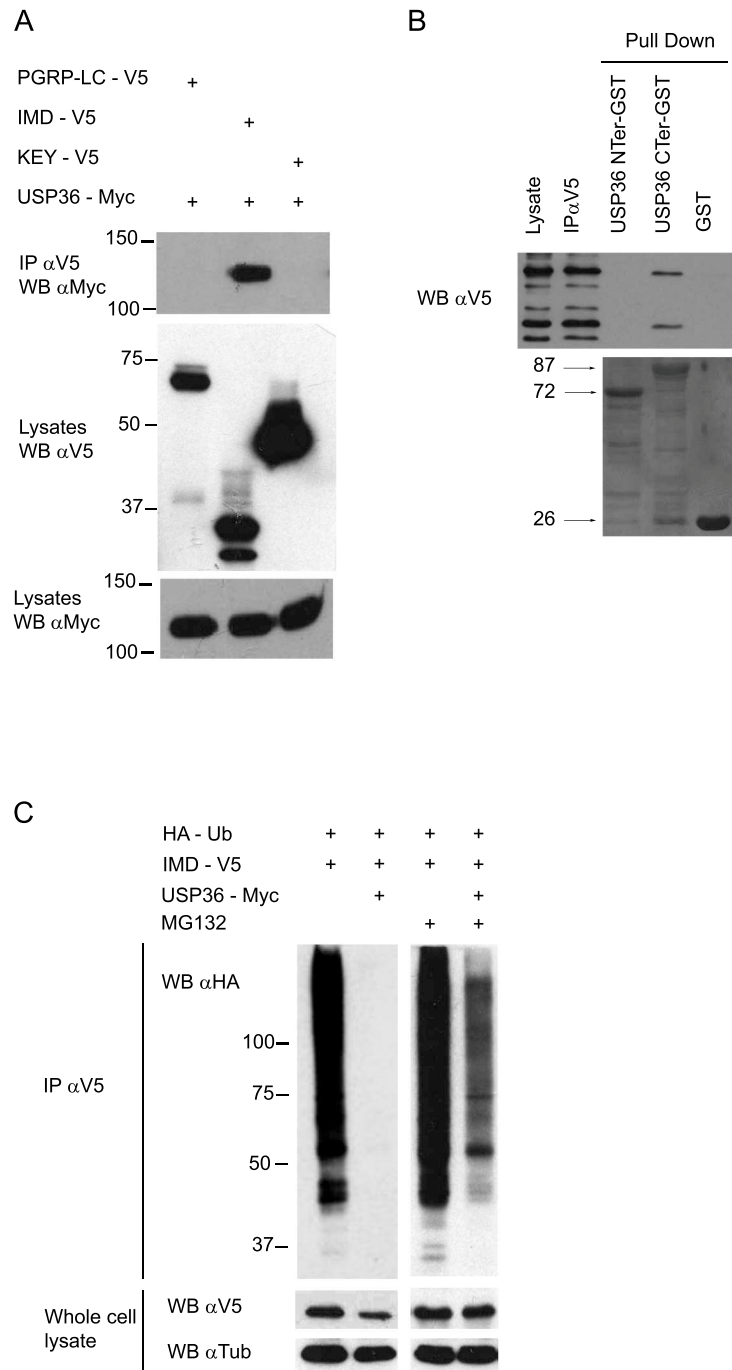


Figure 6

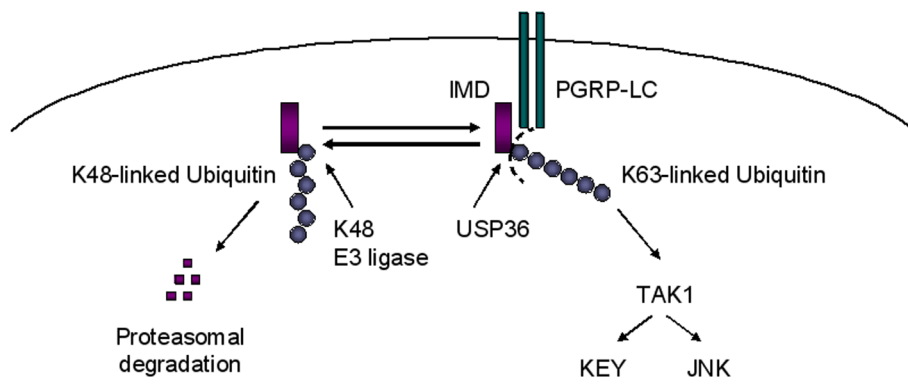


Figure 7

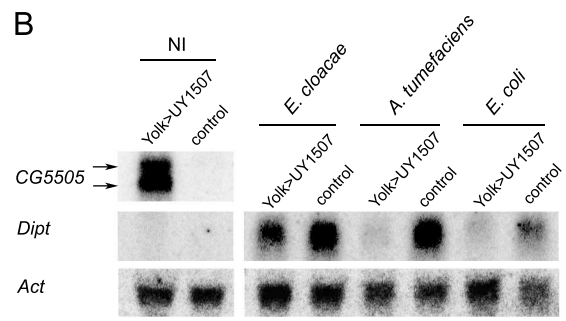
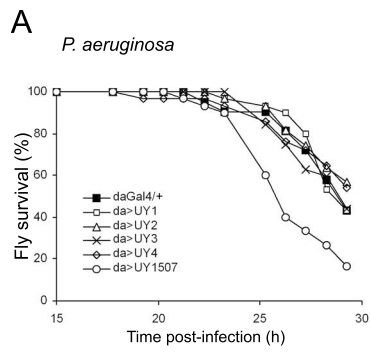


Figure S1

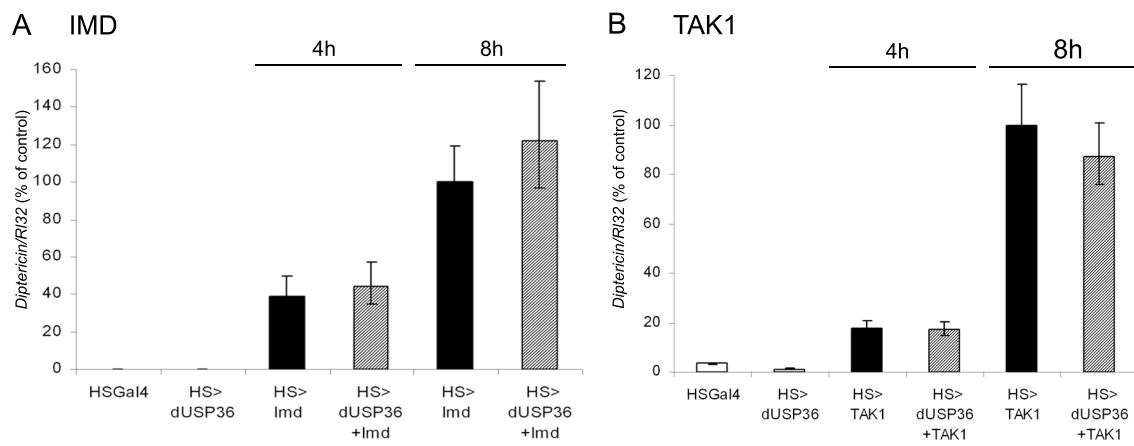


Figure S2

Imd-IR

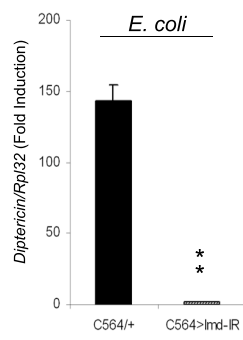


Figure S3

I.3. Résultats complémentaires : localisation d'USP36 dans la cellule

I.3.1. Introduction : Localisation d'USP36 d'après la littérature

I.3.1.a) Chez la drosophile

L'équipe de Spradling a récemment mis en évidence le rôle de dUSP36 dans le maintien des cellules souches de drosophile via son rôle dans la déubiquitination de l'histone H2B (Buszczak et al., 2009). Lors de cette étude ils ont déterminé la localisation cellulaire de dUSP36 dans plusieurs types de cellules souches : les cellules souches des lignées germinales et les cellules souches des lignées épithéliales folliculaires et intestinales. Ils ont utilisé une souche exprimant une fusion endogène dUSP36-GFP (Green fluorescent protein) où une séquence codante de la GFP est insérée en tant que nouvel exon dans le gène *dUsp36* (Morin et al., 2001). Dans leur souche, la séquence de la GFP est insérée entre les exons 1 et 2 des transcrits *dUSP36-RA* et *RD* ; cette souche permet donc probablement l'expression des deux grandes isoformes de dUSP36 (PA et PD) en fusion avec la GFP (figure 16). Ils ont également produit un anticorps anti-dUSP36 dirigé contre l'ensemble des isoformes de dUSP36 capable de détecter la protéine endogène. Les fusions dUSP36-GFP ainsi que la protéine endogène se localisent dans le noyau des cellules étudiées et plus particulièrement dans les nucléoles, compartiments sub-nucléaires composés de clusters de gènes codant des ARNs ribosomiques (Hernandez-Verdun, 2006 ; figure 17). Les nucléoles ont un rôle majeur dans la biogénèse des ribosomes (Tschochner and Hurt, 2003) et participent également à des fonctions non ribosomales incluant la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress ainsi que la maturation d'ARNs non-codant (Boisvert et al., 2007).

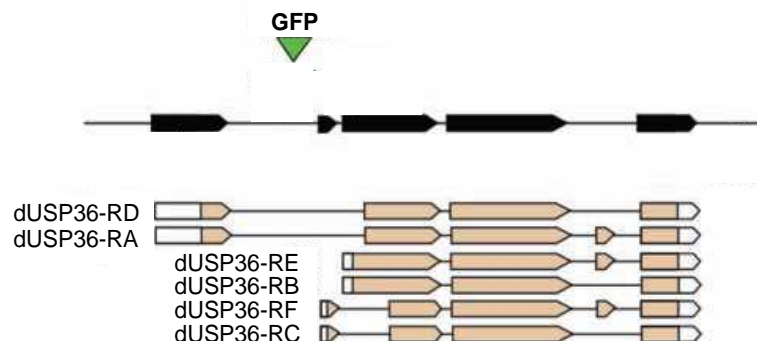


Figure 16. Représentation des différents transcrits de dUSP36 et de l'insertion de la séquence GFP. La séquence de la GFP (triangle vert) est insérée entre les deux premiers exons des transcrits longs RA et RD. *D'après Buszczak et al., 2009.*

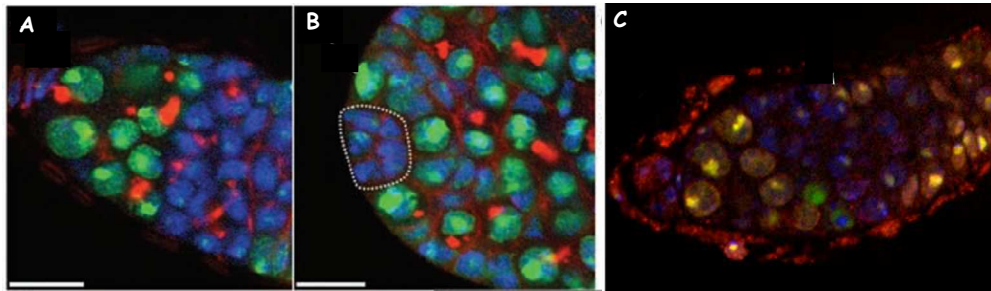


Figure 17. Localisation de dUSP36 en cellules de drosophile. Visualisation de dUSP36-GFP (vert) avec un anticorps anti-GFP durant l'ovogénèse (A) et la spermatogénèse (B). dUSP36-GFP se localise dans le noyau et est enrichi dans les nucléoles. HTS (marqueur du cytosquelette) (rouge), niche des cellules souches des gonades (ligne en pointillé). La protéine dUSP36 endogène (rouge) se superpose avec la protéine de fusion dUSP36-GFP (vert) au sein des cellules de la lignée germinale (C). Cette colocalisation a été observée dans tous les tissus testés. ADN (bleu). Barre d'échelle : 10µm. D'après *Buszczak et al., 2009*.

Bien que la localisation de dUSP36 soit principalement nucléaire, on remarque la présence de dUSP36 dans le cytoplasme également (Figure 17 A et B).

I.3.1.b) En cellules humaines

Le groupe de Komada vient de publier un article concernant l'implication de la protéine humaine USP36 dans la formation et la fonction des nucléoles (Endo et al., 2009). Ils ont exprimé la protéine humaine hUSP36 en fusion avec une étiquette flag (hUSP36-flag) dans des cellules HeLa et observé qu'elle se localise dans les nucléoles (figure 18 A-A''). Ils ont aussi généré un anticorps ciblant la protéine endogène et montré que celle-ci se localise également dans les nucléoles en cellules HeLa (figure 18 D-D'').

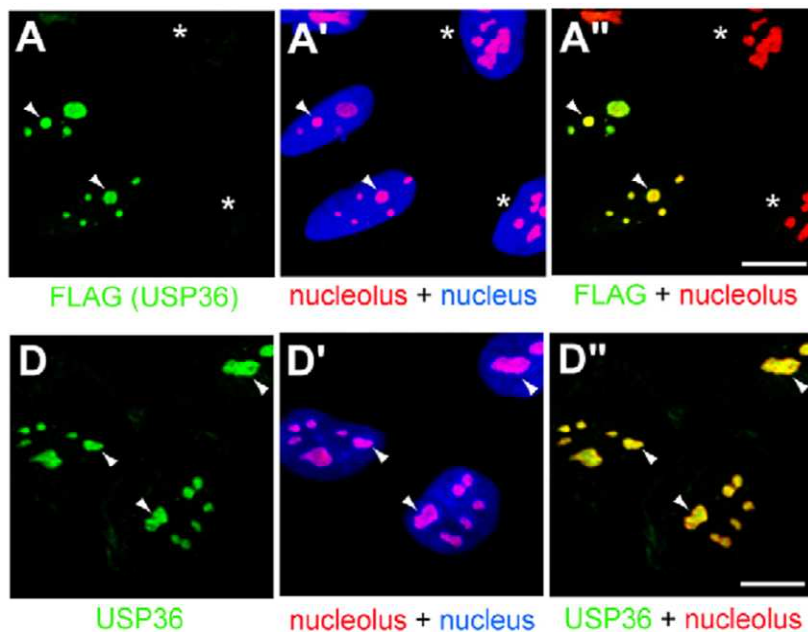


Figure 18. Localisation de hUSP36 en cellules humaines.

Visualisation de hUSP36-flag (vert) avec un anticorps anti-flag (A), des noyaux (bleu) et des nucléoles (rouge) (A') et superposition des marquages flag et nucléoles (A''). Visualisation de la protéine hUSP36 endogène (vert) (D), des noyaux (bleu) et des nucléoles (rouge) (D') et superposition des marquages hUSP36 et nucléoles (D''). hUSP36-flag et hUSP36 endogène se localisent dans les nucléoles. Les flèches indiquent des nucléoles et les étoiles des cellules non transfectées. Barre d'échelle : 10µm. D'après *Endo et al., 2009*.

D'après les auteurs, hUSP36 contient un domaine de localisation nucléolaire dans sa partie C-terminale qui lui permettrait de se localiser dans les nucléoles. Ce domaine est compris entre les acides aminés 801 et 1121 et comprend une série de répétitions d'arginines et de lysines. Privée de ce domaine C-terminal, hUSP36^{Δ801-1121}-flag perd sa localisation nucléolaire et devient exclusivement nucléoplasmique (figure 19).

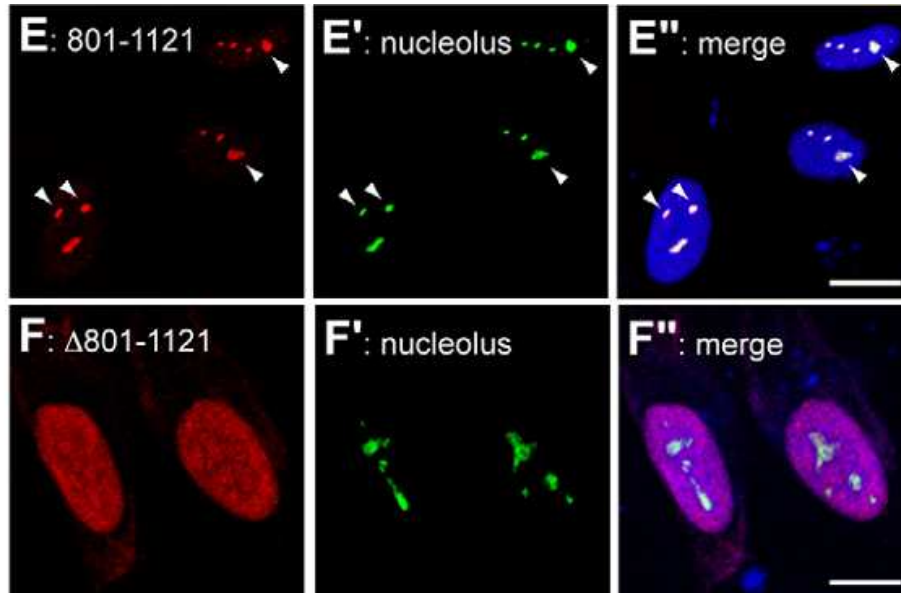


Figure 19. Localisation de hUSP36⁸⁰¹⁻¹¹²¹ et de hUSP36^{Δ801-1121} en cellules humaines. Visualisation des protéines étiquetée flag hUSP36⁸⁰¹⁻¹¹²¹ et de hUSP36^{Δ801-1121} (rouge) (E et F), des nucléoles (E' et F') et superposition des deux marquages (E'' et F''). Dans E'' et F'' les noyaux apparaissent en bleu. Les acides aminés 801 à 1121 de hUSP36 sont nécessaires et suffisants à la localisation de la protéine dans les nucléoles. Les flèches indiquent des nucléoles. Barre d'échelle : 10μm. D'après *Endo et al., 2009*.

I.3.2. Résultats : Localisation de dUSP36 en cellules S2 de drosophile

J'ai utilisé une construction permettant l'expression de l'isoforme dUSP36-PB (codée par *dUsp36-RB*) en fusion avec un tag myc (dUSP36-myc). J'ai transfecté cette construction en cellules S2 de drosophile et observé au microscope confocal la localisation de dUSP36-PB. Dans ces cellules, dUSP36-PB est cytoplasmique et apparaît aussi dans le noyau se concentrant en sa périphérie (figure 20). La localisation cytoplasmique de dUSP36-PB est en accord avec son rôle dans la voie Imd.

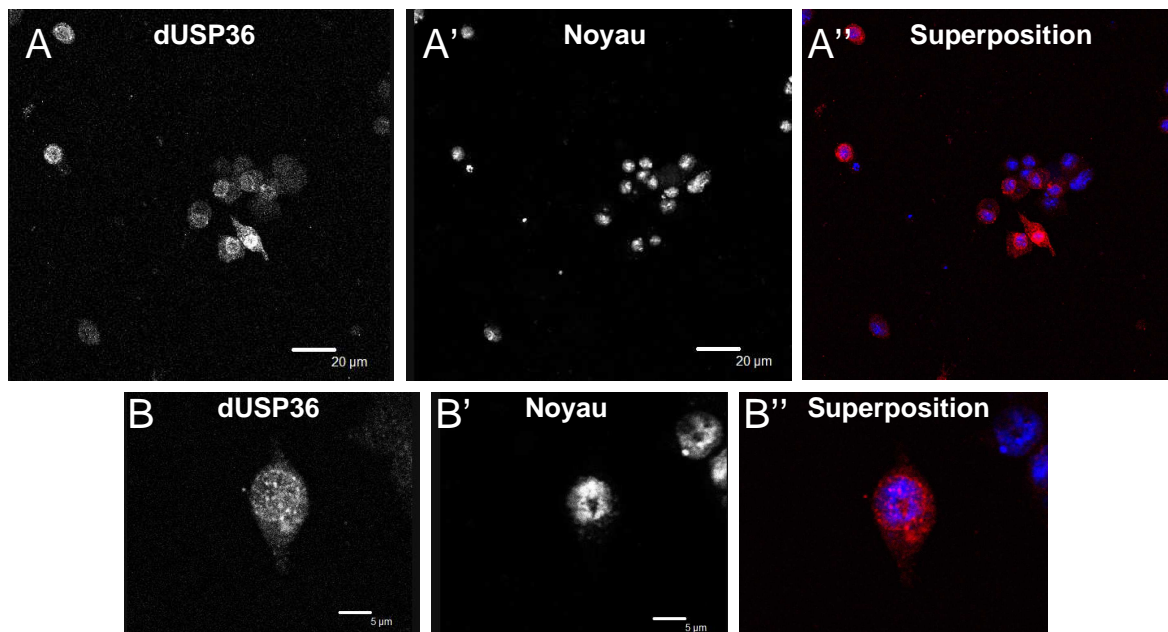


Figure 20. Localisation de dUSP36 en cellules S2 de drosophile. Visualisation de la protéine dUSP36 étiquetée myc (rouge) (A), du noyau (bleu) (A') et superposition des deux marquages (A''). Zoom d'une cellule (B, B' et B''). dUSP36-myc est cytoplasmique et périnucléaire. Les cellules S2 sont cultivées sur lame cc2 (LAB-TEK, Nalge Nunc International) dans du milieu DSM-10% SVF. Les transfections transitoires sont réalisées avec 50ng de pAc-dUSP36-myc, en présence de TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad). 96 heures après la transfection, les cellules sont fixées à température ambiante au paraformaldéhyde 4%, et perméabilisées avec 0,2% Triton X-100. La localisation de dUSP36 est déterminée grâce à un anticorps anti-myc (Cell signaling technology) dilué au 1/500, puis un anticorps secondaire couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) dilué au 1/1000. Marquage de l'ADN (bleu) au Hoescht (1µg/ml). Montage avec du FluorSave (Calbiochem), observation au Microscope confocal (objectif x63). Barres d'échelle : 20 et 5µm.

Je n'obtiens pas exactement le même marquage que le groupe de Spradling, car plus prépondérant dans le cytoplasme par rapport au noyau. Cela vient probablement du fait que j'ai observé la localisation cellulaire de l'isoforme dUSP36-PB alors que Buszczak et ses collaborateurs ont déterminé la localisation de toutes les isoformes de dUSP36 ou des formes marquées par la GFP. Quand ils observent toutes les isoformes, si la majorité se situent dans le noyau, l'anticorps détecte peut être moins bien les formes cytoplasmiques. En ce qui concerne les protéines dUSP36-GFP, il se peut qu'elles correspondent aux isoformes PA et PD qui pourraient ne pas localiser dans le cytoplasme.

Par ailleurs, j'ai analysé la localisation de dUSP36 dans des cellules immunocompétentes et non pas dans des cellules souches. On peut imaginer que suivant le type cellulaire, les modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles varient, ce qui pourrait influencer la localisation cellulaire des protéines.

Afin de déterminer plus précisément la localisation de dUSP36, nous allons poursuivre les études de marquages en cellules S2 à l'aide d'anticorps anti dUSP36 permettant la détection de la protéine endogène et de nouvelles constructions de chacune des isoformes de

dUSP36 en fusion avec des étiquettes « myc » ou « flag ». L'équipe envisage également de déterminer *in vivo* la localisation de dUSP36 dans les cellules du corps gras, principal organe de l'immunité.

II. Identification des « Ubiquitin Specific Proteases » impliquées dans la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile

II.1. Démarche scientifique

Comme de nombreux éléments des voies NF- κ B sont régulés par l'ubiquitination, les USPs qui constituent la plus grande partie des DUBs, représentent des candidats intéressants pour la recherche de régulateurs de ces voies de signalisation. De plus, il existe des homologues bien conservés chez la drosophile (figure 21), organisme qui offre la possibilité de coupler des cribles fonctionnels à des études *in vivo*. C'est l'approche que j'ai utilisé, au cours de ma thèse, pour identifier de nouveaux régulateurs négatifs des voies Imd et Toll.

Dans ce contexte, j'ai établi une collection d'ARN interférents, correspondant à des longs ARNs double brins (dsRNA) de quelques centaines de nucléotides, ciblant chacune des 21 USPs. Dans les cellules d'insectes, ces dsRNAs sont clivés en plusieurs dizaines de siRNAs (~20 nucléotides) permettant l'inactivation efficace des gènes ciblés (Clemens et al., 2000). J'ai mis au point les conditions d'utilisation de ces dsRNAs et criblé la collection en plaques 96 puits avec des gènes rapporteurs de l'activation des voies Imd et Toll (voir article figure 1). Trois USPs, dUSP36, dUSP2 et dUSP34 se comportent comme des régulateurs négatifs de la voie Imd (voir article figure 1A). Seule dUSP34 se comporte comme un régulateur négatif de la voie Toll (voir article figure 3B). Ces résultats montrent que seulement quelques USPs seraient impliquées dans le contrôle des voies NF- κ B et met en évidence la spécificité de substrat des USPs ainsi que celle du crible. J'ai participé à l'étude *in vivo* de dUSP36 avec Dominique Thevenon (Thevenon et al., accepté sous réserve) et je me suis principalement investie dans l'étude *in vivo* des deux autres candidats (voir carte des transcrits en annexe 2) ainsi que dans la caractérisation de leur activité catalytique *in vitro*. Les résultats correspondants sont décrits dans l'article qui suit.

L'originalité de mon travail a consisté à limiter le crible à une famille de gènes, ce qui a permis d'effectuer plusieurs cribles en conditions stimulée ou non stimulée et de détecter de nouveaux gènes régulateurs qui n'avaient pas été mis en évidence dans des cribles antérieurs réalisés sur une grande partie ou la totalité du génome (Foley and O'Farrell, 2004; Gesellchen et al., 2005). De plus ceci m'a permis de prouver *in vivo* la fonction des candidats sur lesquels on dispose d'encore peu d'informations chez les mammifères.

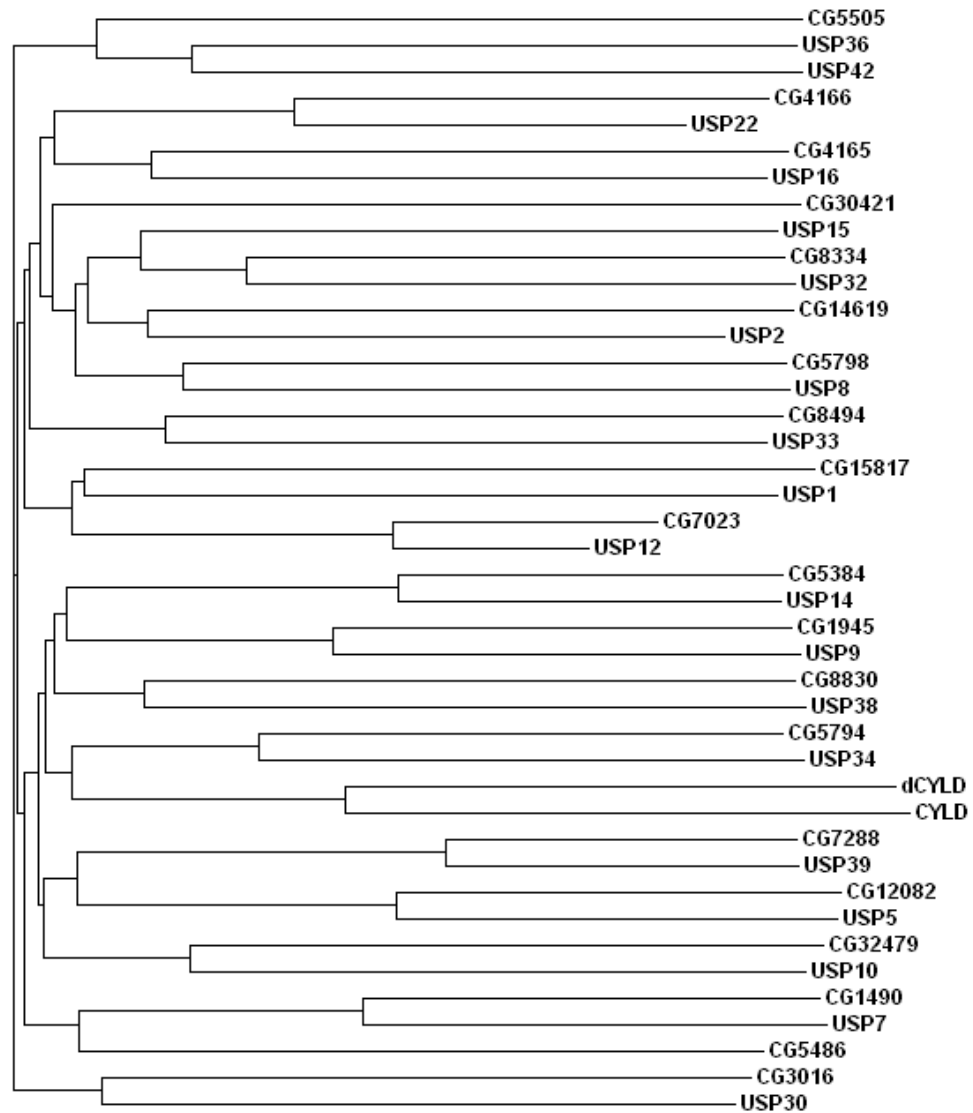


Figure 21. Phylogénie des Ubiquitin Specific Proteases de drosophile et de leurs orthologues humains. (réalisée grâce à clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)).

II.2. Article : Engel et al.,

Identifying ubiquitin proteases inhibiting innate immune signals in *Drosophila*

Engel Elodie, Thevenon Dominique, Mortier Magda, Balakirev Maxim, Taillebourg Emanuel and Fauvarque Marie-Odile.

Title: Identifying ubiquitin proteases inhibiting innate immune signals in *Drosophila*

Engel Elodie^{1,2,3}, Thevenon Dominique^{1,2,3}, Mortier Magda^{1,2,3}, Taillebourg Emmanuel^{1,2,3}, Balakirev Maxim⁴ and Fauvarque Marie-Odile^{1,2,3}.

Affiliations

¹ CEA, iRTSV, LTS, F-38054 Grenoble, France

² INSERM U873, F-38054 Grenoble, France

³ Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France

⁴ CEA, iRTSV, Biopuces, F-38054 Grenoble, France

Corresponding author

Marie-Odile Fauvarque: email, marie-odile.fauvarque@cea.fr

Phone +33 4 3878 2637, Fax +33 4 3878 5052

Running title: Screening *Drosophila* USPs on NF- κ B pathways

Abstract

Ubiquitination tightly regulates Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) signals regulating stress and innate immune response. In *Drosophila*, two NF- κ B-like pathways TOLL and IMD ensure a robust immunity. To determine which ubiquitin specific proteases (USP) and carboxyl hydrolases (UCH) would control these pathways, we created a dsRNA library to silence each of the twenty-one USPs and two UCHs identified in the *Drosophila* genome. Screening this library in immune competent S2 cells detected a few USPs as negative regulators of the IMD pathway (USP2, USP34, USP36) and of the TOLL pathway (USP34), each being required both with and without immune challenge. Overexpressing USP2 or USP34 *in vivo* impairs antimicrobial peptide genes expression and flies resistance to Gram negative pathogens whereas gene extinction provokes a constitutive deregulation of the pathway. USP2 hydrolyzes ubiquitin substrates *in vitro* and forms a complex with IMD suggesting that USP2 regulates IMD signalling via its deubiquitinating activity.

keywords: PGRP-LC, IMD, RNA interference screen, TOLL, USP

Introduction

Conjugation of ubiquitin monomers or polymers by ubiquitin ligases has emerged as a key mechanism for the control of the activity or the stability of proteins (Herrmann et al., 2007). Whereas lysine 48-linked poly-ubiquitin chains (K48) have long been described to drive proteasomal dependent degradation of proteins (Hershko and Ciechanover, 1998), mono-ubiquitination or lysine 63-linked poly-ubiquitin chains (K63) were more recently discovered to regulate the activity or the subcellular localisation of proteins (Haglund and Dikic, 2005). Consequently, ubiquitination regulate many cellular processes, including receptor endocytosis (Raiborg and Stenmark, 2009), DNA repair (Bergink and Jentsch, 2009) or signal transduction (Bhoj and Chen, 2009). In this context, ubiquitin proteases, which form a well defined family of proteins (Nijman et al., 2005), define putative biological targets in human therapies. Among the best known examples, the Nuclear factor Kappa-B (NF- κ B)-dependent signalling pathways, promoting inflammation, cell growth and innate immune signals, are regulated by the ubiquitination of several intermediates including scaffolding molecules, such as TRAF and RIP1, and protein kinases complexes such as Nemo, the γ subunit of the I κ B Kinase (IKK) (reviewed in Bhoj and Chen, 2009; Chen, 2005; Sun, 2008). Finally, the release of NF- κ B from the cytoplasm requires its dissociation from its inhibitor I- κ B which proteasomal degradation is induced by its phosphorylation and subsequent K48-linked ubiquitination (Chen et al., 1995). A few deubiquitinases, namely CYLD, A20 and Cezanne, have been found to mediate transient inhibition of NF- κ B dependent pathways (Boone et al., 2004; Brummelkamp et al., 2003; Enesa et al., 2008; Kovalenko et al., 2003; Massoumi et al., 2006; Mauro et al., 2006; Trompouki et al., 2003; Wertz et al., 2004).

In *Drosophila* fruit fly, two conserved NF- κ B-like signalling pathways TOLL and IMD contribute to a robust innate immunity by promoting the expression of antimicrobial peptide genes in epithelial cells, circulating blood cells and fat body (Ferrandon et al., 2007; Lemaitre and Hoffmann, 2007). The TOLL receptor is activated by binding of the processed cytokine Spätzle (SPZ) which cleavage depends on upstream extracellular proteolytic cascades initiated by circulating Peptidoglycan Receptors proteins (PGRPs) following the recognition of various pathogens, mostly fungi and Gram-positive bacteria (Lemaitre et al., 1996). Activated TOLL associates to adaptor proteins dMYD88 and Tube, resulting in the activation of a serine/threonine kinase Pelle leading to phosphorylation and ubiquitination of the I κ B-like molecule Cactus (CACT), and to its subsequent degradation by the proteasome (Nicolas et al.,

1998). CACT degradation releases NF- κ B like factors, DIF and Dorsal (DL), which translocate to the nucleus (Lemaitre et al., 1995b) and activate a set of antimicrobial peptide genes, among which *Drosomycin (Drs)* encodes a potent antifungal peptide (Lemaitre et al., 1996). The IMD pathway is activated predominantly in response to infection by Gram-negative bacteria and results in the production of another set of antibacterial peptides, including *Diptericin (Dipt)* and *Attacin (AttA)* (Lemaitre et al., 1995a). This pathway is induced by the direct recognition of Gram-negative peptidoglycan via the receptor PGRP-LC/IRD7 which associates with the scaffolding protein IMD (Choe et al., 2005). This association induces the activation of the *Drosophila* TAK1 (dTAK1) which activates Kenny (KEY), the *Drosophila* IKK, and the subsequent phosphorylation of the NF- κ B like factor Relish (REL) (Silverman et al., 2000). As in mammalian cells, a set of conserved ubiquitin ligases regulates the *Drosophila* TOLL and IMD pathways (Chiu et al., 2005; Khush et al., 2002; Leulier et al., 2006; Tsuda et al., 2005; Zhou et al., 2005). *Drosophila* CYLD specifically binds KEY and its overexpression down-regulates antimicrobial peptide genes expression (Tschritzis et al., 2007). In addition, we found *Drosophila* USP36 in a genetic screen for genes involved in flies resistance to the Gram negative pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and showed its function in preventing constitutive IMD-dependent signal activation through its catalytic activity (Thevenon et al., in revision).

Regulation of TOLL and IMD pathways by ubiquitination prompted us to identify other ubiquitin proteases acting on *Drosophila* immune signals. We identified 21 USPs and two ubiquitin carboxyl hydrolase (UCH) encoding genes in the *Drosophila* genome, each possessing a close human homolog, and created a double strand RNA (dsRNA) specific library to silence each corresponding gene in immune competent S2 cells. Screening this library identified USP2, USP34 and USP36 as three negative regulators of the IMD pathway, and USP34 as a negative regulator of the TOLL pathway, each being required for preventing signal activation both in presence and in the absence of immune challenge. Our finding thus shows that only a few USPs would be involved in the regulation of NF- κ B pathways highlighting their substrate specificity. Epistatic studies in S2 cells places USP36 upstream or at the level of IMD, in accordance with its function on IMD deubiquitination (Thevenon et al., in revision), whereas USP2 and USP34 may act both at the level of IMD and downstream IMD. Moreover, we demonstrate the strict requirement of PGRP-LC to activate the IMD pathway by ectopic IMD expression suggesting that IMD strictly needs to associate with PGRP-LC to mediate signal transduction. We further investigated the function of USP2 and USP34 in the negative regulation of IMD and TOLL pathways. Notably, we demonstrated *in*

in vivo that overexpressing the corresponding genes impairs antimicrobial peptide genes expression and flies resistance to Gram negative (USP2 & USP34) or Gram-positive (USP34) pathogens and that USP2 or USP34 gene extinction in fat body provokes a constitutive deregulation of the IMD pathway. Finally, we used classical biochemical enzymatic assay to assess the deubiquitinating activity of mutated and wild type forms of USP2 *in vitro* and showed that USP2 forms a complex with IMD in drosophila S2 cells thus suggesting that USP2 interferes on immune signalling through IMD deubiquitination.

Results and discussion

Three USPs inhibit the IMD pathway in S2 cells

We identified twenty-one USPs and two UCHs encoding genes in the *Drosophila* genome, each of these genes possesses one close human gene and was named accordingly in this study except those having a previous nomenclature in Flybase (Table 1). A library of dsRNA was created in order to knock-down each of these ubiquitin protease encoding gene in S2 cells (Clemens et al., 2000). Activation of the IMD pathway was achieved by adding heat-killed *E. coli* in the culture media and was monitored using the *Attacin-luciferase* (*AttA-luc*) reporter gene (Tauszig et al., 2000). We observed that silencing *Usp2*, *Usp34* and *Usp36* resulted in up-regulation of the *AttA* promoter compared to control cells (Mock) or to cells treated with control GFP double strand RNAs (siGFP) whereas silencing the other USPs encoding genes had no significant effect on the induction level of *AttA* promoter (Fig. 1A). To further identify the USPs required to prevent constitutive activation of the IMD pathway in the absence of elicitor, the library was then screened for *AttA* activation in non-infected cells. Interestingly, silencing the same three genes resulted in significant constitutive expression of the *AttA* reporter gene, which, in the case of *siUsp34* silenced cells, reached similar or even higher activation levels than those observed following *E. coli* stimulation (Fig. 1B). Therefore, these three proteases are strictly required to maintain the low basal level of activation of the IMD pathway in un-stimulated cells. Up-regulation of the IMD pathway in *Usp2*, *Usp34* and *Usp36* silenced cells was dependent on REL function since co-silencing *Rel* with each of these 3 genes fully prevented the deregulation of the *AttA* promoter (Fig. 1C). Gene silencing was verified by monitoring *Usp36*, *Usp2* and *Usp34* transcripts in dsRNAs treated cells (Suppl. Fig. S1). No effect on the IMD signalling pathway was observed when silencing either *Uch* or *Uchl-L3* in similar conditions (Suppl. Fig. S2 A,B). This screen thus defines

USP2, USP34 and USP36 as down-regulators of the IMD pathway acting upstream REL in S2 cells.

IMD requirement in *siUsp*-mediated signal induction

To assess whether IMD is required to mediate deregulation of the pathway in dsRNA treated cells, we co-silenced each of the three *Usp* genes with *Imd*. We observed no induction of *AttA* when co-silencing *Imd* with *dUsp36* in S2 cells (Fig. 1D). In contrast, *AttA* was still inducible when co-silencing *Imd* with either *Usp2* or *Usp34*, reaching a similar induction level as in control cells although less elevated than that observed in only *Usp2*- or *Usp34*-silenced cells (Fig.1D). Co-silencing either *Usp2*, *Usp34* or *Usp36* with other major components of the IMD pathway: *dTAB2*, *dTAK1* and *Key* did not result in a significant induction of *AttA-luc* (data not shown). Therefore, USP36 may act at upstream IMD or at the level of IMD, whereas USP2 and USP34 may act both at the level of IMD and of other components situated just downstream of IMD.

PGRP-LC is strictly required for IMD activity

During the course of our co-silencing experiments, we were intrigued by the observation that silencing *PGRP-LC* prevented any activation of the *AttA* promoter in *Usp2*, *Usp34* or *Usp36* silenced cells (Fig. 2A), although these three enzymes are likely acting downstream of PGRP-LC. To further decipher the requirement of PGRP-LC in IMD-dependent *AttA* activation, we tested the effect of silencing PGRP-LC in cells overexpressing IMD. Constitutive expression of IMD was obtained in cells transfected with the *pAc-Imd* construct and, as expected, resulted in a strong constitutive 40 fold induction of *AttA-luc* (Fig. 2B). Surprisingly, this induction was fully prevented by silencing PGRP-LC indicating that IMD strictly requires the presence of the upstream receptor PGRP-LC to induce the activating signal (Fig. 2B). This result argues in favour of an essential scaffolding function of PGRP-LC allowing for IMD association with other downstream components of the pathway such as dTAB2 and dFADD.

***Drs* activation depends on DL and REL in S2 cells**

Activation of the TOLL pathway was induced in S2 cells through the expression of its ligand SPZ and was monitored through the activation of a *Drosomycine-luciferase* (*Drs-luc*) reporter

construct (Ferrandon et al., 1998). As described in a previous study (Tanji et al., 2007), we observed that both DL and REL, but not DIF, were required for TOLL mediated activation of the *Drs* promoter in S2 cells (Fig. 3A). Indeed, silencing either *Dorsal* or *Rel* inhibited the induction of the *Drs* promoter which was further inhibited in *Dorsal+Rel* double silenced cells. In contrast, silencing *Dif* did not prevent *Drs* induction by SPZ (Fig. 3A) whereas, as expected, silencing the upstream components, dMYD88 or SPZ, prevented the activation of the *Drs* promoter (Fig. 3A). To further assess a putative contribution of intermediates products of the IMD pathway in TOLL-mediated activation of the *Drs* promoter, we silenced *PGRP-LC*, *Imd*, *dTAB2* and *Key* in SPZ expressing cells. None of them affected the induction level of *Drs* promoter induced by SPZ, indicating that REL, but not other components of the IMD pathway, contributes to TOLL-mediated activation of the *Drs* promoter in S2 cells (Fig. 3A).

USP34 inhibits the TOLL pathway in S2 cells

To identify USPs acting on the Toll pathway, the USPs dsRNA library was screened on SPZ-dependent activation of the *Drs-luc* reporter gene. This screen revealed that only the silencing of *Usp34* resulted in a significant enhancement of *Drs-luc* induction compared to control cells (Fig. 3B). Similarly, only the silencing of *Usp34* induced the *Drs* promoter in un-stimulated cells (Fig. 3C). Activation of the *Drs* promoter in *Usp34*-silenced cells was strictly dependent on REL+DL and dMYD88 indicating that USP34 would act on upstream elements of the TOLL pathway to prevent *Drs* expression in S2 cells (Fig. 3D). No effect on the TOLL signalling pathway was observed when silencing *Uch* or *Uchl-L3* in similar conditions (Suppl. Fig. S2 C,D). We conclude that USP34 is the sole ubiquitin protease detected in our screen inhibiting the TOLL pathway both in stimulated and un-stimulated cells.

USP2 and USP34 suppress fly immunity *in vivo*

To assess the function of USP2 and USP34 on immune signalling *in vivo*, we created a UAS-*Usp2* transgenic strain. In the absence of available full length cDNA of *Usp34* (<http://flybase.org/reports/FBgn0039214.html>), we used a P{UAS} insertion located upstream of the *Usp34* genetics unit (P{EPgy2}ash2^{EY03971}). Overexpression of these two genes was induced in adults with the HspGal4 driver line and was verified by quantitative Real time PCR at 3, 6, 9 and 12 hours post-infection (Suppl. Fig. S3). These flies were then infected

with *E. coli* 12 hours after heat shock. A strong diminution of *Dipt*, and to a less extent of *AttA*, expression was observed in *E. coli* infected flies overexpressing either USP2 or USP34 (Fig. 4A,B). Inhibition of antimicrobial peptide gene expression resulted in increased fly sensitivity to the Gram-negative pathogens *E. cloacae* and *K. pneumoniae* (Fig 4C,D). Therefore, USP2 and USP34 behave as immune suppressors against Gram-negative pathogens when overexpressed *in vivo*.

Since USP34 was also found to prevent *Drs* expression in S2 cells, we tested the effect of overexpressing USP34 on *Drs* expression in flies infected with the Gram-positive bacteria *M. luteus*. Similarly as observed for *Dipt*, but to a less extent, overexpressing USP34 reduced *Drs* expression level at 12 and 24 hours after infection (Fig. 4E). This phenotype was associated to increased flies sensitivity to the Gram positive pathogen *E. faecalis* (Fig. 4F).

USP2 and USP34 prevent constitutive IMD signalling

To further investigate the *in vivo* function of USP2 and USP34, we used UAS-Usp2-IR (VDRC #37930) and UAS-Usp34-IR (VDRC #27517) transgenic lines expressing inverted repeat cDNA sequences allowing for gene silencing expression *in vivo*. Silencing *Usp2* resulted in pupal lethality showing a phenotype similar to the lethal insertion P{GawB}CG14619^{PG117} localized in the *Usp2* gene locus. To avoid lethality, gene silencing was then induced at the adult stage by inhibiting transgene expression with the Gal80ts inhibitor and inducing its expression only at the adult stage by switching flies to 29°C (see methods). Fat body directed silencing of either *Usp2* or *Usp34* using these experimental conditions resulted in *Dipt* and *AttA* activation in the absence of immune challenge (Fig. 5). In contrast to *Dipt* and *AttA*, no significant induction of neither *puc* (JNK) nor *Drs* (TOLL) was observed in flies raised in similar conditions (Fig. 5). Our *in vivo* study demonstrates that USP2 and USP34 are required in fat body cells to specifically and permanently prevent the constitutive activation of the IMD pathway whereas the TOLL pathway is not deregulated *in vivo* even when silencing *Usp34* gene expression.

USP2 is an active deubiquitinating enzyme

In order to test the catalytic activity of dUSP2 and dUSP34 on ubiquitin substrates, each catalytic domain was expressed as a recombinant protein in bacteria expressing the Ub- β -gal fusion protein. Whereas USP2 cleaved Ub- β -gal, no activity was observed for USP34 (Fig.

6A). The purified recombinant catalytic domain of USP2 also hydrolyzed synthetic K48 and K63 tetra-ubiquitin chains *in vitro* resulting in the accumulation of ubiquitin monomers (Fig. 6B,C). The catalytic domain of USP2 contains the Cys residue critical for catalysis at position 540. Mutations of this conserved residue, Cys to Ser (C540S) was introduced in the dUSP2 sequence and resulted in a total lost of hydrolysis of Ub- β -gal fusion protein and of tetra ubiquitin chains (Fig. 6A-C). These results indicate that *drosophila* USP2 protein is an active deubiquitinating enzyme both on mono and poly-Ub substrates *in vitro*. Since incomplete cDNA was used to subclone the catalytic domain of USP34, we might have a too short protein fragment to detect USP34 catalytic activity. Obtaining larger or full length cDNA clones will be required to answer the question of the catalytic activity of USP34.

USP2 interacts with IMD in S2 cells

IMD is subjected to polyubiquitination in S2 cells (Thevenon et al., in revision; JM Reichhart and N. Silverman, personal communication). We thus used a co-immunoprecipitation assay in transfected *drosophila* S2 cells to investigate the ability of dUSP2 to interact with IMD. In fact, IMD, but not PGRP-LC or Key, co-immunoprecipitated USP2 indicating that IMD and USP2 form a complex when co-expressed in *drosophila* cells (Fig. 7A). To further map the interaction domain of dUSP2 with IMD, we performed a GST pull down assay with two truncated forms of the dUSP2 proteins corresponding to the N-terminal half and the C-terminal part which contains the catalytic domain. In this assay, the N-terminal part retained the recombinant IMD protein to a higher extent than the C-terminal part (Fig. 7B). This indicates that dUSP2 interacts tightly with IMD through its N-terminal domain whereas interaction via the C-terminal part would be more labile as expected for the catalytic domain.

Concluding remarks

Like phosphorylation, ubiquitination is a reversible chemical modification which acts on most if not all cellular biological processes. As such, ubiquitin proteases define a clearly delimited class of enzymes regulating cell signalling, survival or differentiation which are amenable to chemical inhibition with therapeutic perspectives. Ubiquitination was notably described to regulate NF- κ B pathways in mammalian and *Drosophila* innate immune response. We thus designed and screened a specific dsRNA library targeting *Drosophila* USP encoding genes to identify novel negative regulators of the two *Drosophila* NF- κ B like signalling pathways

TOLL and IMD. Interestingly, only 3 USPs (USP2, USP34 and USP36) were found to be required in the negative regulation of the IMD pathway and only one (USP34) was commonly required in the negative regulation of TOLL and IMD pathways. These results argue in favour of the hypothesis that these proteases possess a few numbers of specific substrates. Using genetic approaches in *Drosophila*, we confirmed the requirement of USP2 and USP34 in fly innate immunity whereas the function of USP36 on IMD signalling has been independently detected from a genetic screen for flies displaying modified resistance to *Pseudomonas aeruginosa* (Thevenon et al., in revision). Further *in vitro* analysis showed that *Drosophila* USP2 interacts with the scaffolding molecule IMD suggesting that USP2 down-regulates the pathway via IMD deubiquitination. Human protein USP2 was shown to be involved in P53 regulation and overexpressed in several cancer cells (Graner et al., 2004; Priolo et al., 2006; Stevenson et al., 2007). More recently, it was also demonstrated that silencing *USP2* contributes to TNF α -dependent hepatocyte survival in mice, presumably due to an enhanced transcriptional activity of NF- κ B (Haimerl et al., 2009). This last hypothesis should be now verified in the light of the activity of USP2 in IMD signalling in the *Drosophila* fat body, an organ ensuring similar functions as mammalian liver. In particular, it should be tested whether USP2 deubiquitinates RIP1, which similarly as IMD, is subjected to polyubiquitination and plays essential scaffolding role in TNF-R-dependent signalling.

Experimental procedures

Cell culture and RNA silencing

Drosophila S2 cells were maintained in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen). Gene inactivation was obtained by incubating 0,4 µg double strand RNA (dsRNA) for 48h at 26°C with $1,2 \cdot 10^5$ S2 cells cultured in 96-well tissue culture plates (adapted from (Clemens et al., 2000)). DNA templates for dsRNA synthesis were generated by PCR using the primers specific for each target gene designed from *Drosophila* RNAi screening center databases : (<http://flyrnai.org>) (Flockhart et al., 2006) (for Uch-L3) or (<http://www.dkfz.de/signaling2/rnai/ernai.html>) (for the 21 USPs, Uch, PGRP-LC, IMD, dTAK1, dTAB2, Key, Relish, Dorsal, Dif, Spätzle, dMyd88 and dTRAF2). Purified PCR products were used as DNA templates for *in vitro* transcription of RNAi using the MEGAscript RNAi kit (Ambion).

Fly strains, screening and infections

Flies were raised on standard culture medium at 25°C except if indicated. Transgenic lines were constructed in the P{UAST} vector (Brand and Perrimon, 1993). P{UAS-*dUsp2*} contains the *CG-14619-RA* cDNA subcloned from SD02480 (DGRC). Following lines were recovered from VDRC: P{UAS-*Imd-IR*} (#9253); P{UAS-*dUsp2-IR*} (#37930) and P{UAS-*dUsp34-IR*} (#27517) (Dietzl et al., 2007). Other stocks were recovered from the *Drosophila* Bloomington stock center.

Heat-shock driven expression of transgenes was achieved by crossing flies with the HspGal4 (HSGal4) driver line. For testing the activation of the IMD pathway, the progeny was submitted to sequential temperature changes: 30 min 37°C, 30 min 18°C, 30 min 37°C, 1 hour 28°C, 25°C 12 hours. For testing the activation of the Toll pathway, the progeny was submitted to 1 hour at 37°C. Conditional expression in fat body of transgenes *Usp-IR* was achieved by crossing *Usp-IR*, *Gal80ts* flies with the c564Gal4 (c564) driver line; progeny were maintained at 18°C during development and switched at 29°C during 4 days at adult stage.

Monitoring IMD and TOLL pathways activation in S2 cells

To monitor IMD and TOLL pathways activation, we utilised the reporter constructs *pAttA-luc* (Tauszig-Delamasure et al., 2002) and *pDrs-Luc* (Ferrandon et al., 1998), respectively. We further constructed a novel normalisator *pAc-luc* which allowed for Dual-luciferase

reporter assay (Promega). DNA transfection was performed with 20pg of *pAc-luc* normalisator and 2ng of *pAttA-luc* or *pDrs-luc* 48h prior luciferase detection (ie., simultaneously with dsRNAs). To activate the IMD pathway, heat-killed *E. coli* ($5 \cdot 10^7$) were added 4 hours prior dual detection of the two luciferases. The activation of the TOLL pathway was induced by the transfection of 20ng of *pAc-Spätzle* (*pAc-Spz*) gene coding a processed form of Spätzle (simultaneously with other constructs) (Morisato and Anderson, 1994).

Real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted from adult flies using Absolutely RNA Miniprep kit from Statagene. For real-time PCR analysis, cDNAs were synthesized with AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene). An amount of cDNA equivalent to 0.01 µg of total RNA was subjected to 40 cycles of PCR amplification consisting of a 10s incubation at 95°C and 30s at 60°C. Output was monitored using SYBR Green core reagents and the Mx3000P instrument (Stratagene). All the results were normalized to the *rpl32* RNA level. The primer sequences were designed using PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

***In vitro* deubiquitinating assays**

Mutations in the USP2 (USP2C540S) and USP34 (USP34C2024S) catalytic domain were introduced using QuickChange XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene). N-terminal domain of USP2{1-531} and wild type or mutated catalytic domains of either USP2{475-856} or USP34{1933-2459}, were expressed as GST-fusion proteins in transformed *E. coli* BL21 PlyS. To assess proteolytic cleavage of ubiquitin, GST-fusion proteins were coexpressed with Ub-β-gal fusion protein for 4 hours at 28°C in transformed *E. coli* XL1 Blue. Bacteria were lysed in 100µl Laemmli solution. Samples were subjected to SDS-PAGE (6% gel) and western blotting with a rabbit anti β-Gal antibody (ROCKLAND). To assess proteolytic cleavage of ubiquitin tetramers, GST-fusion proteins were induced for 1 hour at 25°C and purified on Gluthatione Sepharose 4B (Amersham Bioscience) from *E. coli* lysates prepared in 2ml of Triton buffer (150mM NaCl, 40mM Tris pH 7.4, 0.6% Triton x 100, 4mM EDTA, 4mM EGTA, 2mM DTT, protease inhibitor cocktail SIGMA, 1 mg/ml Lysozyme). One µg of fusion proteins fixed on sepharose 4B was incubated with either K48-or K63-linked polyubiquitin substrates (Boston Biochem, Inc) in 20µl of Phosphate buffer saline containing 5mM MgCl₂, 2mM DTT for 18 hours at 37° with agitation. Samples were

subjected to SDS–PAGE (11% gel) and western blotting with a rabbit anti Ubiquitin-protein conjugates antibody (BIOMOL International)

Immunoprecipitation and immunoblotting

Co-immunoprecipitation were performed following standard procedures in S2 cotransfected cells with 10µg of Myc tagged full length *dUsp2* construct in pAc/HisB vector (Invitrogen) (dUSP2-Myc) and 10µg of V5-tagged full length of either IMD, PGRP-LC (Choe et al., 2005) or KEY (Tsichritzis et al., 2007). Pull Down assay were performed in S2 cells transfected with the IMD-V5 construct and lysed after 48h. The lysate was employed in a GST-USP2 full length, Nter or Cter pull down assays. Pull downs were blotted with antibody against V5 to detect bound IMD-V5.

Acknowledgement

We thank Nicole Assard and Alexandre Deshiere for technical advices, Dr Jacques Baudier as head of the TS laboratory, and all members of the TS laboratory. We are grateful to Claire Bama and Irène Maréchal for making *Drosophila* food. We thank Pr JL Imler for providing us with reporter plasmid constructs, the DGRC, VDRC, and Bloomington stock center for sending flies. This work was supported by Region Rhone-Alpes (Cluster10 “Infectiologie”).

Bibliography

- Bergink, S. and Jentsch, S. (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*, **458**, 461-467.
- Bhoj, V.G. and Chen, Z.J. (2009) Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, **458**, 430-437.
- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C. and Ma, A. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, **5**, 1052-1060.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M. and Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, **424**, 797-801.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **9**, 1586-1597.
- Chen, Z.J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.
- Chiu, H., Ring, B.C., Sorrentino, R.P., Kalamarz, M., Garza, D. and Govind, S. (2005) dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev Biol*, **288**, 60-72.
- Choe, K.M., Lee, H. and Anderson, K.V. (2005) *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1122-1126.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A. and Dixon, J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6499-6503.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Opel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. and Dickson, B.J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, **448**, 151-156.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J.C., Haskard, D.O., Dean, J.L. and Evans, P.C. (2008) NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem*, **283**, 7036-7045.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C. and Hoffmann, J.A. (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol*, **7**, 862-874.
- Ferrandon, D., Jung, A.C., Cricqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. and Hoffmann, J.A. (1998) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J*, **17**, 1217-1227.
- Flockhart, I., Booker, M., Kiger, A., Boutros, M., Armknecht, S., Ramadan, N., Richardson, K., Xu, A., Perrimon, N. and Mathey-Prevot, B. (2006) FlyRNAi: the *Drosophila* RNAi screening center database. *Nucleic Acids Res*, **34**, D489-494.
- Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L.J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. and Loda, M. (2004) The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, **5**, 253-261.

- Haglund, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*, **24**, 3353-3359.
- Haimerl, F., Erhardt, A., Sass, G. and Tiegs, G. (2009) Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte survival. *J Biol Chem*, **284**, 495-504.
- Herrmann, J., Lerman, L.O. and Lerman, A. (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*, **100**, 1276-1291.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Khush, R.S., Cornwell, W.D., Uram, J.N. and Lemaitre, B. (2002) A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol*, **12**, 1728-1737.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. and Courtois, G. (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, **424**, 801-805.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007) The host defense of Drosophila melanogaster. *Annu Rev Immunol*, **25**, 697-743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1995a) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1995b) Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in Drosophila. *EMBO J*, **14**, 536-545.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B. and Meier, P. (2006) The Drosophila inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Mol Cell Biol*, **26**, 7821-7831.
- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A. and Fassler, R. (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*, **125**, 665-677.
- Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P. and Leonardi, A. (2006) ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem*, **281**, 18482-18488.
- Morisato, D. and Anderson, K.V. (1994) The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Cell*, **76**, 677-688.
- Nicolas, E., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. and Lemaitre, B. (1998) In vivo regulation of the IkappaB homologue cactus during the immune response of Drosophila. *J Biol Chem*, **273**, 10463-10469.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
- Priolo, C., Tang, D., Brahmamandan, M., Benassi, B., Sicinska, E., Ogino, S., Farsetti, A., Porrello, A., Finn, S., Zimmermann, J., Febbo, P. and Loda, M. (2006) The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res*, **66**, 8625-8632.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, **458**, 445-452.

- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D. and Maniatis, T. (2000) A Drosophila IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev*, **14**, 2461-2471.
- Stevenson, L.F., Sparks, A., Allende-Vega, N., Xirodimas, D.P., Lane, D.P. and Saville, M.K. (2007) The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *EMBO J*, **26**, 976-986.
- Sun, S.C. (2008) Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol*, **8**, 501-511.
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A.N. and Ip, Y.T. (2007) Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **27**, 4578-4588.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2002) *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol*, **3**, 91-97.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10520-10525.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G. (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*, **424**, 793-796.
- Tschritzis, T., Gaentzsch, P.C., Kosmidis, S., Brown, A.E., Skoulakis, E.M., Ligoxygakis, P. and Mosialos, G. (2007) A *Drosophila* ortholog of the human cylindromatosis tumor suppressor gene regulates triglyceride content and antibacterial defense. *Development*, **134**, 2605-2614.
- Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N. and Aigaki, T. (2005) The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep*, **6**, 1082-1087.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. and Dixit, V.M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, **430**, 694-699.
- Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D.S., Chung, Y., Chen, Z.J. and Maniatis, T. (2005) The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem*, **280**, 34048-34055.

Table 1

Human homologs	Droso gene	CG number	Template	Forward and Reverse primers (without T7 sequences)	Amplicon ID
USP1	Usp1	CG15817	LD22910	TACATAGCCAACCCGGATG CACAATGCCTTCGAAGTCC	HFA14155
USP2	Usp2	CG14619	SD04280	CCAGCAGACCAAGGACAC GAGCTGCTGCCGGATC	HFA20632
USP5	Usp5	CG12082	Genomic DNA	CTGGCATGCGCAATCTG CCAGATTGGTGGCCTTGTC	HFA08244
USP7 HAUSP	Usp7	CG1490	LD41613	GTCAGCGTCAACGGGAG CGACGACGGCAGTGTTT	HFA18909
USP8	Usp8	CG5798	Genomic DNA	CAGAACGATGAGCAGTTGG CCTCGGCTGCGGTTTC	HFA15876
USP10	Usp10	CG32479	LD28815	GGACGGATGCGCGAAC CTGGTGCCAGATCTGGGT	HFA16942
USP12	Usp12	CG7023	RE52890	TACTGGCCGAACGGAATG TTCTGCGCCTCCTGATAA	HFA08282
USP14	Usp14	CG5384	Genomic DNA	CTTGGTGAGCCGACTTCC TAGTTTCTCAAACGTCTGG	HFA16175
USP15	Usp15	CG30421	GH27809	TACCGAAATGATCGACATGG CCAGCCCGAGTCCAAGT	HFA02853
USP16	Usp16	CG4165	LD34905	GTATTCCGTGGCTTTCTTGT GGTCTGGCCGTTGGTCT	HFA04426
USP30	Usp30	CG3016	LD41827	CCCTCCAGTGCCATGCT GTTGCGGCGGCAGATT	HFA11378
USP32	Usp32	CG8334	Genomic DNA	GCTGTTTAATACCCAACCACT AGACCTCAAAGTAGATATAATTCT	HFA18265
USP33	Usp33	CG8494	LD43649	TCCGCTGGAGGGCTTC TCCGCCACCGAAAGTCC	HFA10979
USP34	Usp34	CG5794	Genomic DNA	CCGCACGATGGTGATCTT GCCATGCGACTGATCTCT	HFA07196
USP36 USP42	dUsp36 scny	CG5505	LD40339	GTGCGTTTTGACCAACGGA AGTGGCGTTTTGACGGG	HFA15875
USP38	Usp38	CG8830	LD36231	TGCTTATCGAGTGCAATTCA CATCGATAGGTGGTGGAAAG	HFA10510
USP39	Usp39	CG7288	LD38070	CATCAAAGCGAACGACTAC GGTAGATCGCATGTGAGGT	HFA07281
CYLD	Cyld	CG5603	Genomic DNA	TCGGGGCAAGATTCTTATTT TCAATTATGTCTGTGACATCAAG	HFA11313
USP9	fat facets	CG1945	LD22582	TGACATCCTGAAGCAGAACT TAACCATGTATACGAACGGTC	HFA20032
USP22	not	CG4166	LD43147	TCTATTCCGGCTCCCGT CGCAGGCTGAACTGTTTG	HFA28070
USP47	Ubp64E	CG5486	LD26783	ACCAGAGTGACGTATCGC TGGGTGTTGGCCATGTTCT	HFA11378
UCH-L3	Uch-L3	CG3431	LD24440	GAGCAACGCTAGCCAGATTC CTGCATGCGCTTCTCAATAA	DRSC27736*
-	Uch	CG4265	GH02396	AATACATATGCGGCTTTGGC CACTGGTGAACAAGGAGGT	BKN21774

Table 1 : Ubiquitin proteases screened on IMD and TOLL pathway

All primers were designed from (<http://www.dkfz.de/signaling2/rnai/ernai.html>) except for *UCH-L3 designed from DRSC : (<http://flymai.org>) (Flockhart et al., 2006).

Figure legend

Figure 1: USP2, USP34 and USP36 negatively regulate the IMD pathway in S2 cells

S2 cells were co-transfected with *pAttA-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the IMD pathway in the presence of heat-killed *E. coli* (A, C, D, E) or cells cultured in the absence of elicitor (B). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence indicated target genes (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction normalised in *siGFP* treated control cells (100%), the mean induction value of *AttA-luc* in cells treated with dsRNAs having no significant effect is shown (Mean, horizontal bar). A. Compared to *siGFP* treated cells, *siRel* prevents *AttA-luc* induction by *E. coli* and either *siUsp36*, *siUsp2* or *siUsp34* results in an increase of *AttA-luc* induction of about 6, 5 and 4 fold, respectively. B. Cells treated with *siUsp36*, *siUsp2* and *siUsp34* present a constitutive activation of *AttA-luc* in the absence of *E. coli*. C. Silencing *Rel* prevents the effect of silencing *Usp36*, *Usp2* and *Usp34* as observed in double siRNAs treated cells. D. Silencing *Imd* prevents the effect of silencing *Usp36* as observed in *siUsp36+siImd* treated cells, whereas co-silencing *Imd* with either *Usp2* or *Usp34* results in a similar induction level as in control cells, although reaching lower level than that observed in simple *siUsp2* or *siUsp34* treated cells (see A).

Figure 2: Silencing PGRP-LC prevents IMD-dependent activation of the pathway

S2 cells were co-transfected with *pAttA-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the IMD pathway by *E. coli* (A) or *pAc-Imd* (B). A. Silencing *PGRP-LC* prevents deregulation of the pathway provoked by silencing either *Usp36*, *Usp2* or *Usp34*. B. Overexpression of *Imd* in *pAc-Imd* transfected cells induces a strong 40 fold activation of *AttA-luc* (*siGFP*) compared to cells transfected with an empty *pAc* vector (*pAc-empty*). IMD-dependent activation of the pathway is totally prevented by silencing *PGRP-LC* (*pAc-Imd* + *siPGRP-LC*). All tests were done in triplicates with three independent experiments. One representative experiment out of three is shown. NI: Not infected cells; Mock: no dsRNA.

Figure 3: USP34 is a negative regulator of the Toll pathway in S2 cells

S2 cells were co-transfected with *pDrs-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the TOLL pathway in the presence of *pAc-Spz* (A, B, D) or in the absence of elicitor (NI in A, B, D and C). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to

silence the indicated target gene (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction normalised in siGFP treated control cells (100%), Mean represents the mean induction value of *Drs-luc* in cells treated with dsRNAs having no significant effect. A. Compared to cells treated with *siGFP*, silencing *Dif* does not prevent *Drs-luc* induction by *pAc-Spz* whereas silencing either *Dorsal*, *Myd88* or *Spz* inhibits the induction of the TOLL pathway. Silencing components of the IMD pathway (*Key*, *dTAK1*, *dTAB2*, *Imd* or *PGRP-LC*) has no effect on the induction of *Drs-luc*, except in the case of the NF- κ B-like factor *Rel* demonstrating that REL is necessary for activation of the TOLL pathway by SPZ in S2 cells. B. Silencing *Usp34* in the presence of *pAc-Spz* results in up-regulation of *Drs-luc* induction. C. Cells treated with *siUsp34* in absence of elicitor present constitutive activation of *Drs-luc* reaching similar induction level as in *Spz* treated cells. D. Silencing either (*Rel+Dorsal*) or *Myd88* prevents the constitutive activation of *Drs-luc* induced by silencing *Usp34*. All tests were done in triplicates. One representative experiment out of three is shown. NI: Not induced.

Figure 4: dUSP2 and dUSP34 suppresses fly immunity *in vivo*

A. Quantitative analysis of *Dipt* mRNAs levels by real-time PCR at 3, 6, 9 and 12 hours post infection with *E. coli*. Results are expressed as the fold induction level compared to the level of *Dipt* mRNAs in non-infected flies. HspGal4 directed expression of the EY03971 insertion driving *Usp34* expression (Hsp>dUsp34) (in HspGal4/+; EY03971/+ flies) or of the UAS-*dUsp2* transgene (Hsp>Usp2) (in HspGal4/+; UAS-*dUsp2*/+ flies) reduces *Dipt* induction caused by *E. coli* infection. B. Quantitative analysis of *AttA* mRNAs by real-time PCR at 3, 6, 9 and 12 hours post-infection with *E. coli*. Results are expressed as the fold induction compared to the level of *AttA* mRNAs in non-infected flies. HspGal4 driven expression of *Usp34* reduces *AttA* induction at 3, 6 and 12 hours following infection whereas no significant reduction of *AttA* was observed in *Usp2* overexpressing flies. Significant difference of $p < 0,05$ (*) or of $p < 0,01$ (**) compared to HspGal4/+ control flies (Student's-*t* test). C. Forty flies of 5 days old were infected with *E. cloacae* 12 hours following heat shock treatment and their survival kinetics was followed over 48 hours. The mutant *Key* is used as a Gram-negative sensitive control. HspGal4 directed expression of *Usp34* or of *Usp2* transgenes results in fly sensitivity to *E. cloacae* as compared to HspGal4/+ control flies ($p < 0,01$ (**)) Chi-2 test). D. The same experiment as C. was performed with *K. pneumoniae*. Hsp driven expression of *Usp34* or of *Usp2* transgene also result in fly sensitivity to *K. pneumoniae* ($p < 0,01$ (**)) Chi-2 test). E. Quantitative analysis of *Drs* mRNAs by real-time PCR at 12 and 24 hours post

infection with *M. luteus*. Results are expressed as the fold induction compared to the level of *Drs* mRNAs in non-infected flies. Hsp driven expression of *Usp34* significantly reduces *Drs* induction following infection. Significant difference of $p < 0,01$ (**) compared to HspGal4/+ control flies (Student's-*t* test). F. Forty flies of 5 days old were infected with *E. faecalis* 6 hours following heat shock treatment and their survival kinetics was followed over 48 hours. The mutant *Dif*, *Key* is used as a Gram-positive sensitive control. HspGal4 directed expression of *Usp34*, but not of *Usp2* results in fly sensitivity to *E. faecalis* as compared to HspGal4/+ control flies ($p < 0,01$ (**)) Chi-2 test).

Figure 5: USP2 and USP34 prevent constitutive activation of the IMD pathway

Quantitative analysis of *Dipt*, *AttA*, *Drs* and *puc* mRNAs by real-time Quantitative PCR. A. Fat-body directed silencing of *Usp2* and *Usp34* was induced at the adult stage by raising c564Gal4/Gal80ts,UAS-Usp2-IR flies or c564Gal4/Gal80ts,UAS-Usp34-IR flies at 18°C during development and rearing adult for 4 days at 30°C before conducting the experiment. Histograms present the fold induction of each indicated gene mRNAs compared to c564Gal4/+ control flies raised in similar conditions. Significant difference of $p < 0,01$ (**)) compared to c564Gal4/+ control flies (Student's-*t* test).

Figure 6: dUSP2 is an active ubiquitin protease

A. GST-fusion proteins were coexpressed with Ub-β-gal fusion protein for 4 hours at 28°C in transformed *E. coli* XL1 Blue. Substrate cleavage was analysed by western blotting with anti-βgal antibodies. Wild type or mutated catalytic domain of USP2 and wild type catalytic domain USP34{1933-2459} were expressed as GST-fusion proteins and purified from transformed *E. coli* BL21 PlysS. B,C. Purified proteins were incubated with K48- or K63-linked tetra ubiquitin chains. Substrate cleavage was analysed by western blotting with anti-Ub antibodies. A. Proteolysis of Ub-βgal results in a shift to a lower weight band. B. Proteolysis of either K48- or K63-linked tetra ubiquitin chains results in the accumulation of ubiquitin monomers. Mutating the catalytic conserved residue Cys to Ser (C540S) in the dUSP2 sequence (indicated dUSP2C*) prevented ubiquitin hydrolysis (A,B,C).

Figure 7: dUSP2 forms a complex with IMD

A : Drosophila S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding for either PGRP-LC-V5, IMD-V5 or KEY-V5 and dUSP2-Myc. Cells extracts were co-immunoprecipitated with anti-V5 antibodies and analysed by western blot with anti-Myc and

anti-V5 antibodies. Presence of dUSP2-Myc recombinant proteins in the input was assessed by western blot of cell extracts with anti-Myc antibodies. B. S2 cells were transfected with the expression construct encoding IMD-V5 and lysed after 48 h. Cells lysates were precleared and subjected to either immunoprecipitation with an antibody against V5 or to GST pull down assays using GST fusion proteins with either the dUSP2{1-531} N-Terminal part (dUSP2Nter) or the dUSP2{475-856} C-terminal part (dUSP2Cter) or with GST alone (GST). Gel was coloured with Coomassie to visualize GST-fusion proteins in the input (bottom part).

Legends to Supplemental Figures

Figure S1: dUSP2 and dUSP34 are inactivated by dsRNA in S2 cells

A. Quantitative analysis of *Usp36*, *Usp2* and *Usp34* mRNAs by real-time Quantitative PCR in S2 cells incubated 48 hours with double stranded RNA targeting *Usp36*, *Usp2* or *Usp34* (indicated as siUsp36, siUsp34 and siUsp2). Significant difference of $p < 0,01$ (**) compared to HSpGal4/+ control flies (Student's-*t* test).

Figure S2: UCH and UCH-L3 have no effect on IMD pathway

S2 cells were co-transfected with *pAttA-luc* (A,B) or *pDrs-luc* (C,D) reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the IMD and TOLL pathways respectively, in the presence of heat-killed *E. coli* (A) or *pAc-Spz* (C) or in the absence of elicitor (NI in A and C, B, D). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence indicated target genes (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction normalised in *siGFP* treated control cells (100%). Neither *siUch* nor *siUch-L3* had any significant or reproducible effect on *AttA-luc* induction or *Drs-luc* induction in any condition (A, B, C and D).

Figure S3: *Usp2* and *Usp34* gene induction in UAS transgenic flies

Quantitative analysis of *Usp2* and *Usp34* mRNAs by real-time Quantitative PCR at 3, 6, 9 and 12 hours after Heat Shock, in control (HspGal4/+) flies or in flies overexpressing either *dUsp2* (HspGal4/+; UAS-dUsp2) (A) or *dUsp34* (insertion HSGal4/+; EY03971/+) (B). Significant difference of $p < 0,01$ (**) compared to HSpGal4/+ control flies (Student's-*t* test).

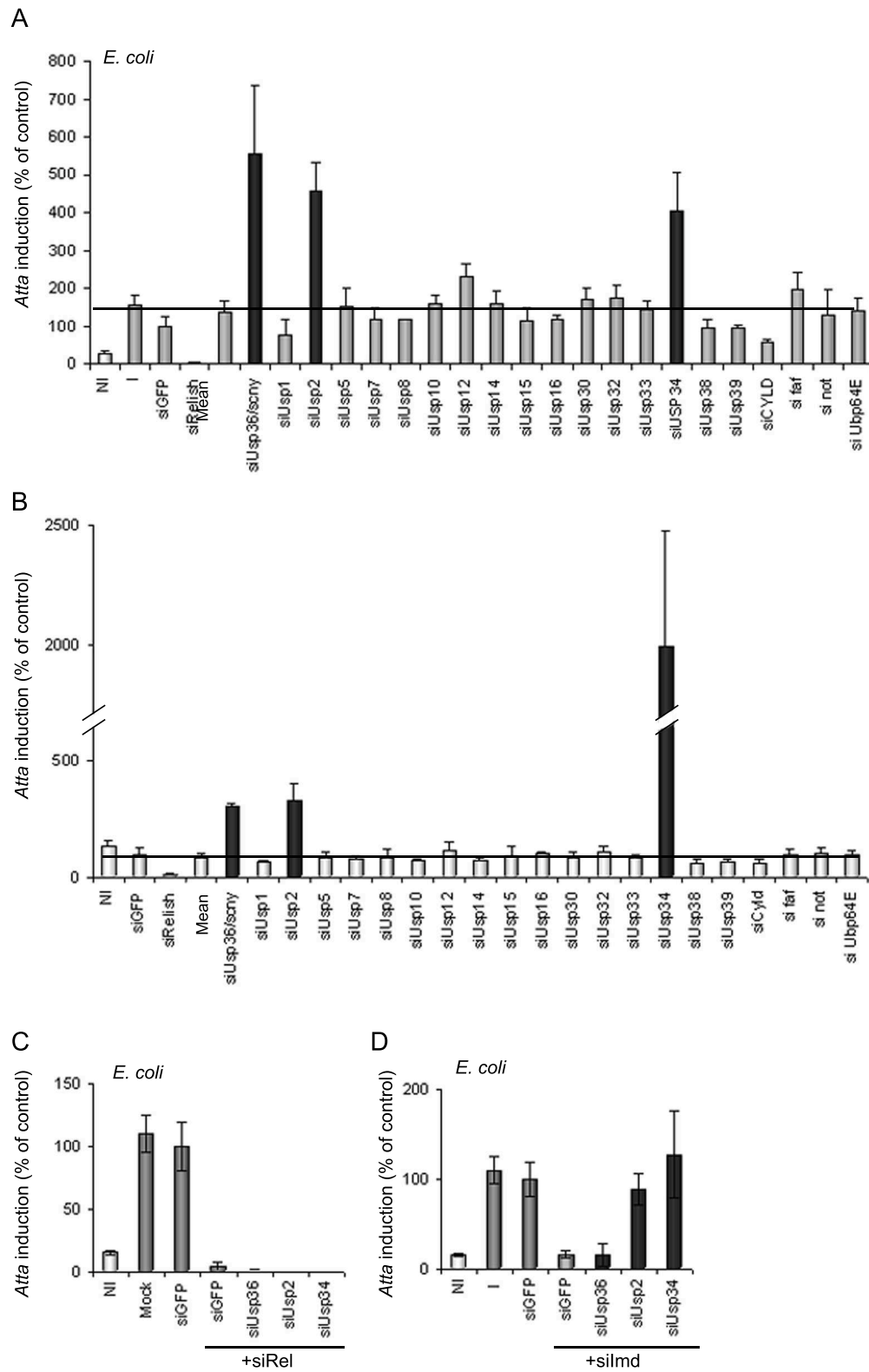


Figure 1 (Engel et al.,)

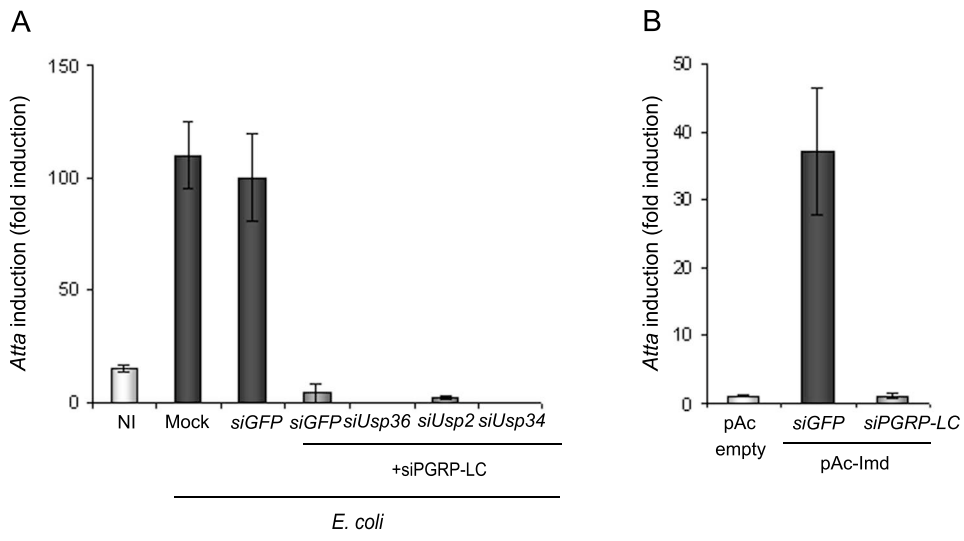


Figure 2 (Engel et al.)

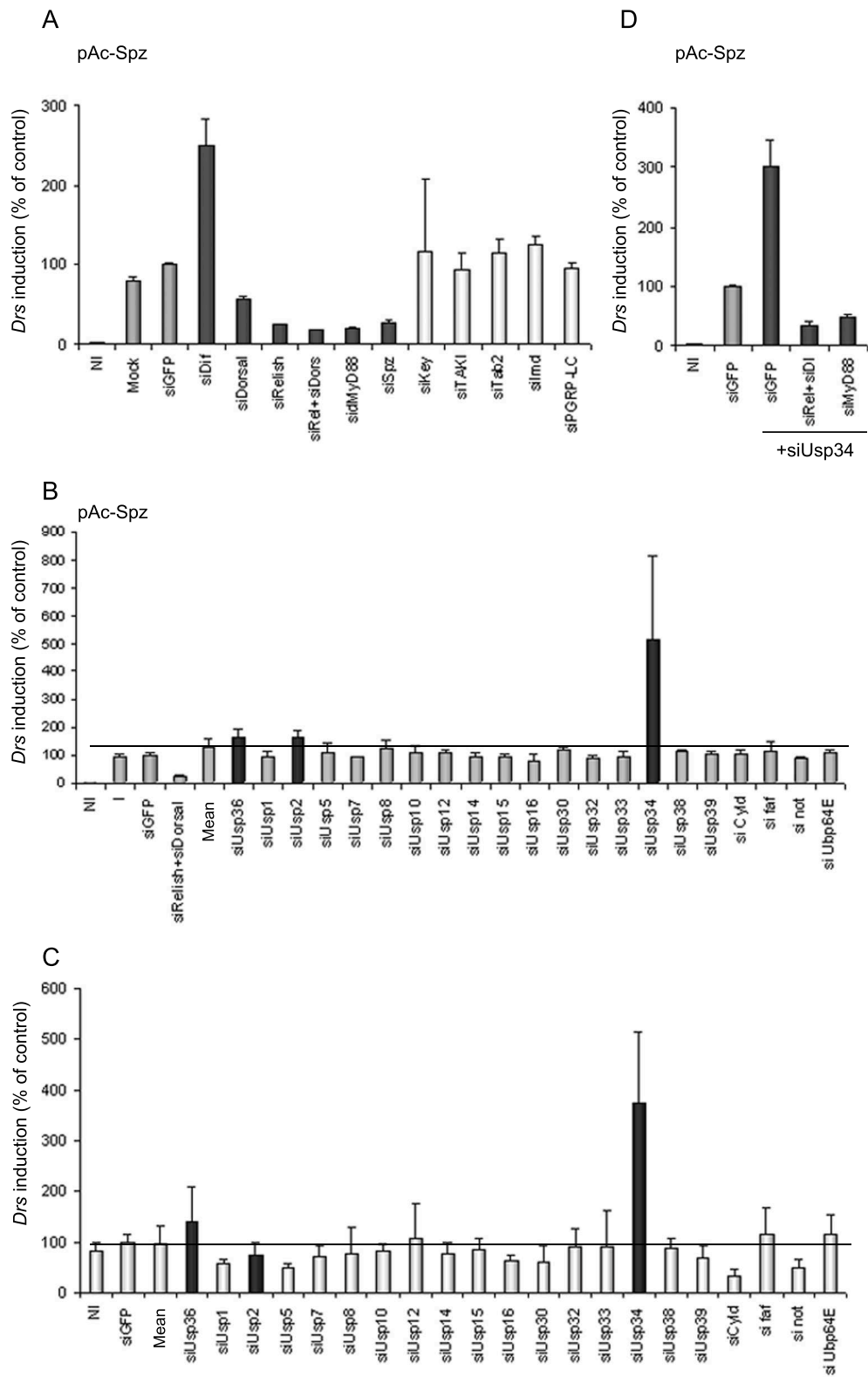


Figure 3 (Engel et al.,)

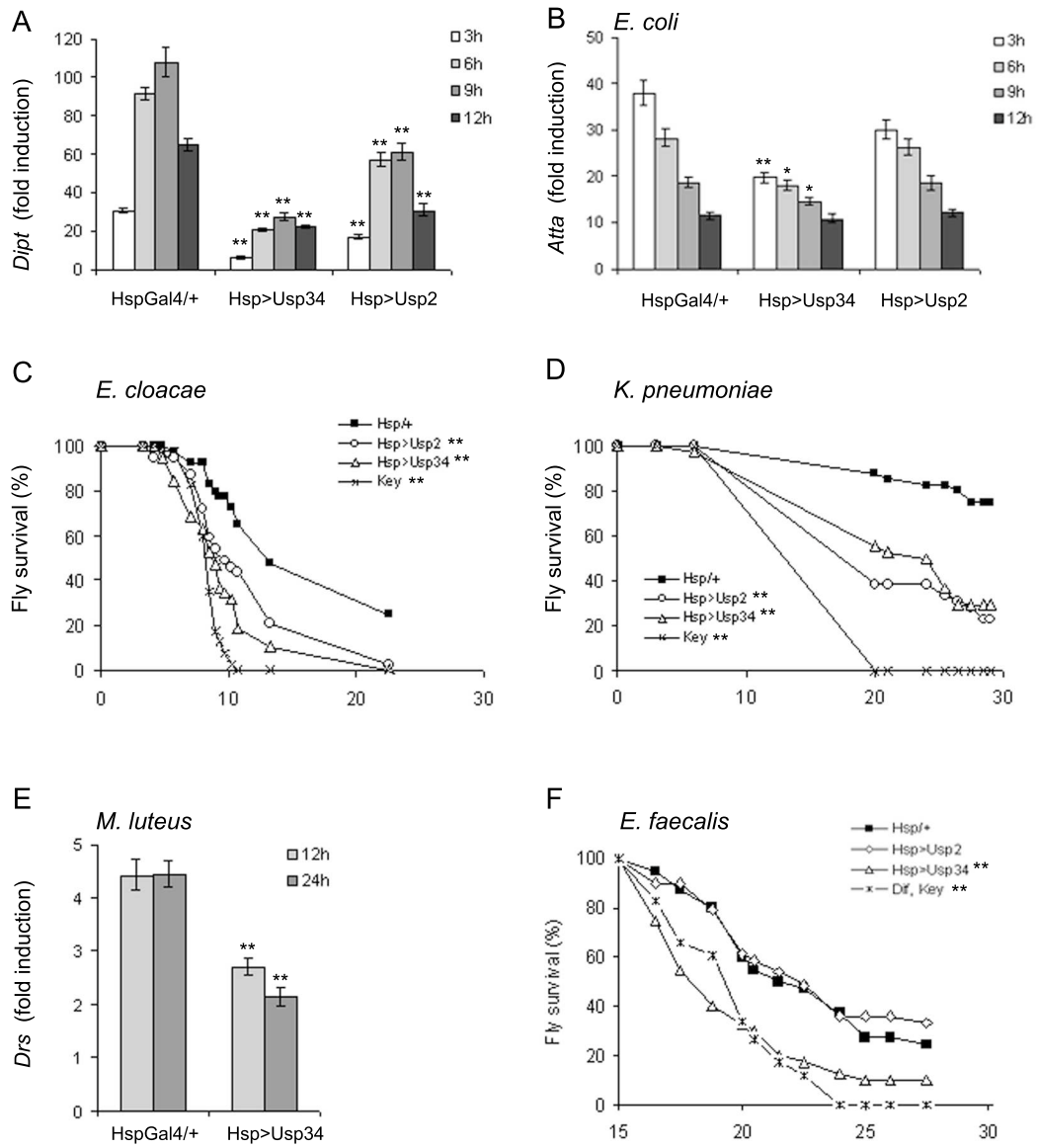


Figure 4 (Engel et al.,)

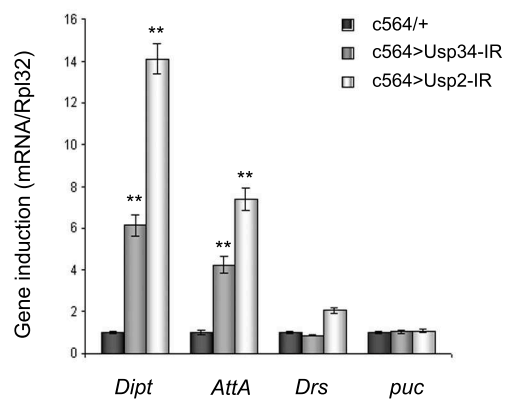


Figure 5 (Engel et al.,)

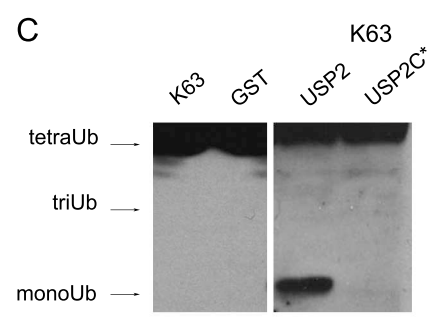
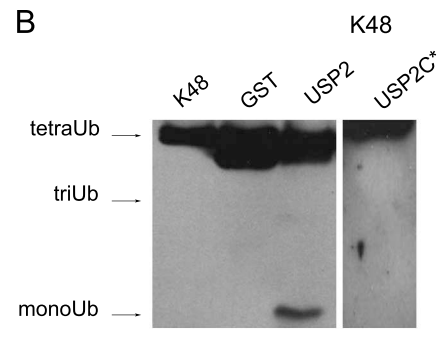
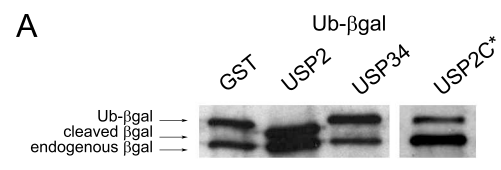


Figure 6 (Engel et al.,)

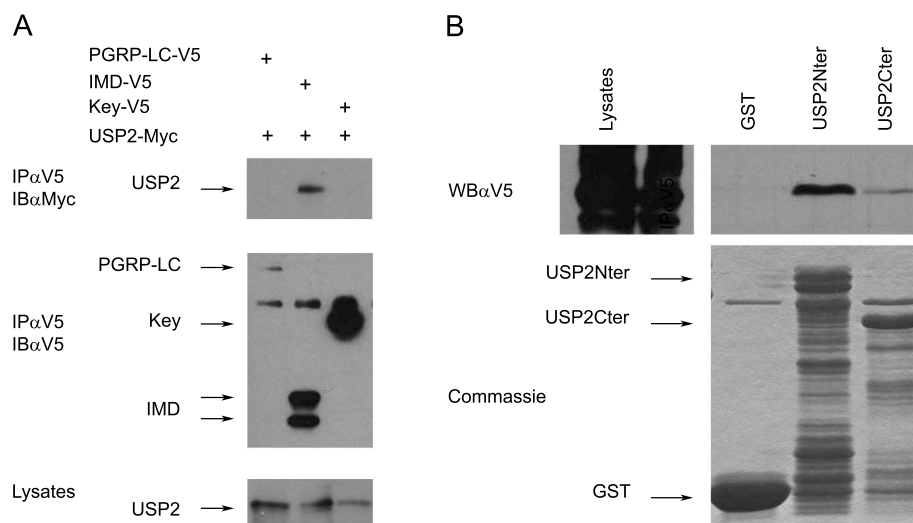
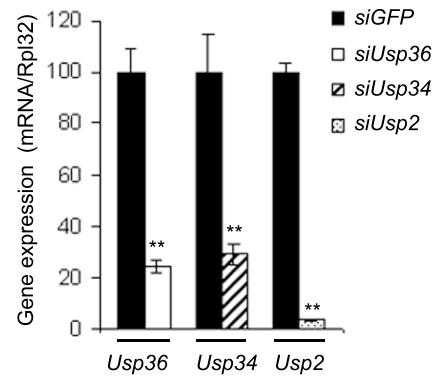
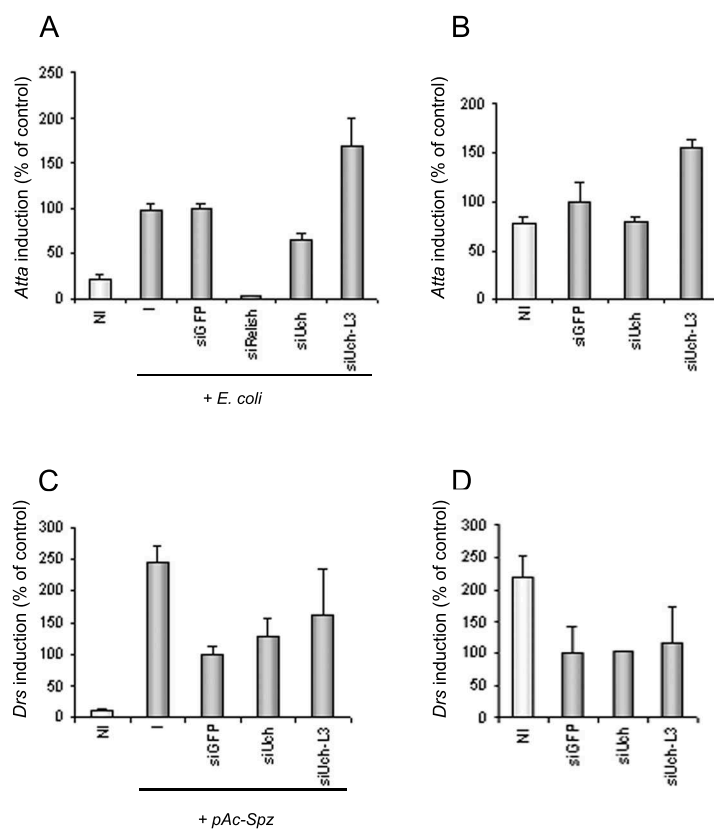


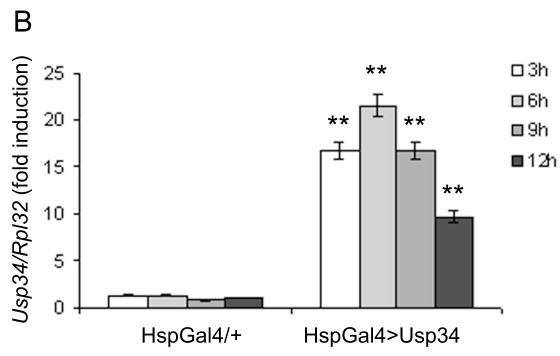
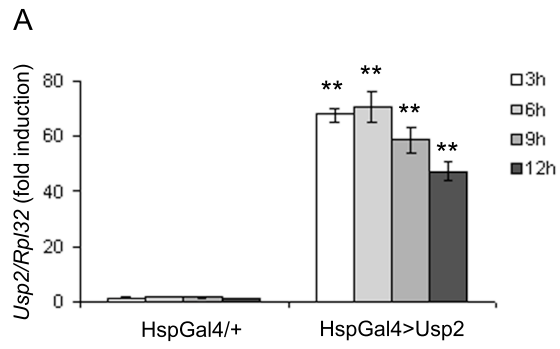
Figure 7 (Engel et al.,)



Supplemental Figure 1 (Engel et al.,)



Supplemental Figure 2 (Engel et al.,)



Supplemental Figure 3 (Engel et al.,)

II.3. Résultats complémentaires

II.3.1. Interaction fonctionnelle entre les USPs et les éléments de la voie Imd

II.3.1.a) Principe de l'expérience

Comme l'analyse de l'expression de gènes par QPCR est coûteuse et que les mouches dans lesquelles on inactive *dUSP36* ou *dUSP2* ne sont pas viables, j'ai tenté d'utiliser un système d'analyse phénotypique pour évaluer l'interaction fonctionnelle des USPs avec certains éléments de la voie Imd. En partant du constat que l'inactivation des USPs dans les ailes de drosophile conduit à un phénotype facilement observable à travers une loupe binoculaire, j'ai construit des lignées MS1096 Gal4 ; *dUSP-IR* permettant l'inactivation de chacune des USPs dans l'aile en développement. L'inactivation de *dUSP36* conduit à un phénotype d'aile courbée (similaire à Cyo) ; les ailes étant parfois très froissées voire atrophiées (figure 22B). L'inactivation de *dUSP2* induit une aile incurvée de façon longitudinale et/ou légèrement courbée (type Cyo) (figure 22C). Enfin, l'inactivation de *dUSP34* donne une aile très légèrement courbée (type Cyo) et présentant des veines surnuméraires en position distale de la veine 5 (figure 22D).

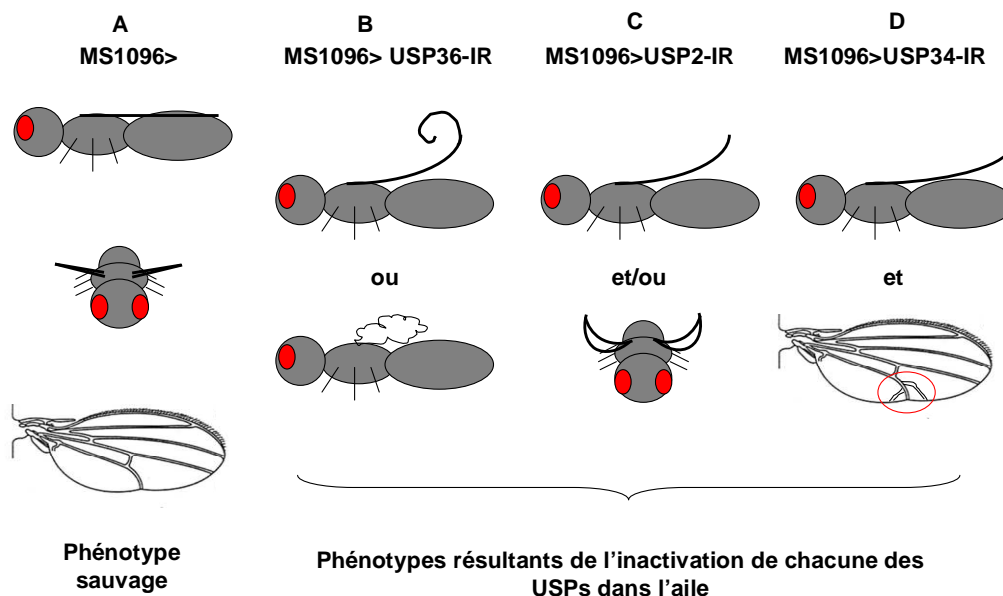


Figure 22. Représentation schématique des différents phénotypes obtenus résultant de l'inactivation des USPs dans l'aile.

J'ai croisé les lignées MS1096-*USP-IR* avec des souches permettant l'inactivation de certains éléments de la voie Imd pour évaluer la contribution de la voie Imd dans ces phénotypes (figure 23). En effet, si la dérégulation de la voie Imd est responsable de la déformation de l'aile, l'inactivation des éléments de cette voie devrait diminuer le phénotype observé. Il est nécessaire de garder à l'esprit que l'inactivation par ARN interférence n'est pas toujours totale et qu'une partie de la protéine correspondante peut être encore présente et participer à un faible niveau à la transduction du signal. Ce constat rend difficile de conclure de façon définitive sur le niveau d'action de l'USP considérée. Les résultats des expériences figurent dans le paragraphe suivant.

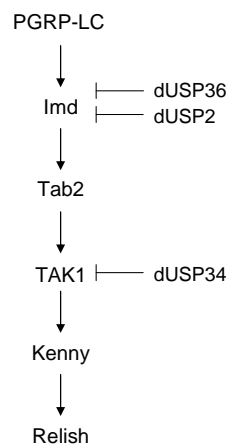


Figure 23. Représentation schématique des différents éléments de la voie Imd testés pour l'épistasie et positionnement spéculatif des USPs.

II.3.1.b) Résultats

MS1096 >	<i>USP2-IR</i> Lignée pWIZ- <i>dUSP2-5M</i>	<i>USP34-IR</i> Lignée VDRC ID27517	<i>USP36-IR</i> Lignée pWIZ- <i>dUSP36</i>
wi10cs	Ailes courbées (Cyo) et fripées	Légère courbure (Cyo) et défauts de veines	Ailes très courbées (Cyo), parfois fripées ou atrophiées
<i>PGRP-LC-IR</i>	∅	sup	sup léger
<i>Imd-IR</i>	sup léger	∅	sup
<i>dTAK1-IR</i>	sup léger	sup	sup
<i>dTAB2-IR*</i>	létal	létal	létal
<i>Kenny-IR</i>	∅	sup	sup
<i>Relish-IR</i>	∅	∅	sup léger

Tableau 1. Résultats d'une première expérience d'interaction génétique. sup = suppresseur ; ∅ = pas d'effet sur le phénotype MS1096>*USP-IR*

* L'inactivation de *dTAB2* dans l'aile est létale

Il apparaît effectivement que dans de nombreux cas les phénotypes sont diminués lorsqu'on éteint un élément de la voie Imd. Comme les modifications de phénotypes obtenues avec *dUSP2-IR* n'étaient pas très marquées, j'ai réitéré l'expérience avec d'autres lignées permettant l'inactivation de *dUSP2*. Les résultats de ces croisements figurent dans le tableau suivant.

MS1096 >	MS1096	<i>USP2-IR</i> Lignée pWIZ- <i>dUSP2-5M</i>	<i>USP2-IR</i> Lignée pWIZ- <i>dUSP2-1M</i>	<i>USP2-IR</i> Lignée VDRC ID37929	<i>USP2-IR</i> Lignée VDRC ID37930	<i>USP34-IR</i> Lignée VDRC ID27517	<i>USP36-IR</i> Lignée pWIZ- <i>dUSP36</i>
<i>wi10cs</i>	Pas de phénotype	Ailes courbées (Cyo) et fripées	Légère courbure (Cyo)	Ailes courbées de façon longitudinale	Ailes courbées de façon longitudinale	Légère courbure (Cyo) et défauts de veines	Ailes très courbées (Cyo), parfois fripées ou atrophiées
<i>Imd-IR</i>	Pas de phénotype	∅	∅	∅	sup léger	∅	sup
<i>dTAK1-IR</i>	Pas de phénotype	∅	∅	sup	∅	sup	sup

Tableau 2. Résultats d'une seconde expérience d'interaction génétique

II.3.1.c) Interprétation

L'effet du RNAi de *dUSP36* est réprimé dans tous les cas par chacun des éléments de la voie Imd. Ceci indique que, d'une part, le phénotype induit par l'inactivation de *dUSP36* résulte, au moins en partie, de la dérégulation de la voie Imd et que d'autre part, *dUSP36* agit en amont de la voie. Sachant qu'*Imd* est la cible de *dUSP36* (voir article Thevenon et al.), on ne s'attendait pas à observer un effet suppresseur du RNAi de *PGRP-LC*. Cependant mes expériences en cellules S2 suggèrent que la formation d'un complexe *PGRP-LC/Imd* est strictement requise à l'activation de la voie (voir article Engel et al., figure 2). En effet, lorsqu'on exprime *Imd* en cellules de drosophile on induit l'activation de la voie, cette activation est abolie si on inhibe l'expression de *PGRP-LC* par ARN interférence. *PGRP-LC* doit donc être présent pour assurer la transduction du signal par *Imd*. Ceci nous a conduits à l'hypothèse suivante : *Imd* ne peut induire la voie que sous forme complexée à *PGRP-LC*.

L'effet de l'inactivation de *dUSP34* est atténué par l'inactivation de *dTAK1* et *PGRP-LC*. Ceci montre que le phénotype dû à l'extinction de *dUSP34* dépend de la voie Imd. Comme l'inactivation d'*Imd* ne sauve pas le phénotype induit par l'inactivation de *dUSP34*, *dUSP34* pourrait agir en aval d'*Imd* et amont de *dTAK1*. Dans ce cas, l'effet suppresseur de l'inactivation de *PGRP-LC* pourrait résulter d'un rôle de *PGRP-LC* en tant que protéine

d'échafaudage dans un complexe incluant, non seulement Imd, mais aussi dTAK1. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester l'effet du RNAi de *PGRP-LC* sur l'induction de la voie obtenue par la surexpression de dTAK1. On cherchera aussi à tester si l'induction de la voie Imd par dTAK1 disparaît en cas d'extinction d'Imd par ARN interférence.

Concernant dUSP2, il est difficile de le situer dans la voie Imd à partir de ces expériences d'interaction génétique *in vivo*. D'une expérience et d'une lignée IR à l'autre, les effets phénotypiques ne sont pas toujours significatifs. Mes expériences de biochimie suggèrent néanmoins qu'Imd est la cible de dUSP2 (voir article Engel et al., figure 7 et ci-dessous).

La recherche du niveau d'activation de dUSP2 et dUSP34 dans la voie Imd se poursuivra par de nouvelles expériences d'interaction génétique *in vivo* portant cette fois sur l'expression de la *Dipt* qui reflète mieux la réponse immunitaire par rapport à un phénotype de développement. Dans ces expériences nous testerons si la dérégulation constitutive de la *Dipt* observée dans les lignées *dUSP2-IR* et *dUSP34-IR* dépend de Imd et/ou de dTAK1 dans des mouches *dUSP-IR ; Imd-IR* et *dUSP-IR ; dTAK1-IR*. En parallèle nous poursuivrons des expériences de biochimie, de Pull-down et de co-immunoprécipitation, afin de rechercher les partenaires et substrats de ces deux USPs. D'ores et déjà, les expériences de co-immunoprécipitation indiquent que dUSP2 interagit avec Imd. Concernant dUSP34, le cDNA de ce gène n'étant pas disponible, il n'a pas été possible de tester ces interactions avec les éléments de la voie Imd. Comme dUSP34 agit également sur la voie Toll, il serait tentant d'imaginer qu'il a un effet sur un élément commun aux voies Toll et Imd. Cependant, un tel élément n'a pas encore été identifié (hormis Relish dont dépendent les voies Toll et Imd en cellules S2 (Tanji et al., 2007 ; Engel et al.)). Certaines expériences suggèrent que dTRAF2 agit sur la voie Toll (Shen et al., 2001) et sur la voie Imd (Cha et al., 2003). Par homologie avec son orthologue humain, TRAF6, dTRAF2 pourrait s'auto-ubiquitiner et participer ainsi à l'activation des facteurs NF- κ B. En déubiquitinant dTRAF2, dUSP34 pourrait réguler négativement les voies Toll et Imd. Cependant, le rôle de dTRAF2 dans les voies Toll et Imd donne lieu à une controverse (Leulier et al., 2006) et ces hypothèses concernant le rôle de dUSP34 sur cette protéine restent encore très spéculatives.

II.3.2. Localisation de dUSP2 en cellules S2

Afin de déterminer la localisation cellulaire de dUSP2, j'ai construit un vecteur permettant l'expression de l'isoforme dUSP2-PA (codée par *dUsp2-RA*, voir annexe 2) en fusion avec un tag myc (dUSP2-myc). J'ai transfecté cette construction en cellules S2 de drosophile et observé au microscope confocal la localisation de dUSP2-PA. Dans ces cellules, dUSP2-PA se distribue de façon ponctuée et homogène, aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (figure 24). La localisation cytoplasmique de dUSP2-PA est en accord avec son rôle dans la voie Imd.

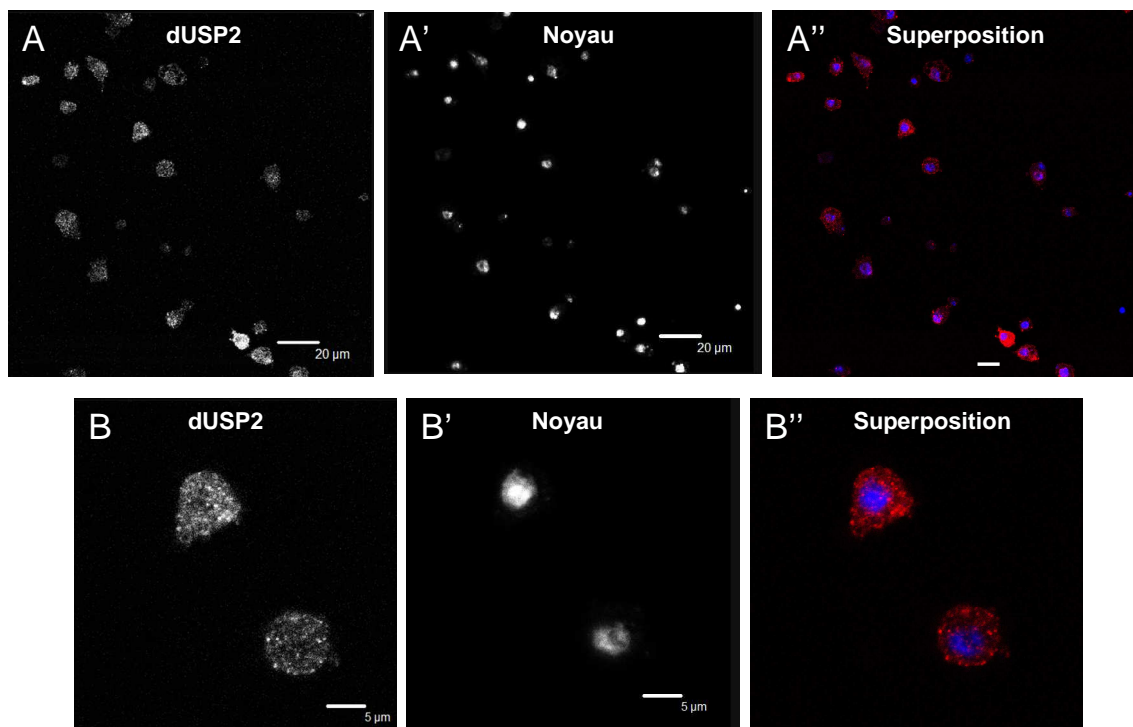


Figure 24. Localisation de dUSP2 en cellules S2 de drosophile. Visualisation de la protéine dUSP2 étiquetée myc (rouge) (A), du noyau (bleu) (A') et superposition des deux marquages (A''). Zoom de deux cellules (B, B' et B''). dUSP2-myc est distribué en petits amas de façon homogène dans la cellule. Les cellules S2 sont cultivées sur lame cc2 (LAB-TEK, Nalge Nunc International) dans du milieu DSM-10% SVF. Les transfections transitoires sont réalisées avec 50ng de pAc-dUSP2-myc, en présence de TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad). 96 heures après la transfection, les cellules sont fixées à température ambiante au paraformaldéhyde 4%, et perméabilisées avec 0,2% Triton X-100. La localisation de dUSP2 est déterminée grâce à un anticorps anti-myc (Cell signaling technology) dilué au 1/500, puis un anticorps secondaire couplé à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) dilué au 1/1000. Marquage de l'ADN (bleu) au Hoescht (1μg/ml). Montage avec du FluorSave (Calbiochem), observation au Microscope confocal (objectif x63). Barres d'échelle : 20 et 5μm.

Dans le but de déterminer plus précisément la localisation de dUSP2, j'envisage de construire une lignée P{UAS-*dUSP2-myc*} qui me permettra d'observer la protéine étiquetée *in vivo* et plus particulièrement dans le corps gras. Par ailleurs, nous allons poursuivre les

études de marquages en cellules S2 à l'aide de nouvelles constructions de chacune des isoformes de dUSP2 en fusion avec des étiquettes « myc » ou « flag ».

Afin de définir si dUSP2-myc colocalise avec Imd, j'ai observé la localisation d'Imd endogène dans les cellules S2 grâce à un anticorps anti Imd. La protéine Imd endogène se localise de façon très homogène dans les cellules et je n'ai pas observé de colocalisation avec dUSP2-myc. Il serait intéressant de tester si la localisation d'Imd est modifiée en cas d'infection, en mettant les cellules en contact avec des bactéries *E. coli* tuées par choc thermique. Il serait également pertinent de tester si, en cas d'infection, Imd colocalise avec dUSP2-myc. Ces co-marquages permettraient de renforcer la caractérisation fonctionnelle de dUSP2 dans la voie Imd.

II.3.3. Inactivation des USPs humaines par siRNA en cellules HeLa

Pour tester la conservation du rôle des USPs en cellule humaine, j'ai inactivé par ARN interférence les orthologues humains de chacune des trois USPs de drosophile en cellules HeLa. Les orthologues ont été déterminés par alignement de séquences sur le site du NCBI (BLAST, NCBI). Les analyses des alignements de séquences indiquent deux homologues humains proches de dUSP36 : hUSP36 et hUSP42. Le plus long isoforme de *dUSP36*, *dUSP36-RD*, code une protéine possédant la plus grande homologie avec *hUSP36*. En effet, en plus du site catalytique caractéristique de la famille des USPs, deux autres domaines conservés présentant 40 et 42% d'identité avec hUSP36 ont été détectés dans les parties N-terminale et C-terminale. Ces domaines ne sont pas présents dans hUSP42 et ne sont similaires à aucun domaine identifié à ce jour. Ces analyses font de hUSP36 le plus proche orthologue de dUSP36. Concernant dUSP2 et dUSP34, ils ont également été nommés comme leur plus proche orthologue humain.

J'ai utilisé des « pools » de quatre siRNAs ciblant les gènes humains correspondant aux trois USPs. Pour hUSP36, j'ai également utilisé un siRNA unique. L'activation de la voie du TNFR a été obtenue par l'ajout de TNF α dans le milieu de culture et a été mesurée par l'intermédiaire d'un plasmide rapporteur *NF- κ B-luciférase* (*NF- κ B-luc*). L'extinction des transcrits correspondants aux gènes ciblés par les ARN interférents a été vérifiée par QPCR (figure 25). Les pools de siRNA permettent une très bonne extinction des gènes ciblés (supérieure à 80%, figure 25A) ; le siRNA ciblant hUSP36 donne lieu à une moins bonne extinction (de l'ordre de 65%, figure 25B).

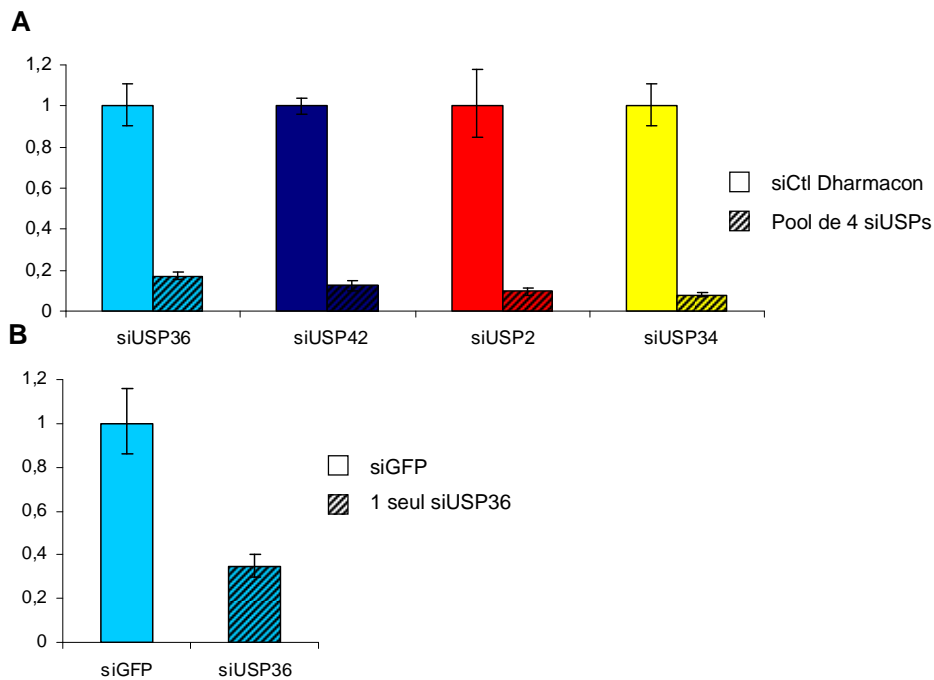


Figure 25. Mesure par QPCR de l'inactivation des hUSPs par ARN interférence en cellules HeLa. Les cellules ont été cultivées en plaques 12 puits en présence de DMEM (Gibco) 10% SVF (1mL de milieu de culture/puits,ensemencées à 10^5 cellules/mL le jour 1). Les jours 2 et 3, les cellules ont été transfectées avec 20nM de siRNA (par pool de 4 siRNA (Dharmacon) ou par simple siRNA (Ambion)) en présence d'oligofectamine (Invitrogen) dans de l'OptiMEM (Gibco). L'ARN des cellules a été extrait en utilisant le kit « Absolutely RNA Miniprep kit » (Statagene) et les cDNAs ont été synthétisés avec le kit « AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit » (Stratagene). Une quantité équivalente à 0.01 μ g de l'ARN total a été soumise à 40 cycles d'amplification par PCR consistant en 10s d'incubation à 95°C et 30s à 60°C. Les mesures des quantités de produits de PCR ont été réalisées à l'aide du réactif SYBR Green et de l'appareil à QPCR Mx3000P (Stratagene). Tous les résultats ont été normalisés par rapport au niveau de l'ARN de hQPRT. Les séquences des primers ont été conçus sur le site PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

L'inactivation de hUSP36 et hUSP42 par les pools de siRNA ainsi que l'inactivation de hUSP36 par le siRNA unique résulte en une sur-activation du rapporteur *NF- κ B-luc* comparé aux cellules contrôles traitées par le pool contrôle de Dharmacon (siCtIDh) ou le siGFP (figure 26). L'inactivation de hUSP2 et hUSP34 n'a pas d'effet significatif sur le niveau de transcription du promoteur *NF- κ B*.

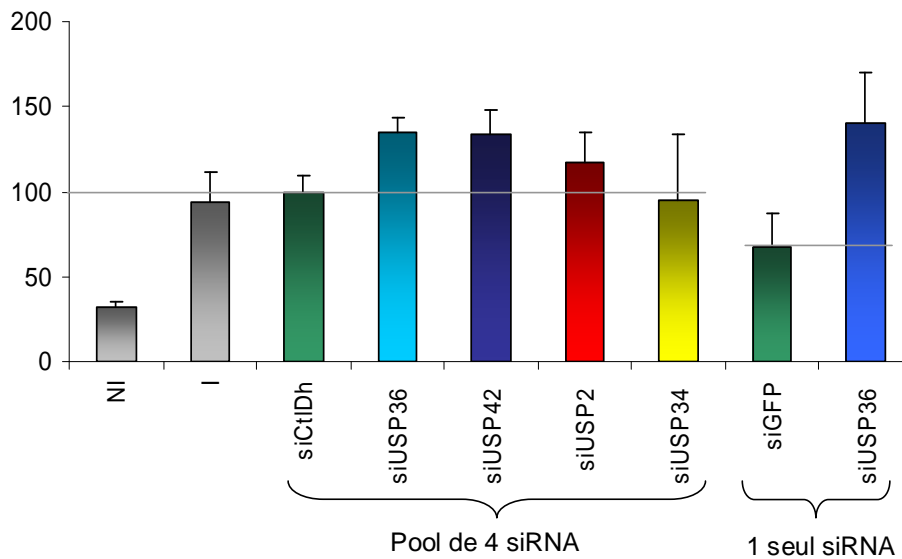


Figure 26. Effet de l'inactivation des USPs humaines sur l'activation de la voie du TNFR en cellules HeLa. Les cellules ont été cultivées en plaques 24 puits en présence de DMEM (Gibco) 10% SVF (500 μ L de milieu de culture/puits,ensemencées à 10⁵ cellules/mL le jour 1). Les expériences ont été réalisées en triplicat. Les jours 2 et 3, les cellules ont été transfectées avec 20nM de siRNA (par pool de 4 siRNA (Dharmacon) ou par simple siRNA (Ambion)) en présence d'oligofectamine (Invitrogen) dans de l'OptiMEM (Gibco). Les plasmides *pNF- κ B-luc* (0,2 μ g/puits ; Stratagene) et *pRL-TK-luc* (10ng/puits, Promega) ont été transfectés le jour 4 en présence de lipofectamine 2000 (Invitrogen), en OptiMEM (Gibco). La voie du TNFR a été activée le jour 5, pendant 6 heures, par du TNF α à 20ng/mL (Sigma). Les cellules ont ensuite été lysées et l'activité des plasmides *luciférase* a été quantifiée au luminomètre après l'ajout des substrats des luciférases (kit Dual reporter assay system de Promega).

Cette expérience indique que hUSP36 et hUSP42 pourraient être impliqués dans la régulation négative de la voie du TNFR. Cependant, en cellules HeLa, l'activation de la voie par le TNF α n'est pas très importante et la dérégulation observée dans les cellules siUSP36 et siUSP42 est faible. Par ailleurs, nous avons testé l'effet de la surexpression de hUSP36 en cellules HeLa. Contrairement à ce qu'on attendait, hUSP36 n'empêche pas l'activation de la voie du TNFR par le TNF α . De même l'expression de hUSP36 ne bloque pas la translocation du facteur de transcription p65 en cas d'activation de la voie du TNFR. D'autres expériences seront donc nécessaires pour déterminer si hUSP36 et hUSP42 ont effectivement un rôle dans la voie du TNFR. Nous envisageons de changer de modèle cellulaire afin de réaliser le même type d'expériences dans des cellules de l'immunité telles que les macrophages ou les lymphocytes ou bien dans des cellules immunocompétentes des lignées épithéliales ou endothéliales qui, parce qu'elles sont régulièrement en contact avec les pathogènes, pourraient mieux répondre au TNF α .

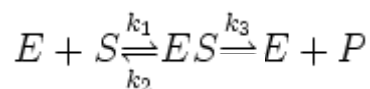
Il se peut aussi que la dérégulation de la voie du TNFR observée en cellules HeLa ne soit pas dû à un effet spécifique des USPs sur la voie du TNFR mais qu'elle résulte du rôle de hUSP36 dans les nucléoles (Endo et al., 2009). En effet, le groupe de Komada a montré que

l'inactivation de hUSP36 en cellules HeLa induit une réduction de la transcription des rRNAs, une diminution du niveau de ribosomes cytoplasmiques et finalement une atténuation de la prolifération cellulaire. Bien que j'utilise un normalisateur dans les expériences de transfection, la diminution du taux de prolifération pourraient augmenter de façon artéfactuelle l'activation de la voie du TNFR. Dans tous les cas, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour répondre à ces questions.

III. Caractérisation de l'activité catalytique de dUSP2 à l'aide de substrats fluorescents

III.1. Principe de l'expérience

On peut modéliser la réaction d'une enzyme E sur son substrat S par les équilibres suivants :



Où E, S, ES et P représentent respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe intermédiaire enzyme substrat et le produit (voir annexe 3).

Chaque enzyme peut être caractérisée par des paramètres chimiques liés à son activité catalytique sur un substrat. Ces paramètres varient en fonction de l'enzyme et du substrat et sont utiles pour quantifier l'activité catalytique d'une enzyme, sa spécificité pour un type de substrat et l'effet d'un inhibiteur sur son activité catalytique. Pour avoir accès à ces paramètres, il faut mesurer la concentration de produit [P] formé au cours de la réaction enzymatique. Dans le cas des protéases, on utilise généralement des substrats dont le clivage donne des produits fluorescents. La réaction enzymatique résulte alors en l'émission d'un signal fluorescent, facilement mesurable, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en produit [P]. On détermine la vitesse initiale v_0 de la réaction à partir de la courbe [P] en fonction du temps. On réitère la mesure de v_0 pour plusieurs concentrations initiales de substrat $[S_0]$ et on obtient plusieurs points $(v_0 ; [S_0])$. A condition de travailler avec une concentration en enzyme [E] très faible par rapport à la concentration en substrat (rapport ~100 entre les concentrations), la loi de vitesse initiale de l'enzyme suit l'équation de Michaelis-Menten (voir annexe 3):

$$v_0 = v_{\max} [S_0] / ([S_0] + K_m) \quad (1)$$

où v_{\max} est la vitesse maximum de la réaction enzymatique lorsque on est à des concentrations saturantes en substrat (en mol L⁻¹ s⁻¹ ou M s⁻¹), $[S_0]$ la concentration initiale en substrat (en mol L⁻¹ ou M) et K_m , la constante de Michaelis (en mol L⁻¹ ou M). La détermination de v_{\max} et K_m s'obtient par régression linéaire si on trace $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$.

En effet, à partir de (1) on obtient : $[S_0]/v_0 = [S_0] / (v_{\max} [S_0] \times (K_m + [S_0]))$

$$[S_0]/v_0 = K_m/v_{\max} + [S_0]/v_{\max} \quad (2)$$

La représentation graphique de $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$ ou représentation de Hanes-Woolf, donne une droite de coefficient directeur $1/v_{\max}$ et d'ordonnée à l'origine K_m/v_{\max} .

La constante catalytique de réaction est définie par :

$$k_{\text{cat}} = v_{\max} / [E_0] \quad (3)$$

où E_0 est la concentration totale en enzyme.

Biologiquement K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à $v_{\max}/2$. $1/K_m$ représente aussi la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat (voir annexe 3).

k_{cat} représente le nombre de molécules de substrats transformés en produit par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme, dans des conditions saturantes.

On définit un troisième paramètre : k_{cat} / K_m qui représente l'efficacité catalytique de l'enzyme.

III.2. Résultats

III.2.1. Détermination expérimentale des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m pour l'Ub-AMC

Afin de caractériser l'activité d'hydrolyse du site catalytique de dUSP2 (dUSP2sc), nous avons purifié la protéine *in vitro* dans des conditions expérimentales adéquates pour réaliser la cinétique enzymatique (voir IV. Matériel et méthodes). Maxim Balakirev, du laboratoire Biopuces du CEA-Grenoble, a utilisé deux types de substrats fluorescents et a mesuré l'activité enzymatique du site catalytique sauvage ou mutant pour la cystéine de cette USP. Le premier substrat est l'Ub-AMC, constitué d'une ubiquitine liée à l'AMC (7-amido-4-méthylcoumarine) par une liaison peptidique, c'est-à-dire Ub¹⁻⁷²-Leu⁷³-Arg⁷⁴-Gly⁷⁵-Gly⁷⁶-AMC. Ce substrat a été mis au point par le groupe de Stein (Dang et al., 1998). Les différentes étapes de la réaction mettant en jeu l'Ub-AMC sont schématisées ci-dessous.



L'AMC fluoresce dès l'hydrolyse de sa liaison avec l'ubiquitine et on peut suivre son apparition par l'augmentation de fluorescence au cours du temps. Plusieurs courbes $[AMC](t)$ pour différentes concentrations en substrats $[S_0]$ (figure 27A,B) ont permis de tracer la droite $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$ (figure 27C) et de déterminer les coefficients K_m , k_{cat} ainsi que k_{cat}/K_m propres à dUSP2sc (tableau 3). On n'observe pas d'augmentation de fluorescence lorsqu'on réalise la réaction enzymatique avec le site catalytique mutant dUSP2sc(C540S) (résultats non montrés). La protéine mutante pour la cystéine n'a donc pas d'activité catalytique sur l'Ub-AMC.

Clivage de l'Ub-AMC par le site catalytique de dUSP2

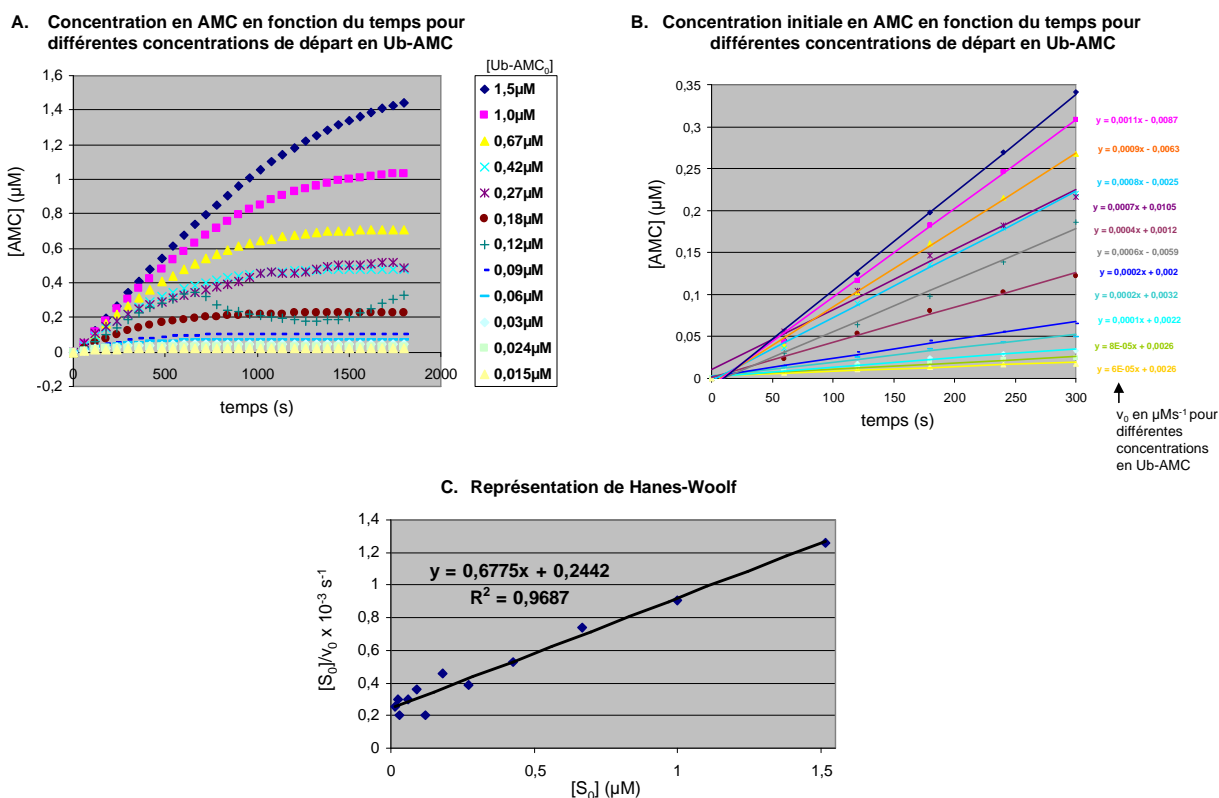


Figure 27. Détermination des paramètres K_m et k_{cat} de l'enzyme dUSP2 pour le substrat Ub-AMC.

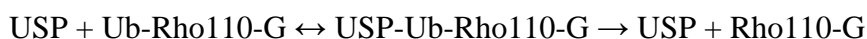
A. Synthèse du produit AMC au cours du temps pour différentes concentrations initiales en substrat Ub-AMC. La concentration en produit $[AMC]$ (μM) est représentée en fonction du temps t (s) pour des concentrations en substrat $[S_0]$ allant de $0,015\mu\text{M}$ à $1,5\mu\text{M}$ (les différentes concentrations en substrat apparaissent sur la droite du graphique en différentes couleurs). B. Représentation de la synthèse du produit $[AMC]$ en fonction du temps en tout début de réaction ($t < 300\text{s}$). Cette représentation donne accès à la vitesse initiale v_0 de la réaction qui est égale à la pente de la droite $[AMC]$ en fonction du temps (pour des temps très courts, $t < 300\text{s}$). Les différentes vitesses initiales correspondant aux différentes concentrations en substrat $[S_0]$ figurent à la droite du graphique ($\mu\text{M s}^{-1}$). C. Représentation de Hanes-Woolf des rapports $[S_0]/v_0$ en fonction des différentes concentrations en substrat $[S_0]$. La concentration en substrat varie de $0,015$ à $1,5\mu\text{M}$. Les paramètres K_m et v_{max} s'obtiennent par régression linéaire à partir de l'équation de la droite représentée et de l'équation (2), k_{cat} s'obtient à partir de l'équation (3). Les mesures ont été réalisées pour une concentration en enzyme $[E_0]$ constante égale à $3,2\text{nM}$.

	dUSP2sc
	Ub-AMC
K_m (nM)	360
v_{max} ($M s^{-1}$)	$1,74 \cdot 10^{-9}$
k_{cat} (s^{-1}) ([dUSP2] = 3,2nM)	0,46
k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	$1,27 \cdot 10^6$

Tableau 3 : Constantes cinétiques de dUSP2 pour le substrat Ub-AMC.

III.2.2. Détermination expérimentale des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m pour l'Ub-Rho110-G

La longueur d'onde d'excitation de l'AMC (340nm) située dans l'ultra-violet excite également des acides aminés aromatiques des protéases et peut conduire à des erreurs dans la mesure du signal. Un décalage vers des longueurs d'onde plus grandes permet d'éviter ce problème. Un tel décalage existe pour le substrat « ubiquitine rhodamine 110-glycine » (Ub-Rho110-G), élaboré par le groupe de Martoglio (Hassiepen et al., 2007). Dans ce substrat, l'ubiquitine est liée par sa partie C-terminale, via une liaison peptidique, à la rhodamine 110-glycine. Alors que l'Ub-Rho110-G n'est pas fluorescent, la rhodamine issue du clivage, Rho110-G, présente une fluorescence très intense quand elle est excitée à 485nm (dans le visible). Les excellentes propriétés optiques de ce nouveau substrat en font un produit particulièrement adapté aux mesures de cinétique et à la recherche d'inhibiteurs. La réaction de catalyse de l'Ub-Rho110-G est représentée ci-dessous.



Avec ce substrat, les coefficients K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m ont été caractérisés pour dUSP2 (figure 28A,B et C et tableau 4).

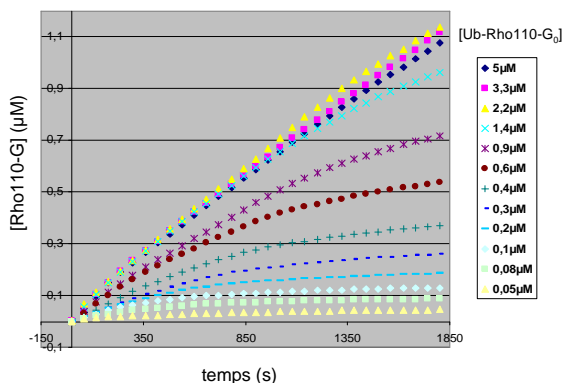
	dUSP2sc
	Ub-Rho110-G
K_m (nM)	527
v_{max} ($M s^{-1}$)	$0,911 \cdot 10^{-9}$
k_{cat} (s^{-1}) ([dUSP2] = 3,2nM)	0,28
k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	$5,31 \cdot 10^5$

Tableau 4. Constantes cinétiques de dUSP2 pour le substrat Ub-Rho110-G.

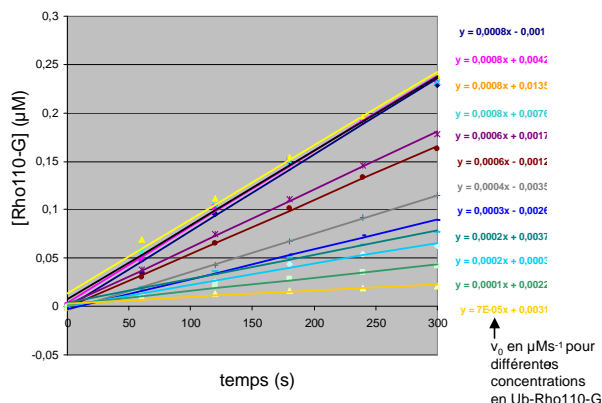
On n'observe pas d'augmentation de fluorescence lorsqu'on réalise la réaction enzymatique avec le site catalytique mutant dUSP2_{sc}(C540S) (résultats non montrés). La protéine mutante pour la cystéine n'a donc pas d'activité catalytique sur l'Ub-Rho110-G.

Clivage de l'Ub-Rho110-G par le site catalytique de dUSP2

A. Concentration en Rho110-G en fonction du temps pour différentes concentrations en Ub-Rho110-G



B. Concentration initiale en Rho110-G en fonction du temps pour différentes concentrations en Ub-Rho110-G



C. Représentation de Hanes-Woolf

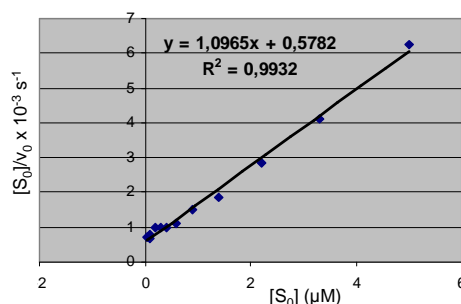


Figure 28. Détermination des paramètres K_m et k_{cat} de l'enzyme dUSP2 pour le substrat Ub-Rho110-G.

A. Synthèse du produit Rho110-G au cours du temps pour différentes concentrations initiales en substrat Ub-Rho110-G. La concentration en produit [Rho110-G] (μM) est représentée en fonction du temps t (s) pour des concentrations en substrat $[S_0]$ allant de $0,05\mu\text{M}$ à $5\mu\text{M}$ (les différentes concentrations en substrat apparaissent sur la droite du graphique en différentes couleurs). B. Représentation de la synthèse du produit [Rho110-G] en fonction du temps en tout début de réaction ($t < 300\text{s}$). Cette représentation donne accès à la vitesse initiale v_0 de la réaction qui est égale à la pente de la droite [Rho110-G] en fonction du temps (pour des temps très courts, $t < 300\text{s}$). Les différentes vitesses initiales correspondant aux différentes concentrations en substrat $[S_0]$ figurent à la droite du graphique ($\mu\text{M s}^{-1}$). C. Représentation de Hanes-Woolf des rapports $[S_0]/v_0$ en fonction des différentes concentrations en substrat $[S_0]$. La concentration en substrat varie de $0,05$ à $5\mu\text{M}$. Les paramètres K_m et v_{max} s'obtiennent par régression linéaire à partir de l'équation de la droite représentée et de l'équation (2), k_{cat} s'obtient à partir de l'équation (3). Les mesures ont été réalisées pour une concentration en enzyme $[E_0]$ constante égale à $3,2\text{nM}$.

III.2.3. Bilan : comparaison des constantes K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m de dUSP2 et hUSP2

L'équipe de Martoglio a déterminé les constantes cinétiques du site catalytique de l'orthologue humain hUSP2 (hUSP2sc) (Hassiepen et al., 2007, tableau 5).

	hUSP2sc		dUSP2sc	
	Ub-AMC	Ub-Rho110-G	Ub-AMC	Ub-Rho110-G
K_m (nM)	554	1500	360	527
k_{cat} (s^{-1})	0,14	0,53	0,46	0,28
k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	$2,6 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$1,27 \cdot 10^6$	$5,31 \cdot 10^5$

Tableau 5. Comparatif des constantes cinétiques de hUSP2sc (d'après Hassiepen et al., 2007) et dUSP2sc pour les substrats Ub-AMC et Ub-Rho110-G.

On retrouve pour dUSP2sc des constantes du même ordre de grandeur que les constantes cinétiques de hUSP2sc. Néanmoins, l'USP de drosophile présente une plus grande affinité pour son substrat, aussi bien pour l'Ub-AMC que l'Ub-Rho110-G car K_m , qui représente la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, est plus faible pour dUSP2 que hUSP2. De plus, le coefficient k_{cat}/K_m , qui caractérise l'efficacité d'hydrolyse de l'enzyme, indique que l'efficacité de dUSP2sc est du même ordre, ou légèrement supérieure, à l'efficacité de hUSP2sc. Ces résultats prouvent la fiabilité du test enzymatique réalisé et montrent la conservation de l'ordre de grandeur des paramètres catalytiques entre les deux orthologues.

III.3. Conclusion et perspectives

L'équipe envisage de réaliser le même type de mesures cinétiques afin de déterminer les constantes catalytiques K_m et k_{cat} de dUSP36 et dUSP34. J'envisage également de produire la protéine dUSP2 entière afin de caractériser, de la même façon, son activité catalytique dans un contexte de protéine entière.

La caractérisation de l'activité enzymatique des USPs de drosophile et ensuite de leurs orthologues humains permettra de comparer l'activité catalytique des enzymes entre elles et à plus long terme, de rechercher des inhibiteurs des protéines humaines. Comme hUSP2 est surexprimée dans les cellules cancéreuses de la prostate, empêchant leur entrée en apoptose

(Graner et al., 2004; Priolo et al., 2006), qu'elle stabilise p53 par l'intermédiaire de son rôle sur Mdm2 (Stevenson et al., 2007) et que hUSP36 est induit dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (Li et al., 2008), trouver des inhibiteurs de ces protéines pourrait, dans le futur, contribuer au développement de nouveaux traitements thérapeutiques contre le cancer.

III.4. Matériel et méthodes

III.4.1. Protocole de préparation des USPs purifiées

J'ai réalisé des constructions comprenant le site catalytique des USPs sauvage ou mutant en fusion avec la GST. Je dispose ainsi des constructions dUSP36{41-457} sauvage ou muté (dUSP36C111S,H369N), dUSP2{475-856} sauvage ou muté (dUSP2C540S), dUSP34{1933-2459} sauvage ou muté (dUSP34C2024S). Ces constructions ont été transformées dans des bactéries *E. coli* BL21 Plys. Leur expression a été induite par de l'IPTG 1mM dans 500mL de culture bactérienne pendant 3h à 25°C. Les bactéries ont été lysées dans du tampon de lyse (150mM NaCl ; 40mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,6% Triton X100 ; EGTA 4mM ; EDTA 4mM ; DTT 2mM, cocktail d'anti-protéases SIGMA et Lysozyme 1mg/mL). Les lysats ont été soniqués, centrifugés 35min à 25000g, le surnageant a été filtré à 0,22µm. Les lysats ont été incubés avec 1mL de billes GST pendant 30min à 4°C de façon à accrocher les protéines fusionnées à la GST. Les protéines ont ensuite été détachées des billes en présence de Glutathione 10mM, pH 7,5 par élution de plusieurs fractions. Les fractions les plus concentrées ont été réunies et dialysées dans un tampon de dialyse (NaCl 150mM ; Tris-HCl pH 7,4 50mM ; DTT 2mM). Les protéines ont été conservées dans du glycérol 20% à -80°C avant leur utilisation dans les tests enzymatiques.

III.4.2. Conditions de la réaction et détermination des paramètres K_m et

k_{cat}

Pour un protocole détaillé de la synthèse des substrats Ub-AMC ou Ub-Rho110-G et des conditions de mesures de fluorescence, nous nous sommes référés, respectivement, au travail de Stein (Dang et al., 1998) et de Martoglio (Hassiepen et al., 2007).

Les réactions enzymatiques sont réalisées dans un tampon de réaction : Tris-HCl pH 7,5 50mM, 1mM EDTA, 5mM dithioerythritol, 100mM NaCl et 0.05% (w/v) CHAPS.

L'enzyme et le substrat sont dilués dans ce tampon et les réactions sont réalisées à température ambiante en plaques 384 puits. Pour l'Ub-Rho110-G l'excitation se fait à 485nm et les mesures de fluorescence à 535nm ; en ce qui concerne l'Ub-AMC, on excite à 340nm et on mesure la fluorescence à 425 nm. On dispose 30µL de réactif par puits : 10µL de tampon de réaction, 10µL d'enzyme auxquels on ajoute, pour initier la réaction, 10µL de substrat. Pour l'Ub-AMC, les K_m et k_{cat} ont été obtenus à partir de mesures effectuées à une concentration constante en enzyme $[E_0]$ égale à 3,2nM et pour plusieurs concentrations initiales en substrat $[S_0]$ allant de 0,015 à 1.5µM. Pour l'Ub-Rho110-G, les K_m et k_{cat} ont été obtenus à partir de mesures effectuées à une concentration constante en enzyme $[E_0]$ égale à 3,2 nM et pour plusieurs concentrations initiales en substrat $[S_0]$ allant de 0,05 à 5µM. Dans ces conditions, la concentration en enzyme est très inférieure à la concentration en substrat, la vitesse initiale de la réaction suit donc l'équation de Michaelis-Menten. Ceci permet à partir de la représentation de Hanes-Woolf de déterminer les paramètres K_m et k_{cat} .

PARTIE C

CONCLUSION

PERSPECTIVES

Conclusion

Chez les mammifères, les voies d'activation des facteurs NF- κ B contrôlent un ensemble de gènes impliqués dans la croissance ou la mort cellulaire ainsi que dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Maintenus à l'état inactif, leur induction dépend de signaux de l'environnement cellulaire comme les infections microbiennes ou les cytokines pro-inflammatoires. La dérégulation de ces voies de signalisation est très souvent associée à des pathologies inflammatoires chroniques et à des cancers. Il est donc essentiel d'identifier les régulateurs de ces voies de signalisation afin de comprendre et de contrer les pathologies dues aux dysfonctionnements de ces voies. De très nombreux intermédiaires des voies NF- κ B sont régulés par l'ajout de monomères ou de polymères d'ubiquitine et ces modifications interviennent autant dans le contrôle de leur activité que de leur stabilité. Ainsi, les protéines du « système ubiquitine », et en particulier les USPs, chargées de l'hydrolyse des chaînes d'ubiquitine, représentent de bons candidats pour rechercher des régulateurs de ces cascades de signalisation. Très importantes pour leur implication dans l'immunité chez les mammifères, les voies d'activation des facteurs NF- κ B sont également présentes chez la drosophile où elles participent efficacement à la réponse immunitaire en régulant la synthèse de peptides antimicrobiens. La drosophile a donc été largement utilisée pour la mise en évidence de nouveaux éléments et mécanismes de régulation des voies NF- κ B.

En plus de cette réponse humorale, la drosophile dispose également d'une réponse immunitaire cellulaire dépendant de la phagocytose des pathogènes par les cellules sanguines (hémocytes). L'équipe a étudié également cette composante de la réponse immunitaire et les travaux d'Evelyne Bergeret, auxquels j'ai contribué, ont donné lieu à une publication qui figure en annexe 4. J'ai choisi de ne pas détailler ces travaux car ma contribution a été essentiellement technique, axée sur l'analyse de l'expression des peptides antimicrobiens par des expériences de PCR quantitative.

Dans le contexte de l'étude des mécanismes cellulaires et humoraux de la réponse immunitaire chez la drosophile, l'objectif principal de ma thèse a été de trouver, parmi les USPs, de nouveaux régulateurs des voies NF- κ B, de tester leur activité catalytique *in vitro* et de caractériser leur fonction *in vivo* chez la drosophile.

J'ai construit une banque d'ARN interférents double brin (dsRNA) ciblant chacune des 21 USPs de drosophile. J'ai criblé cette collection de dsRNA en cellules S2 sur les voies Toll et Imd contrôlant l'activation des facteurs NF- κ B-like de drosophile. Ce crible a mis en évidence trois régulateurs négatifs de la voie Imd dont un se comporte également comme un régulateur négatif de la voie Toll. Parmi ces régulateurs, dUSP36, l'homologue de la protéine humaine USP36, avait été au préalable détecté dans un crible génétique au laboratoire. J'ai participé à la caractérisation de dUSP36 et me suis focalisée sur les deux autres candidats, dUSP2 et dUSP34. Nous avons montré que l'expression de chacune de ces trois USPs réprime l'activation de la voie Imd *in vivo* en cas d'infection, rendant les mouches sensibles aux infections par certaines bactéries à Gram négatif. J'ai montré que l'expression de dUSP34 réprime également la voie Toll en cas d'infection et rend les mouches sensibles aux infections par la bactérie à Gram positif *E. faecalis*. Par ailleurs, l'inactivation de chacune des trois USPs dans le corps gras, principal organe de l'immunité chez la drosophile, induit une activation constitutive de la voie Imd suggérant que ces protéines répriment en permanence l'activation de cette voie de signalisation. Nous avons ensuite entrepris la caractérisation des mécanismes de contrôle de la transduction du signal permettant à chaque USP de réprimer la voie Imd. Concernant dUSP36, l'équipe a montré que cette USP réprime la voie Imd via son activité catalytique, très probablement au niveau d'Imd. L'équipe réalise actuellement des expériences complémentaires destinées à prouver que dUSP36 déubiquitine Imd de façon spécifique l'empêchant ainsi de transmettre l'activation de la voie. En ce qui concerne dUSP2, mes premières expériences de pull-down et de co-immunoprécipitation ont révélé que, comme dUSP36, dUSP2 interagit avec Imd. Le cDNA complet de dUSP34 n'étant pas disponible, les substrats et partenaires de cette USP n'ont, pour l'instant, pas pu être identifiés.

Perspectives

➤ Bilan sur l'activité catalytique des USPs

L'activité catalytique des USPs a été testée *in vitro* sur le clivage d'un substrat Ub- β -galactosidase ainsi que sur l'hydrolyse de tétramères d'ubiquitine (Thevenon et al., en révision ; Engel et al., en préparation). dUSP36 et dUSP2 se sont révélées capables d'hydrolyser les deux types de substrats mais je n'ai détecté aucune activité du site catalytique

de dUSP34. Concernant dUSP2, j'ai obtenu ses paramètres cinétiques, K_m et k_{cat} grâce à une collaboration avec Maxim Balakirev du laboratoire Biopuces du CEA-Grenoble. Par ailleurs, l'équipe envisage de construire une lignée P{UAS-dUsp2(C540S)} afin de déterminer si la régulation négative de la voie Imd par dUSP2 requiert son activité catalytique *in vivo*.

- **Activité catalytique des formes sauvage et mutantes de dUSP36**

L'équipe a construit les vecteurs d'expression de la protéine dUSP36, ou de son site catalytique, qui nous ont servi à déterminer son activité catalytique *in vitro* et à montrer la formation d'un complexe entre Imd et le domaine C-terminal de dUSP36 (Thevenon et al.). De façon prévisible, la mutation de la cystéine catalytique en sérine (dUSP36C111S) inhibe totalement l'activité de l'enzyme mais de façon surprenante, ce n'est pas le cas de la mutation de l'histidine catalytique en asparagine (dUSP36H369N) qui ne provoque qu'une perte partielle de son activité d'hydrolyse : cette forme mutante est inactive sur les tétramères d'ubiquitine K48 et K63 (non montré) mais hydrolyse la liaison Ub- β -galactosidase (figure 29).

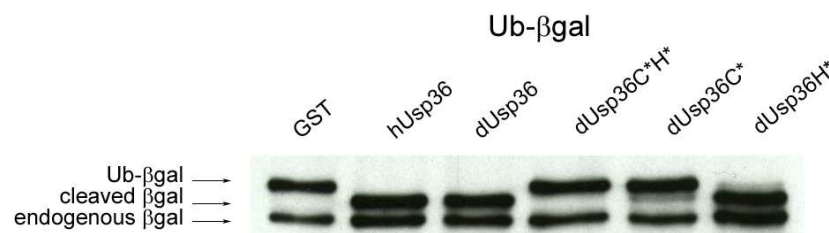


Figure 29 : Activité catalytique des formes sauvage et mutées de dUSP36

Les domaines catalytiques de hUSP36 et de dUSP36 ont été cotransfectés avec un vecteur d'expression d'une protéine de fusion Ub- β -galactosidase. Le clivage de la liaison peptidique est visualisé par le déplacement de la bande du haut vers un plus faible poids moléculaire. Les mutants dUSP36C111SH369N (C*H*) et dUSP36C111S (C*) sont inactifs sur ce substrat tandis que le mutant dUSP36H369N (H*) conserve son activité.

Pour élucider une éventuelle contribution d'une autre histidine en position 366, l'équipe a construit un double mutant dUSP36H366N,H369N par mutagenèse dirigée. Nous envisageons de tester l'activité catalytique de la protéine sauvage ainsi que de ses formes mutées sur le test développé au CEA-Grenoble par Maxim Balakirev (voir partie Résultats III). Cette méthodologie permettra de tester l'activité des différentes formes sauvage et mutées de la protéine dans des conditions optimales d'enzymologie contrôlées comme je l'ai fait pour dUSP2.

- **dUSP34 aurait-elle perdu son activité catalytique ?**

Aucune activité catalytique n'ayant été détectée pour dUSP34, notre première interprétation est que le site catalytique de la protéine, bien que contenant la triade nécessaire à l'activité protéase, ne suffit pas pour réaliser l'hydrolyse des substrats *in vitro*. En effet, dUSP34 est une grande protéine de 430kDa (3912 acides aminés) (voir annexe 2, les constructions GST) et la construction GST utilisée pour tester l'activité enzymatique de dUSP34 contient uniquement son site catalytique en fusion avec la GST. Cette construction comprend ainsi 530 acides aminés de dUSP34, soit 1/8^{ème} de la taille totale de la protéine. Ceci est loin des proportions des sites catalytiques de dUSP2 et dUSP36 qui représentent quasiment la moitié de la protéine. Comme les USPs doivent subir un réarrangement conformationnel afin de réaliser l'hydrolyse de leur substrat, il est possible que le site catalytique seul de dUSP34 ne puisse pas acquérir la conformation adéquate pour devenir catalytiquement actif. Ceci pourrait expliquer l'absence d'activité catalytique de dUSP34 dans mes expériences.

- **Activité catalytique et après?**

La production des protéines purifiées ou de leurs sites catalytiques permettra à plus long terme de réaliser des études structurales de ces trois USPs. Il sera également possible d'envisager le criblage d'inhibiteurs chimiques des homologues humains des candidats présentant une activité catalytique. A cette fin, nous disposons de la technologie SynC@P mise au point au laboratoire Biopuces, qui permet de miniaturiser et d'intégrer sur une puce toutes les étapes de recherche de nouveaux agents thérapeutiques : de la synthèse chimique au criblage et à l'identification des molécules actives *in vitro* suivi de l'analyse de leur efficacité sur des modèles cellulaires en culture (Balakirev et al., 2004, brevet français n° 04 06944).

Etant donnée l'implication de hUSP36 et hUSP2 dans des cancers (Graner et al., 2004; Li et al., 2008; Priolo et al., 2006; Stevenson et al., 2007) et de hUSP2 dans la régulation des voies du TNFR (Haimerl et al., 2009), rechercher des inhibiteurs de ces USPs pourraient contribuer au développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans le domaine de l'inflammation et du cancer.

➤ **Mécanisme d'action de dUSP2 et dUSP36 dans la voie Imd**

• **Deux USPs pour une seule cible ?**

La recherche des substrats de dUSP36 et dUSP2 nous a conduits à l'identification d'un substrat commun : la protéine adaptatrice Imd. D'après la littérature, il n'est pas rare de trouver plusieurs USPs agissant sur une même cible. En effet, RIP1 est probablement déubiquitiné par A20 et Cezanne alors que TRAF2 est ciblé par A20 et CYLD (voir Introduction). Il n'est donc pas surprenant qu'Imd soit régulé par deux USPs. Cependant les résultats des expériences de double RNAi en cellules S2 (voir Engel et al.,) suggèrent que dUSP36 et dUSP2 n'agissent pas exactement de la même façon sur la voie Imd. Alors que l'inactivation par ARN interférence d'Imd empêche la dérégulation de la voie observée en cas d'extinction de dUSP36, l'inactivation d'Imd n'empêche pas la sur-activation due à l'inactivation de dUSP2 et dUSP34. Ces deux dernières USPs agissent donc probablement à la fois au niveau d'Imd puisqu'on ne restaure pas la totalité de la dérégulation, et probablement aussi en aval d'Imd. Il se pourrait donc que contrairement à ce qui est suggéré pour dUSP36, dUSP2 ait deux cibles dans la voie Imd.

Afin de tester l'interaction de dUSP2 avec d'autres éléments de la voie Imd, j'ai entrepris la construction d'un vecteur permettant l'expression de dTAK1 ; il sera également nécessaire de réaliser les constructions permettant l'expression de dTAB2 ou Relish. Par ailleurs les expériences de double RNAi *in vivo* envisagées dans la partie Résultats complémentaires II devraient nous aider à situer l'action de dUSP2 dans la voie Imd.

• **dUSP36 et dUSP2 dans la dynamique du complexe PGRP-LC/Imd**

Il nous faut désormais comprendre le mécanisme d'action de ces deux USPs sur Imd. Nos expériences, réalisées en cellules S2, suggèrent de façon surprenante que PGRP-LC est indispensable à l'activation de la voie Imd induite par l'expression de la protéine adaptatrice Imd (Engel et al.,). Ceci indique qu'Imd a besoin de PGRP-LC pour induire la transduction du signal. On peut alors imaginer que dUSP2 et dUSP36, en déubiquitinant Imd, déstabilisent le complexe activateur Imd/PGRP-LC. Afin de tester cette hypothèse, l'équipe cherchera à déterminer si l'interaction Imd/PGRP-LC est perturbée en cas d'expression des formes sauvages ou mutantes des USPs en cellules S2 ainsi qu'*in vivo*. Nous déterminerons aussi

quels sont les domaines d'Imd impliqués dans l'interaction avec dUSP36 et dUSP2 à partir de constructions tronquées ou mutantes codant Imd. Nous évaluerons également la nécessité de PGRP-LC dans l'interaction USP/Imd en réalisant les co-immunoprécipitations en contexte mutant pour PGRP-LC. Nous testerons si l'ubiquitination ou la déubiquitination de la protéine Imd dépend de façon spécifique de dUSP36 et dUSP2 et si elle influence la formation du complexe activateur PGRP-LC/Imd, et par conséquent l'activation de la voie Imd, en cellules de drosophile. Nous pourrions également rechercher, par des expériences de co-immunoprécipitation ou de pull-down, s'il existe des interactions physiques ou génétiques entre dUSP2 ou dUSP36 avec un inhibiteur de la voie, PIRK, pour lequel trois études indépendantes récentes montrent qu'il agit également au niveau du complexe PGRP-LC/Imd (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008).

➤ **Poursuite de l'étude des orthologues humains**

Bien que l'inactivation des hUSPs par ARN interférence en cellules HeLa n'ait pas donné de résultats concluants quant à la dérégulation de la voie du TNFR, il reste intéressant de poursuivre l'étude des orthologues humains des trois candidats. En effet, la faible induction de la voie du TNFR en cellules HeLa vient très probablement du fait que ces cellules ne sont pas les plus adaptées à l'étude de la réponse immunitaire. Changer de lignées cellulaires pourrait donner de meilleurs résultats. Cette hypothèse est confortée par une étude récente de Haimerl et al., qui démontre que la régulation négative de hUSP2 dans des hépatocytes de souris, contribue à la survie TNF α -dépendante de ces cellules. Cet effet de hUSP2 serait dû au fait que l'inactivation de *hUSP2*, par ARN interférence, induit l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des facteurs NF- κ B dans des cultures primaires d'hépatocytes (Haimerl et al., 2009). Les expériences du groupe de Tiegs suggèrent donc un rôle de hUSP2 dans la voie du TNFR dans les cellules du foie, organe souvent comparé au corps gras des drosophiles. Une telle fonction pourrait donc témoigner de la conservation du rôle d'USP2 à travers l'Evolution.

➤ **Réutilisation de la banque de dsRNA sur d'autres voies de signalisation**

Il est de plus en plus manifeste d'après la littérature que la plupart, sinon tous, des processus cellulaires fondamentaux sont régulés par le biais de l'ubiquitination de protéines

clés (Haglund and Dikic, 2005; Hoeller et al., 2006). Qui plus est, les ubiquitine ligases et protéases qui ont été étudiées sont toutes impliquées dans différents types de pathologies humaines associées à l'oncogenèse ou la dégénérescence neuronale (Nijman et al., 2005; Singhal et al., 2008). Approfondir les connaissances sur les enzymes d'ubiquitination ou de déubiquitination constitue donc un réel défi pour une meilleure compréhension du fonctionnement physiologique et des dysfonctionnements pathologiques liés à l'ubiquitination des protéines, et l'identification de cibles biologiques dans de futurs traitements thérapeutiques.

Le crible des USPs effectué au cours de ma thèse sur les voies Toll et Imd a montré la faisabilité et la spécificité de ce type de crible et motive l'équipe pour la caractérisation d'autres USPs dans de nouvelles voies de signalisation gouvernant la réponse au stress, la croissance ou la survie cellulaire.

➤ **Conclusion générale**

Plusieurs données de la littérature désignent les USPs comme de nouvelles cibles potentielles en cancérologie (Yang et al., 2009). L'utilisation de la mouche drosophile autorise des découvertes prospectives sur la fonction de ces protéines en préalable à des études fonctionnelles plus difficiles à mettre en œuvre chez des organismes mammifères. Nos résultats ainsi que ceux de la littérature suggèrent que la fonction des USPs se conserve à travers l'Évolution. En particulier, la fonction d'USP2 dans la voie du TNFR pourrait être conservée entre la drosophile et l'Homme (Engel et al., ; Haimerl et al., 2009). De plus, les paramètres catalytiques de hUSP2 et dUSP2 mesurés *in vitro* sont très semblables suggérant une conservation en terme quantitatif de leur activité catalytique. Par ailleurs, hUSP2 et hUSP36 sont surexprimées de façon significative dans des cellules de plusieurs cancers (Graner et al., 2004; Li et al., 2008; Priolo et al., 2006). Il est donc possible que les trois USPs étudiées au cours de ma thèse définissent une classe de régulateurs des voies NF- κ B non seulement chez la drosophile, mais aussi chez l'Homme et représentent des cibles biologiques pour la recherche de molécules thérapeutiques capables de contrer des cancers ou des maladies inflammatoires chroniques.

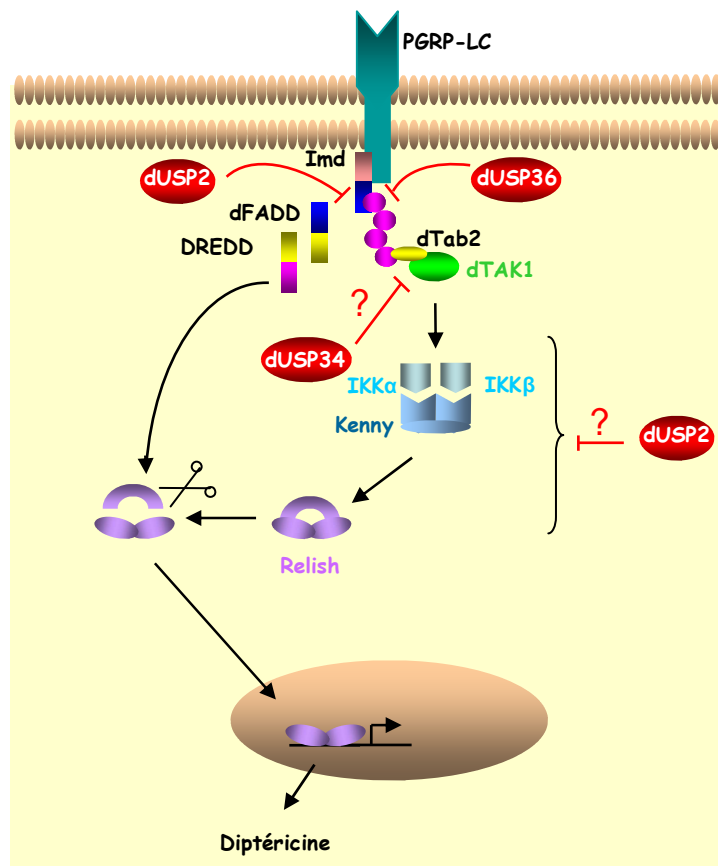


Figure 29. Représentation simplifiée des fonctions hypothétiques des USPs au sein de la voie Imd.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adhikari, A., Xu, M. and Chen, Z.J. (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, **26**, 3214-3226.
- Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Erturk-Hasdemir, D., Paquette, N. and Silverman, N. (2008) Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS Pathog*, **4**, e1000120.
- Alwan, H.A. and van Leeuwen, J.E. (2007) UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J Biol Chem*, **282**, 1658-1669.
- Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
- Baker, R.T., Smith, S.A., Marano, R., McKee, J. and Board, P.G. (1994) Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase. *J Biol Chem*, **269**, 25381-25386.
- Balakirev, M.Y. and Wilkinson, K.D. (2008) OTU takes the chains OUT. *Nat Chem Biol*, **4**, 227-228.
- Baud, V., Liu, Z.G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y. and Karin, M. (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*, **13**, 1297-1308.
- Bazan, J.F. and Fletterick, R.J. (1988) Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7872-7876.
- Belvin, M.P. and Anderson, K.V. (1996) A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 393-416.
- Bignell, G.R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P.J., Lakhani, S.R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D.G., Schrandt-Stumpel, C., Beemer, F.A., van Den Ouweland, A., Halley, D., Delpech, B., Cleveland, M.G., Leigh, I., Leisti, J. and Rasmussen, S. (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*, **25**, 160-165.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I.G., Michel, T., Hoffmann, J.A. and Royet, J. (2004) Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol*, **5**, 1175-1180.
- Blevins, R.A. and Tulinsky, A. (1985) The refinement and the structure of the dimer of alpha-chymotrypsin at 1.67-Å resolution. *J Biol Chem*, **260**, 4264-4275.
- Bocca, S.N., Muzzopappa, M., Silberstein, S. and Wappner, P. (2001) Occurrence of a putative SCF ubiquitin ligase complex in Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 357-364.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A.I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 574-585.
- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., McNally, E., Pickart, C. and Ma, A. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, **5**, 1052-1060.
- Bour, S., Perrin, C., Akari, H. and Strebel, K. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *J Biol Chem*, **276**, 15920-15928.

- Boutros, M., Agaisse, H. and Perrimon, N. (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell*, **3**, 711-722.
- Bowen, S., Gill, M., Lee, D.A., Fisher, G., Geronemus, R.G., Vazquez, M.E. and Celebi, J.T. (2005) Mutations in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Dermatol*, **124**, 919-920.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Bray, S., Musisi, H. and Bienz, M. (2005) Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell*, **8**, 279-286.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M. and Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, **424**, 797-801.
- Brzovic, P.S., Keeffe, J.R., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., 3rd, Fukuda, M., Ohta, T. and Klevit, R. (2003) Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5646-5651.
- Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C. and Klevit, R.E. (2001) Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol*, **8**, 833-837.
- Burnett, B., Li, F. and Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, **12**, 3195-3205.
- Burrows, N.P., Jones, R.R. and Smith, N.P. (1992) The clinicopathological features of familial cylindromas and trichoepitheliomas (Brooke-Spiegler syndrome): a report of two families. *Clin Exp Dermatol*, **17**, 332-336.
- Buszczak, M., Paterno, S. and Spradling, A.C. (2009) *Drosophila* stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease scrawny. *Science*, **323**, 248-251.
- Carmine Belin, A., Westerlund, M., Bergman, O., Nissbrandt, H., Lind, C., Sydow, O. and Galter, D. (2007) S18Y in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) associated with decreased risk of Parkinson's disease in Sweden. *Parkinsonism Relat Disord*, **13**, 295-298.
- Cha, G.H., Cho, K.S., Lee, J.H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S.B. and Chung, J. (2003) Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol*, **23**, 7982-7991.
- Chastagner, P., Israel, A. and Brou, C. (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, **7**, 1147-1153.
- Chauhan, D., Bianchi, G. and Anderson, K.C. (2008) Targeting the UPS as therapy in multiple myeloma. *BMC Biochem*, **9 Suppl 1**, S1.
- Chauhan, D., Hideshima, T. and Anderson, K.C. (2005) Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **45**, 465-476.
- Chen, G. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **9**, 1586-1597.
- Chen, Z.J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.
- Chiu, H., Ring, B.C., Sorrentino, R.P., Kalamariz, M., Garza, D. and Govind, S. (2005) dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev Biol*, **288**, 60-72.

- Choe, K.M., Lee, H. and Anderson, K.V. (2005) Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1122-1126.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H. and Wu, H. (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*, **115**, 679-688.
- Ciechanover, A., Gonen, H., Bercovich, B., Cohen, S., Fajerman, I., Israel, A., Mercurio, F., Kahana, C., Schwartz, A.L., Iwai, K. and Orian, A. (2001) Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. *Biochimie*, **83**, 341-349.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A. and Dixon, J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6499-6503.
- Cohen, M., Stutz, F. and Dargemont, C. (2003) Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport. *J Biol Chem*, **278**, 51989-51992.
- Conner, S.H., Kular, G., Peggie, M., Shepherd, S., Schuttelkopf, A.W., Cohen, P. and Van Aalten, D.M. (2006) TAK1-binding protein 1 is a pseudophosphatase. *Biochem J*, **399**, 427-434.
- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science*, **298**, 608-611.
- Courtois, G. and Gilmore, T.D. (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, **25**, 6831-6843.
- Coutts, A.S., Adams, C.J. and La Thangue, N.B. (2009) p53 ubiquitination by Mdm2: A never ending tail? *DNA Repair (Amst)*.
- Covi, J.A., Belote, J.M. and Mykles, D.L. (1999) Subunit compositions and catalytic properties of proteasomes from developmental temperature-sensitive mutants of Drosophila melanogaster. *Arch Biochem Biophys*, **368**, 85-97.
- Cummins, J.M., Rago, C., Kohli, M., Kinzler, K.W., Lengauer, C. and Vogelstein, B. (2004) Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature*, **428**, 1 p following 486.
- Dang, L.C., Melandri, F.D. and Stein, R.L. (1998) Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes. *Biochemistry*, **37**, 1868-1879.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M. and Lemaitre, B. (2001) Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12590-12595.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M. and Lemaitre, B. (2002) The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila. *EMBO J*, **21**, 2568-2579.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J. (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. and Wu, X. (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*, **115**, 61-70.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G. and Chen, Z.J. (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*, **22**, 245-257.

- Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N. and Komada, M. (2009) Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J Cell Sci*, **122**, 678-686.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong le, A., Rawlinson, L., Mason, J.C., Haskard, D.O., Dean, J.L. and Evans, P.C. (2008) NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J Biol Chem*, **283**, 7036-7045.
- Engels, W.R. (1992) The origin of P elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, **14**, 681-686.
- Evans, P.C., Taylor, E.R., Coadwell, J., Heyninck, K., Beyaert, R. and Kilshaw, P.J. (2001) Isolation and characterization of two novel A20-like proteins. *Biochem J*, **357**, 617-623.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C. and Hoffmann, J.A. (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol*, **7**, 862-874.
- Finley, D., Ciechanover, A. and Varshavsky, A. (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, **37**, 43-55.
- Foley, E. and O'Farrell, P.H. (2004) Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. *PLoS Biol*, **2**, E203.
- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R. and Fuchs, R.P. (2005) Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*, **18**, 499-505.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (2001) *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell*, **1**, 503-514.
- Gesellchen, V., Kutenkeuler, D., Steckel, M., Pelte, N. and Boutros, M. (2005) An RNA interference screen identifies Inhibitor of Apoptosis Protein 2 as a regulator of innate immune signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep*, **6**, 979-984.
- Gibson, G.E. and Huang, H.M. (2005) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **26**, 575-578.
- Goldenberg, S.J., McDermott, J.L., Butt, T.R., Mattern, M.R. and Nicholson, B. (2008) Strategies for the identification of novel inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Biochem Soc Trans*, **36**, 828-832.
- Golic, K.G. and Lindquist, S. (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, **59**, 499-509.
- Gong, B. and Leznik, E. (2007) The role of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in neurodegenerative disorders. *Drug News Perspect*, **20**, 365-370.
- Goodrich, J.S., Clouse, K.N. and Schupbach, T. (2004) Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in *Drosophila* oogenesis. *Development*, **131**, 1949-1958.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D. and Royet, J. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, **416**, 640-644.
- Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L.J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. and Loda, M. (2004) The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, **5**, 253-261.
- Grossman, S.R. (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem*, **268**, 2773-2778.

- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**, 342-344.
- Guardavaccaro, D., Kudo, Y., Boulaire, J., Barchi, M., Busino, L., Donzelli, M., Margottin-Goguet, F., Jackson, P.K., Yamasaki, L. and Pagano, M. (2003) Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell*, **4**, 799-812.
- Haglund, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*, **24**, 3353-3359.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*, **5**, 461-466.
- Haimerl, F., Erhardt, A., Sass, G. and Tiegs, G. (2009) Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte survival. *J Biol Chem*, **284**, 495-504.
- Hannah, J. and Zhou, P. (2009) Regulation of DNA damage response pathways by the cullin-RING ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)*.
- Haracska, L., Torres-Ramos, C.A., Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (2004) Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **24**, 4267-4274.
- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S. and Malim, M.H. (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, **113**, 803-809.
- Hassiepen, U., Eidhoff, U., Meder, G., Bulber, J.F., Hein, A., Bodendorf, U., Lorthiois, E. and Martoglio, B. (2007) A sensitive fluorescence intensity assay for deubiquitinating proteases using ubiquitin-rhodamine110-glycine as substrate. *Anal Biochem*, **371**, 201-207.
- Hay, R.T., Vuillard, L., Desterro, J.M. and Rodriguez, M.S. (1999) Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1601-1609.
- Hedengren-Olcott, M., Olcott, M.C., Mooney, D.T., Ekengren, S., Geller, B.L. and Taylor, B.J. (2004) Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem*, **279**, 21121-21127.
- Hernandez-Verdun, D. (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol*, **125**, 127-137.
- Herrmann, J., Lerman, L.O. and Lerman, A. (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*, **100**, 1276-1291.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hershko, A. and Rose, I.A. (1987) Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1829-1833.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.
- Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanetz, K., Breitling, R., Mann, M., Stenmark, H. and Dikic, I. (2006) Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol*, **8**, 163-169.

- Hoeller, D., Hecker, C.M., Wagner, S., Rogov, V., Dotsch, V. and Dikic, I. (2007) E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell*, **26**, 891-898.
- Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, **420**, 25-27.
- Hoppe, T. (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, **30**, 183-187.
- Horton, R.A., Strachan, E.A., Vogel, K.W. and Riddle, S.M. (2007) A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Anal Biochem*, **360**, 138-143.
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.W., Gu, W., Cohen, R.E. and Shi, Y. (2002) Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, **111**, 1041-1054.
- Hu, S. and Yang, X. (2000) dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD. *J Biol Chem*, **275**, 30761-30764.
- Hu, X., Yee, E., Harlan, J.M., Wong, F. and Karsan, A. (1998) Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood*, **92**, 2759-2765.
- Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, **399**, 361-372.
- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C. and Madhani, H.D. (2003) A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell*, **11**, 261-266.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. and Hetru, C. (2001) A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15119-15124.
- Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K. and Kominami, E. (2006) Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem*, **281**, 4035-4041.
- Jackson, P. and Thompson, R.J. (1981) The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol Sci*, **49**, 429-438.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.
- Jiang, J. and Struhl, G. (1998) Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, **391**, 493-496.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, **143**, 1883-1898.
- Johnston, S.C., Larsen, C.N., Cook, W.J., Wilkinson, K.D. and Hill, C.P. (1997) Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J*, **16**, 3787-3796.
- Jono, H., Lim, J.H., Chen, L.F., Xu, H., Trompouki, E., Pan, Z.K., Mosialos, G. and Li, J.D. (2004) NF- κ B is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF- κ B: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J Biol Chem*, **279**, 36171-36174.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L. and Chen, Z.J. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, **15**, 535-548.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.

- Kattenhorn, L.M., Korbel, G.A., Kessler, B.M., Spooner, E. and Ploegh, H.L. (2005) A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae. *Mol Cell*, **19**, 547-557.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. and Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I. and et al. (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, **8**, 221-228.
- Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., Zhang, Z., Arnott, D. and Dixit, V.M. (2007) DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, **318**, 1628-1632.
- Kee, Y., Lyon, N. and Huibregtse, J.M. (2005) The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J*, **24**, 2414-2424.
- Khush, R.S., Cornwell, W.D., Uram, J.N. and Lemaitre, B. (2002) A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol*, **12**, 1728-1737.
- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W.B., Kim, J., Song, Y.H., Kim, S.N., Yoon, J.H., Kim-Ha, J. and Kim, Y.J. (2005a) Downregulation of lipopolysaccharide response in Drosophila by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol*, **6**, 211-218.
- Kim, M.S., Kim, Y.K., Kim, Y.S., Seong, M., Choi, J.K. and Baek, K.H. (2005b) Deubiquitinating enzyme USP36 contains the PEST motif and is polyubiquitinated. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**, 797-804.
- Kitagaki, J., Agama, K.K., Pommier, Y., Yang, Y. and Weissman, A.M. (2008) Targeting tumor cells expressing p53 with a water-soluble inhibitor of Hdm2. *Mol Cancer Ther*, **7**, 2445-2454.
- Kleino, A., Myllymaki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S. and Ramet, M. (2008) Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. *J Immunol*, **180**, 5413-5422.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K. and Uchiyama, T. (2005) Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem*, **280**, 18573-18578.
- Komander, D., Lord, C.J., Scheel, H., Swift, S., Hofmann, K., Ashworth, A. and Barford, D. (2008) The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol Cell*, **29**, 451-464.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. and Courtois, G. (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, **424**, 801-805.
- Krikos, A., Laherty, C.D. and Dixit, V.M. (1992) Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem*, **267**, 17971-17976.
- Kume, S., Haneda, M., Kanasaki, K., Sugimoto, T., Araki, S., Isshiki, K., Isono, M., Uzu, T., Guarente, L., Kashiwagi, A. and Koya, D. (2007) SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem*, **282**, 151-158.
- Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N. and Cohen, R.E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, **385**, 737-740.

- Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H. and Darnay, B.G. (2007) Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem*, **282**, 4102-4112.
- Lau, G.W., Goumnerov, B.C., Walendziewicz, C.L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., Tompkins, R.G., Perkins, L.A. and Rahme, L.G. (2003) The *Drosophila melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **71**, 4059-4066.
- Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P. and Ma, A. (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*, **289**, 2350-2354.
- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C. and Choi, Y. (1997) TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, **7**, 703-713.
- Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N. and Kelliher, M.A. (2004) The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J Biol Chem*, **279**, 33185-33191.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, **25**, 697-743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1995a) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1995b) Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*, **14**, 536-545.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B. and Meier, P. (2006) The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Mol Cell Biol*, **26**, 7821-7831.
- Leulier, F., Marchal, C., Miletich, I., Limbourg-Bouchon, B., Benarous, R. and Lemaitre, B. (2003) Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses. *EMBO Rep*, **4**, 976-981.
- Lhocine, N., Ribeiro, P.S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Lemaitre, B., Gstaiger, M., Meier, P. and Leulier, F. (2008) PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe*, **4**, 147-158.
- Li, J., Olson, L.M., Zhang, Z., Li, L., Bidder, M., Nguyen, L., Pfeifer, J. and Rader, J.S. (2008) Differential display identifies overexpression of the USP36 gene, encoding a deubiquitinating enzyme, in ovarian cancer. *Int J Med Sci*, **5**, 133-142.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. and Gu, W. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **416**, 648-653.
- Li, Q. and Verma, I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**, 725-734.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E.M. and Wu, G. (2005) VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep*, **6**, 373-378.

- Ligoxygakis, P., Bulet, P. and Reichhart, J.M. (2002a) Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of *Drosophila*. *EMBO Rep*, **3**, 666-673.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.M. (2002b) Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, **297**, 114-116.
- Lin, S.C., Chung, J.Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y.C., Lam, A.Y., Darnay, B.G. and Wu, H. (2008) Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J Mol Biol*, **376**, 526-540.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z. and Lansbury, P.T., Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, **111**, 209-218.
- Love, K.R., Catic, A., Schlieker, C. and Ploegh, H.L. (2007) Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Nat Chem Biol*, **3**, 697-705.
- Makarova, K.S., Aravind, L. and Koonin, E.V. (2000) A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci*, **25**, 50-52.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. and Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*, **1**, 565-574.
- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A. and Fassler, R. (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*, **125**, 665-677.
- Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P. and Leonardi, A. (2006) ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem*, **281**, 18482-18488.
- McCullough, J., Clague, M.J. and Urbe, S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol*, **166**, 487-492.
- Meek, D.W. (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1049-1056.
- Meister, M., Hetru, C. and Hoffmann, J.A. (2000) The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **248**, 17-36.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. and et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**, 66-71.
- Misaghi, S., Galardy, P.J., Meester, W.J., Ovaa, H., Ploegh, H.L. and Gaudet, R. (2005) Structure of the ubiquitin hydrolase UCH-L3 complexed with a suicide substrate. *J Biol Chem*, **280**, 1512-1520.
- Mizuno, E., Iura, T., Mukai, A., Yoshimori, T., Kitamura, N. and Komada, M. (2005) Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol Biol Cell*, **16**, 5163-5174.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W. (2001) A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15050-15055.
- Morrison, S.J. and Spradling, A.C. (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, **132**, 598-611.
- Mosesson, Y., Mills, G.B. and Yarden, Y. (2008) Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*, **8**, 835-850.
- Musone, S.L., Taylor, K.E., Lu, T.T., Nititham, J., Ferreira, R.C., Ortmann, W., Shifrin, N., Petri, M.A., Ilyas Kamboh, M., Manzi, S., Seldin, M.F., Gregersen, P.K., Behrens,

- T.W., Ma, A., Kwok, P.Y. and Criswell, L.A. (2008) Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, **389**, 631-635.
- Nalepa, G., Rolfe, M. and Harper, J.W. (2006) Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 596-613.
- Nanao, M.H., Tcherniuk, S.O., Chroboczek, J., Dideberg, O., Dessen, A. and Balakirev, M.Y. (2004) Crystal structure of human otubain 2. *EMBO Rep*, **5**, 783-788.
- Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., Komuves, L., French, D.M., Ferrando, R.E., Lam, C., Compaan, D., Yu, C., Bosanac, I., Hymowitz, S.G., Kelley, R.F. and Dixit, V.M. (2008) Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*, **134**, 668-678.
- Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q. and Pastore, A. (2005) The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10493-10498.
- Nicolas, E., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. and Lemaitre, B. (1998) In vivo regulation of the IkappaB homologue cactus during the immune response of Drosophila. *J Biol Chem*, **273**, 10463-10469.
- Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D. and Bernards, R. (2005a) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, **17**, 331-339.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R. (2005b) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
- Novak, U., Rinaldi, A., Kwee, I., Nandula, S.V., Rancoita, P.M., Compagno, M., Cerri, M., Rossi, D., Murty, V.V., Zucca, E., Gaidano, G., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., Bhagat, G. and Bertoni, F. (2009) The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone B-cell lymphomas. *Blood*.
- Oliveira, S.A., Li, Y.J., Noureddine, M.A., Zuchner, S., Qin, X., Pericak-Vance, M.A. and Vance, J.M. (2005) Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, **77**, 252-264.
- Ooi, J.Y., Yagi, Y., Hu, X. and Ip, Y.T. (2002) The Drosophila Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO Rep*, **3**, 82-87.
- Park, J.M., Brady, H., Ruocco, M.G., Sun, H., Williams, D., Lee, S.J., Kato, T., Jr., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F., Karin, M. and Wasserman, S.A. (2004) Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in Drosophila. *Genes Dev*, **18**, 584-594.
- Pavletich, N.P., Chambers, K.A. and Pabo, C.O. (1993) The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*, **7**, 2556-2564.
- Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P.P., Polo, S. and Schneider, T.R. (2006) Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell*, **124**, 1183-1195.
- Perkins, N.D. (2000) The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci*, **25**, 434-440.

- Petroski, M.D. (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem*, **9** Suppl 1, S7.
- Pickart, C.M. (2001) Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell*, **8**, 499-504.
- Pickart, C.M. and Eddins, M.J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 55-72.
- Poblete Gutierrez, P., Eggermann, T., Holler, D., Jugert, F.K., Beermann, T., Grussendorf-Conen, E.I., Zerres, K., Merk, H.F. and Frank, J. (2002) Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages. *J Invest Dermatol*, **119**, 527-531.
- Pomerantz, J.L. and Baltimore, D. (2002) Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell*, **10**, 693-695.
- Priolo, C., Tang, D., Brahamandan, M., Benassi, B., Sicinska, E., Ogino, S., Farsetti, A., Porrello, A., Finn, S., Zimmermann, J., Febbo, P. and Loda, M. (2006) The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res*, **66**, 8625-8632.
- Puente, X.S. and Lopez-Otin, C. (2004) A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res*, **14**, 609-622.
- Rape, M. and Jentsch, S. (2004) Productive RUpture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 209-213.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. and Sun, S.C. (2005) Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 3886-3895.
- Reiley, W.W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K.B., Norbury, C.C. and Sun, S.C. (2006) Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. *Nat Immunol*, **7**, 411-417.
- Rutschmann, S., Jung, A.C., Hetru, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. and Ferrandon, D. (2000) The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity*, **12**, 569-580.
- Rutschmann, S., Kilinc, A. and Ferrandon, D. (2002) Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol*, **168**, 1542-1546.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M. and Khochbin, S. (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, **90**, 306-312.
- Schubert, U., Anton, L.C., Bacik, I., Cox, J.H., Bour, S., Bennink, J.R., Orłowski, M., Strebler, K. and Yewdell, J.W. (1998) CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol*, **72**, 2280-2288.
- Schweitzer, K., Bozko, P.M., Dubiel, W. and Naumann, M. (2007) CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of IkappaBalpha. *Embo J*, **26**, 1532-1541.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*, **21**, 8035-8044.
- Semple, C.A. (2003) The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res*, **13**, 1389-1394.
- Setsuie, R. and Wada, K. (2007) The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*, **51**, 105-111.
- Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K. (2007) Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice

- expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int*, **50**, 119-129.
- Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, **1462**, 55-70.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C. and Malim, M.H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, **9**, 1404-1407.
- Shembade, N., Harhaj, N.S., Parvatiyar, K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Matesic, L.E. and Harhaj, E.W. (2008) The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol*, **9**, 254-262.
- Shen, B., Liu, H., Skolnik, E.Y. and Manley, J.L. (2001) Physical and functional interactions between Drosophila TRAF2 and Pelle kinase contribute to Dorsal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8596-8601.
- Shi, C.S. and Kehrl, J.H. (2003) Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem*, **278**, 15429-15434.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, **25**, 302-305.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R.L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D. and Maniatis, T. (2003) Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1. *J Biol Chem*, **278**, 48928-48934.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D. and Maniatis, T. (2000) A Drosophila IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev*, **14**, 2461-2471.
- Singhal, S., Taylor, M.C. and Baker, R.T. (2008) Deubiquitylating enzymes and disease. *BMC Biochem*, **9 Suppl 1**, S3.
- Soncini, C., Berdo, I. and Draetta, G. (2001) Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene*, **20**, 3869-3879.
- Spivakov, M. and Fisher, A.G. (2007) Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet*, **8**, 263-271.
- Stelter, P. and Ulrich, H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, **425**, 188-191.
- Stevenson, L.F., Sparks, A., Allende-Vega, N., Xirodimas, D.P., Lane, D.P. and Saville, M.K. (2007) The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *EMBO J*, **26**, 976-986.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G. and Pombo, A. (2007) Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 1428-1435.
- Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y. and Hultmark, D. (2000) Activation of the Drosophila NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep*, **1**, 347-352.
- Stronach, B.E. and Perrimon, N. (1999) Stress signaling in Drosophila. *Oncogene*, **18**, 6172-6182.
- Sun, S.C. (2008) Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol*, **8**, 501-511.

- Sun, S.C. and Ley, S.C. (2008) New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol*, **29**, 469-478.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (1999) The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 2583-2594.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobara, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W.C. and Nakano, H. (2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem*, **276**, 36530-36534.
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A.N. and Ip, Y.T. (2007) Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **27**, 4578-4588.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2002) *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol*, **3**, 91-97.
- Tirat, A., Schilb, A., Riou, V., Leder, L., Gerhartz, B., Zimmermann, J., Worpenberg, S., Eidhoff, U., Freuler, F., Stettler, T., Mayr, L., Ottl, J., Leuenberger, B. and Filipuzzi, I. (2005) Synthesis and characterization of fluorescent ubiquitin derivatives as highly sensitive substrates for the deubiquitinating enzymes UCH-L3 and USP-2. *Anal Biochem*, **343**, 244-255.
- Todi, S.V., Winborn, B.J., Scaglione, K.M., Blount, J.R., Travis, S.M. and Paulson, H.L. (2009) Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *EMBO J*, **28**, 372-382.
- Tran, K., Mahr, J.A., Choi, J., Teodoro, J.G., Green, M.R. and Spector, D.H. (2008) Accumulation of substrates of the anaphase-promoting complex (APC) during human cytomegalovirus infection is associated with the phosphorylation of Cdh1 and the dissociation and relocalization of APC subunits. *J Virol*, **82**, 529-537.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G. (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*, **424**, 793-796.
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, **13**, 255-263.
- Tschritzis, T., Gaentzsch, P.C., Kosmidis, S., Brown, A.E., Skoulakis, E.M., Ligoxygakis, P. and Mosialos, G. (2007) A *Drosophila* ortholog of the human cylindromatosis tumor suppressor gene regulates triglyceride content and antibacterial defense. *Development*, **134**, 2605-2614.
- Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N. and Aigaki, T. (2005) The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep*, **6**, 1082-1087.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C. and Fushman, D. (2004) Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem*, **279**, 7055-7063.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-615.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. and Dixit, V.M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, **430**, 694-699.

- Wilkinson, K.D., Ventii, K.H., Friedrich, K.L. and Mullally, J.E. (2005) The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. Symposium on ubiquitin and signaling. *EMBO Rep*, **6**, 815-820.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. and Strebel, K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*, **66**, 7193-7200.
- Williams, M.J., Rodriguez, A., Kimbrell, D.A. and Eldon, E.D. (1997) The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense. *EMBO J*, **16**, 6120-6130.
- Wood, S.A. (2002) Dubble or nothing? Is HAUSP deubiquitylating enzyme the final arbiter of p53 levels? *Sci STKE*, **2002**, PE34.
- Wooten, M.W., Geetha, T., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, **283**, 6783-6789.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M. and Ashwell, J.D. (2006) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol*, **8**, 398-406.
- Wu, H. and Arron, J.R. (2003) TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays*, **25**, 1096-1105.
- Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C. and Carraway, K.L., 3rd. (2004) Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol Cell Biol*, **24**, 7748-7757.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.
- Xu, T. and Rubin, G.M. (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development*, **117**, 1223-1237.
- Xue, L., Igaki, T., Kuranaga, E., Kanda, H., Miura, M. and Xu, T. (2007) Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila. *Dev Cell*, **13**, 446-454.
- Yang, J. and Steward, R. (1997) A multimeric complex and the nuclear targeting of the Drosophila Rel protein Dorsal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14524-14529.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R.M., Tsai, Y.C., Lorick, K.L., Ludwig, R.L., Pierre, S.A., Jensen, J.P., Davydov, I.V., Oberoi, P., Li, C.C., Kenten, J.H., Beutler, J.A., Vousden, K.H. and Weissman, A.M. (2007) Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res*, **67**, 9472-9481.
- Yang, Y., Kitagaki, J., Wang, H., Hou, D.X. and Perantoni, A.O. (2009) Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Cancer Sci*, **100**, 24-28.
- Yang, Y., Ludwig, R.L., Jensen, J.P., Pierre, S.A., Medaglia, M.V., Davydov, I.V., Safiran, Y.J., Oberoi, P., Kenten, J.H., Phillips, A.C., Weissman, A.M. and Vousden, K.H. (2005) Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell*, **7**, 547-559.
- Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G.N., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and Cohen, R.E. (2006) Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nat Cell Biol*, **8**, 994-1002.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M. and Rechsteiner, M. (1998) Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem*, **273**, 5461-5467.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. and Yu, X.F. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, **302**, 1056-1060.

- Zambon, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N. and Wu, L.P. (2005) The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7257-7262.
- Zhao, B., Schlesiger, C., Masucci, M.G. and Lindsten, K. (2009) The Ubiquitin Specific Protease 4 (Usp4) Is a New Player in the Wnt Signalling Pathway. *J Cell Mol Med*.
- Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D.S., Chung, Y., Chen, Z.J. and Maniatis, T. (2005) The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem*, **280**, 34048-34055.

Livre

- Voet, D. et Rousseau, G.** 2005. *Biochimie* éditeur De Boeck Université

ANNEXES

Annexe 1

Présentation du système « UAS Gal4 »*

D'après Engels, 1992 The origin of P elements in Drosophila melanogaster. BioEssays 14 681-686 (Engels, 1992).

En plus des avantages pratiques et éthiques que présente le travail sur la drosophile, le principal atout de cet organisme réside dans les très nombreuses possibilités de modifier son génome dans des contraintes de temps raisonnables. Il est en effet possible d'induire l'expression ou l'inactivation de gènes dans des tissus spécifiques ou durant des périodes précises du développement ou même dans seulement certaines cellules de l'insecte. Ces manipulations sont possible grâce à l'utilisation d'un transposon appelé élément P modifié sous forme de plusieurs types de transgènes.

Pour être autonome, un élément P doit être constitué de séquences inversement répétées en 5' et en 3' nécessaires mais pas suffisantes pour la transposition et de quatre exons codant la transposase, l'enzyme nécessaire à la transposition et à la régulation de la mobilité de l'élément P. Les généticiens utilisent des transposons non autonomes créés artificiellement par le remplacement de la séquence codant la transposase par un gène d'intérêt, souvent un marqueur permettant de « suivre » l'insertion de l'élément P dans le génome. Les éléments P peuvent être utilisés chez la drosophile pour créer des mutations, identifier des gènes d'intérêt, les cloner et les ré-insérer dans le génome.

L'utilisation la plus courante de l'élément P consiste en la création de mouches transgéniques. Le gène d'intérêt ou une séquence du gène inversement répétée (ARN interférent) est placée entre les séquences répétées 5' et 3' d'un élément P, par clonage à l'intérieur d'un plasmide, et est injecté dans des embryons en présence de transposase. L'élément P, porteur du gène d'intérêt transpose aléatoirement dans le génome. Le gène d'intérêt est généralement accompagné d'un marqueur permettant l'identification des transformants. Il s'agit généralement du gène *mini-white*, une partie du gène *white* responsable de la couleur rouge des yeux des drosophiles.

Plusieurs vecteurs contenant des éléments P particuliers destinés à faciliter le contrôle de l'expression de gènes ont été créés par les généticiens. Par exemple, le système mis au

* Cette annexe est destinée aux personnes non initiées à la drosophile

point par Brand et Perrimon utilise la combinaison de deux éléments P et permet le contrôle de l'expression d'un gène de façon très précise (Brand and Perrimon, 1993 ; figure 30). Le premier élément P mis en jeu contient un promoteur fort associé à un gène rapporteur codant le facteur de transcription Gal4 de levure. Le second élément porte le gène d'intérêt en aval d'un promoteur contenant les séquences UAS reconnues par le facteur Gal4. Le croisement d'une lignée inductrice, contenant l'élément P{Gal4} avec une lignée cible, contenant l'élément P{UAS-gène d'intérêt}, permet, dans la descendance, l'expression du gène d'intérêt dans les conditions où le facteur Gal4 est exprimé. Suivant la nature du promoteur en aval du facteur Gal4, on peut induire l'expression d'un gène de façon tissu spécifique. Il existe également des promoteurs « Heat Shock » (HS) qui induisent la transcription du facteur Gal4 en cas de choc thermique. Le facteur Gal4 peut aussi être inhibé par un inhibiteur thermosensible Gal80ts. A 20°C, Gal80ts est actif et inhibe Gal4 alors qu'à 30°C il change de conformation et perd sa capacité à inhiber Gal4. Ceci permet d'avoir un contrôle supplémentaire de l'activation d'un gène dans ce système.

Il existe des banques de lignées contenant un élément P{UAS}inséré à différents endroits du génome. Placés en amont d'un gène, l'insertion d'un élément P{UAS} permet l'expression du gène correspondant en présence du facteur de transcription Gal4.

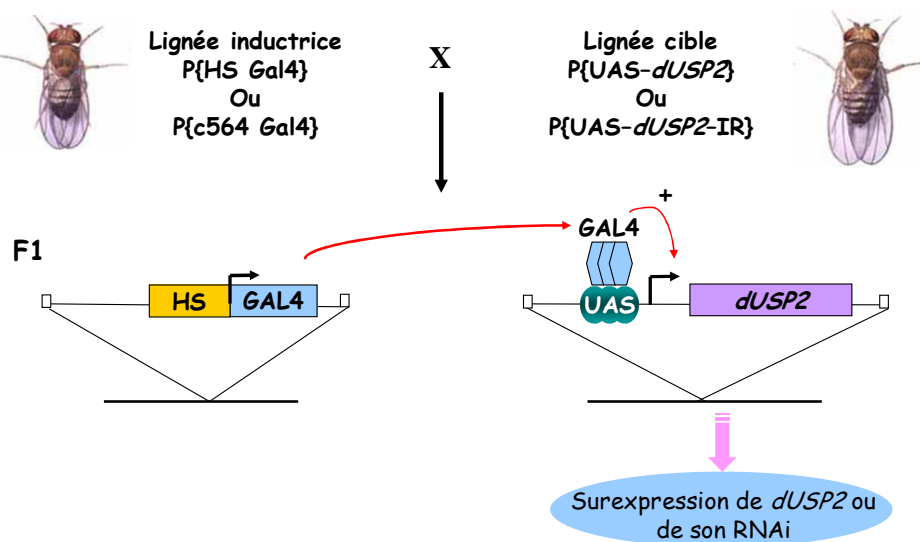


Figure 30. Illustration du système d'expression à deux éléments P : P{Gal4} et P{UAS}. Croisées avec une lignée inductrice, la lignée cible contenant l'élément P{UAS-*dUSP2*} permet d'induire l'expression du gène *dUSP2* alors que la lignée cible P{UAS-*dUSP2*-IR} induit son inactivation. Les tissus où ont lieu l'expression ou l'inactivation de *dUSP2* sont déterminés par le promoteur du facteur Gal4. Par exemple le promoteur c564 Gal4 permet l'expression du facteur Gal4 dans le corps gras alors qu'avec le promoteur HS, l'expression du facteur Gal4 est ubiquitaire et dépendante d'un choc thermique.

Un autre système de levure utilisé chez la drosophile est la recombinaise « site spécifique » FLP (flipase) et son site cible FRT (Golic and Lindquist, 1989). Un élément P porte la recombinaise FLP sous le contrôle d'un promoteur HS et un second élément P porte le gène d'intérêt entre deux sites FRT. Quand on fait subir un choc thermique à des mouches porteuses de ces deux éléments P, la flipase induit la recombinaison des sites FRT dans les cellules somatiques conduisant à la perte du gène contenu entre ces séquences FRT (figure 31).

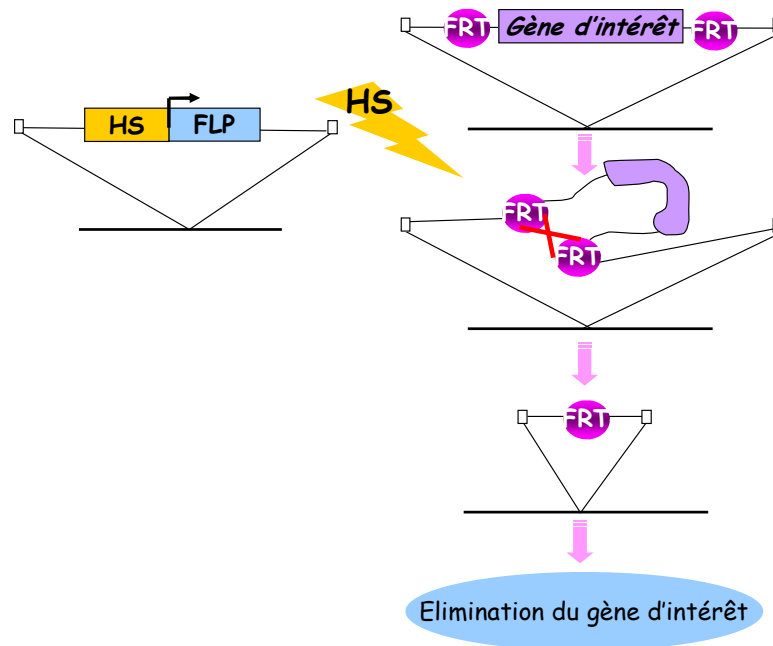


Figure 31. Illustration du système FLP/FRT conduisant à l'élimination d'un gène. Au moment de l'induction de la FLP par choc thermique, le gène d'intérêt placé entre deux séquences FRT est éliminé par recombinaison homologue (recombinaison sur un même bras chromosomique).

Le système FLP/FRT peut aussi être utilisé pour générer des mosaïques de cellules comprenant des cellules homozygotes pour un bras chromosomique entier (clones) (Xu and Rubin, 1993). Ce système met en jeu deux éléments P, le premier contient le gène d'intérêt ainsi qu'une séquence FRT située près de la base du bras chromosomique, le second, situé sur le chromosome homologue, contient un marqueur, GFP par exemple, ainsi qu'une séquence FRT située également près de la base du bras chromosomique. Quand la FLP est induite, généralement par un choc thermique, ces deux bras chromosomiques s'échangent par recombinaison hétérologue. Lorsque cette recombinaison a lieu pendant une mitose, les cellules filles issues de cette mitose peuvent être homozygotes, l'une pour l'élément P contenant le gène d'intérêt, l'autre pour l'élément P contenant le marqueur (figure 32). Après plusieurs division cellulaires normales (sans recombinaison), on obtient deux secteurs de clones somatiques homozygotes pour tous les gènes situés en aval des séquences FRT portées

par les éléments P. Les clones contenant le gène d'intérêt à l'état homozygote peuvent être repérés par l'absence du marqueur présent au départ sur le chromosome homologue. Cette méthode est particulièrement utile pour étudier des gènes létaux à l'état homozygote dans l'organisme entier.

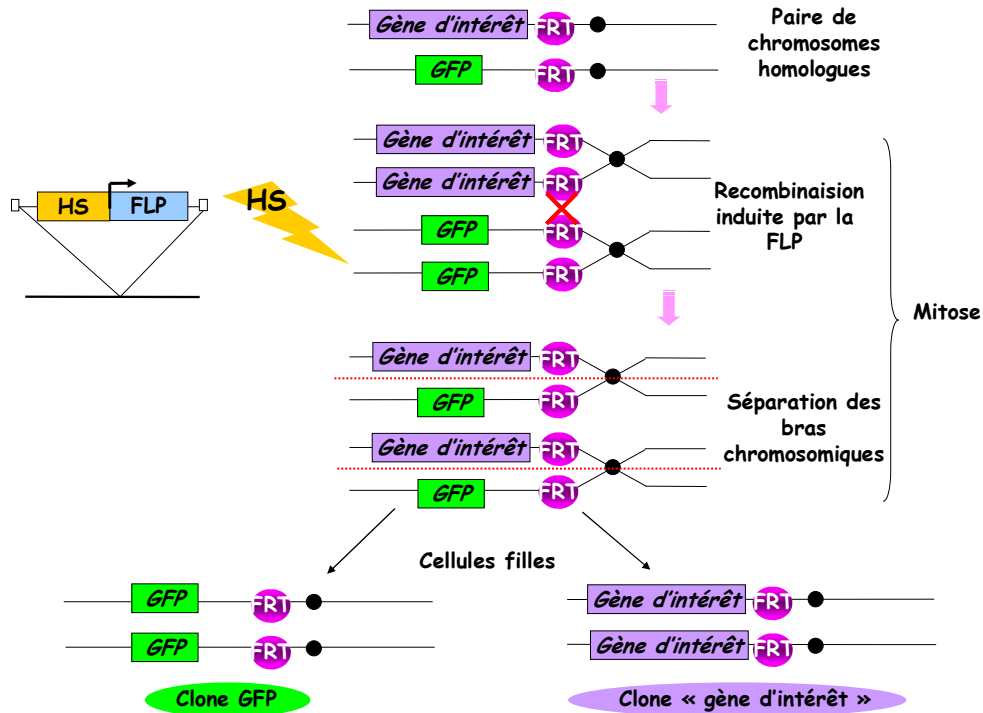
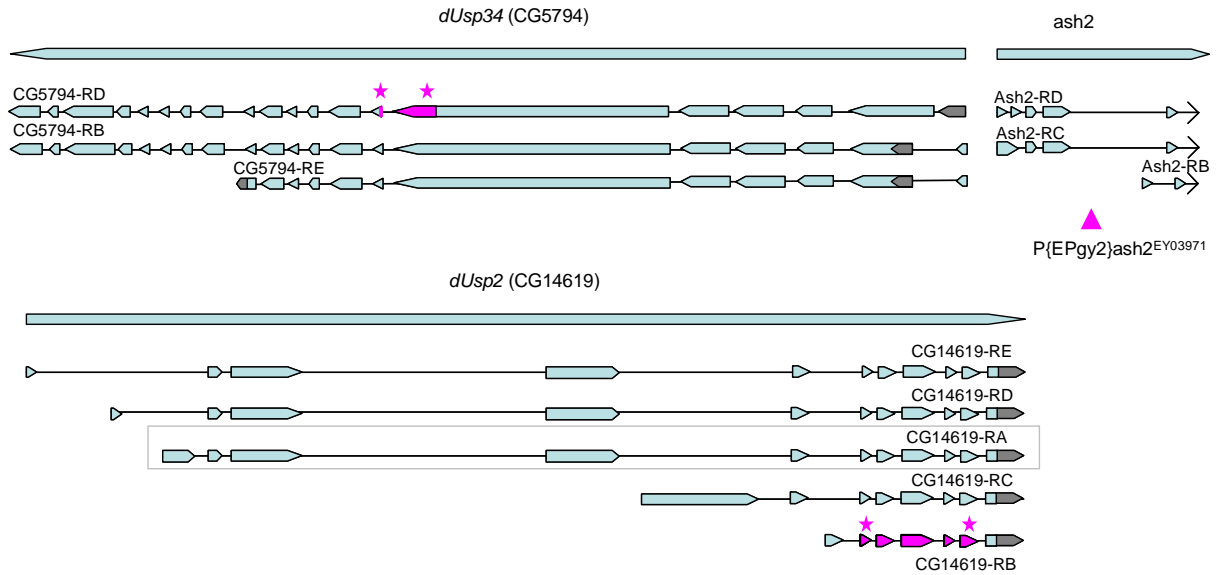
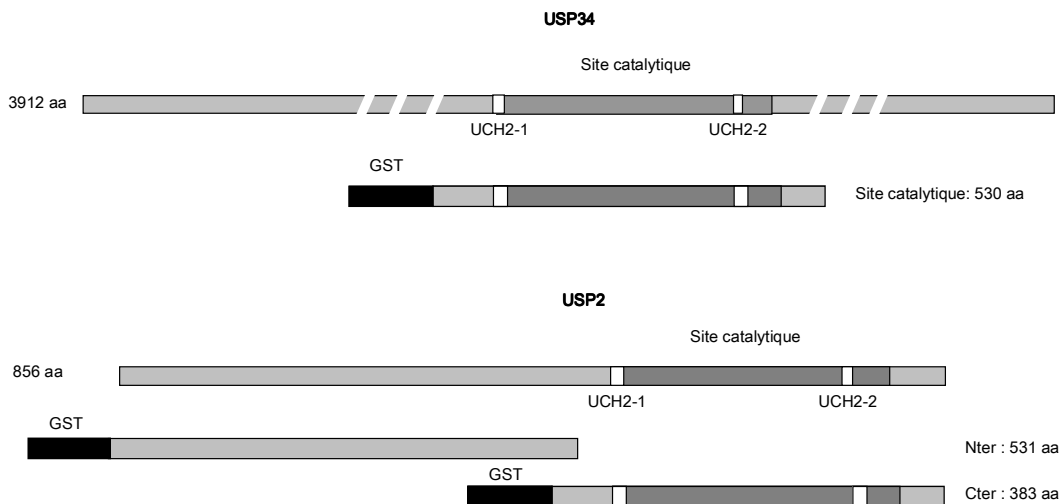


Figure 32. Illustration du système FLP/FRT conduisant à la création de clones somatiques. Lorsque la FLP est induite, généralement pas choc thermique, il se produit une recombinaison hétérologue entre les bras chromosomiques des deux chromosomes homologues portant des séquences FRT. Lorsque cette recombinaison a lieu pendant une mitose, elle induit l'apparition de cellules filles homozygotes pour les gènes situés en aval des séquences FRT (clones).

Annexe 2**Cartes des transcrits de *dUsp2* et *dUsp34*****Figure 33. Représentation des transcrits de *dUsp2* (CG14619) et *dUsp34* (CG5794).**

Le triangle rose indique la position de l'éléments P{UAS} qui a permis la surexpression de *dUsp34*. Le transcrit encadré de dUSP2 correspond au transcrit exprimé par les constructions P{UAS-*dUsp2*} et pAc-*dUsp2*-myc. La position des sites catalytiques est représentée en rose sur l'un des transcrits de chaque gène. Les étoiles roses symbolisent la position des résidus catalytiques cystéine et histidine conservés. D'après *flybase* (<http://flybase.org>).

Schémas des constructions de dUSP2 et dUSP34 en fusion avec la GST**Figure 34. Représentation des constructions GST de dUSP2 et dUSP34.**

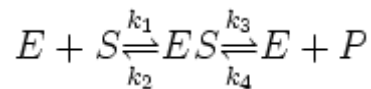
Les boîtes UCH2 indiquent la position des résidus catalytiques conservés.

Annexe 3**Rappel sur l'équation de Michaelis-Menten**

D'après Biochimie par D. Voet et G. Rousseau, éditeur De Boeck Université

L'équation de Michaelis-Menten permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit. Elle relie la vitesse initiale de la réaction à la concentration initiale de substrat et à des paramètres constants, caractéristiques de l'enzyme. L'équation de Michaelis-Menten est un formalisme simplifié, adapté à de nombreuses enzymes. Elle ne permet cependant pas de rendre compte de comportements complexes, comme la multiplicité des substrats ou l'existence de plusieurs sites actifs présentant des comportements coopératifs ou anticoopératifs.

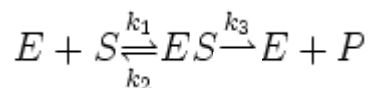
Si on considère une réaction enzymatique mettant en jeu une enzyme E, un substrat S, un complexe intermédiaire « enzyme substrat » ES et un produit P, on peut représenter les différentes étapes de la réaction de la façon suivante :



Avec k_1, k_2, k_3 et k_4 les constantes de vitesse des réactions.

Hypothèses dans l'analyse de Michaelis-Menten :

- On se place dans des conditions initiales où il n'y a pas de produit P dans le test enzymatique. On analyse la vitesse initiale de la réaction, avant que le produit ait le temps de s'accumuler. La catalyse est alors très déplacée dans le sens de la synthèse des produits, la réaction inverse dont la vitesse est $k_4[P]$ est alors pratiquement inexistante, puisque $[P] \approx 0$. Les étapes de la réaction deviennent :



- A l'exception de la phase initiale de la réaction qui ne dure que quelques millisecondes après l'addition du substrat à l'enzyme, $[ES]$ reste pratiquement constant jusqu'à ce que le substrat soit épuisé. On fait donc l'hypothèse de *l'état quasi stationnaire* :

$$d[ES]/dt = 0$$

- Quand la concentration en substrat est très grande devant la concentration en enzyme, c'est-à-dire lorsque toute l'enzyme se trouve sous forme ES, la deuxième étape de la réaction

devient limitante et la vitesse globale de la réaction est donnée par la vitesse v ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$) de la dernière réaction :

$$v = d[\text{P}]/dt = k_3 [\text{ES}] \quad (1)$$

Démonstration de l'équation de Michaelis-Menten :

La vitesse globale de formation de ES est donnée par la différence entre sa vitesse de formation et sa vitesse de disparition.

$$d[\text{ES}]/dt = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_2[\text{ES}] - k_3[\text{ES}] \quad (2)$$

L'hypothèse de l'état stationnaire amène à :

$$\begin{aligned} k_1[\text{E}][\text{S}] - k_2[\text{ES}] - k_3[\text{ES}] &= 0 \\ [\text{ES}] &= k_1[\text{E}][\text{S}] / (k_2 + k_3) \end{aligned} \quad (3)$$

La concentration d'enzyme $[\text{E}]$ est donnée par $[\text{E}] = [\text{E}_0] - [\text{ES}]$ où $[\text{E}_0]$ est la concentration totale (et initiale) en enzyme. On a donc :

$$\begin{aligned} [\text{ES}] &= k_1([\text{E}_0] - [\text{ES}])[\text{S}] / (k_2 + k_3) \\ [\text{ES}] (1 + k_1[\text{S}] / (k_2 + k_3)) &= k_1[\text{E}_0][\text{S}] / (k_2 + k_3) \\ [\text{ES}] (k_2 + k_3 + k_1[\text{S}]) &= k_1[\text{E}_0][\text{S}] \\ [\text{ES}] &= k_1[\text{E}_0][\text{S}] / (k_2 + k_3 + k_1[\text{S}]) \\ [\text{ES}] &= [\text{E}_0][\text{S}] / ((k_2 + k_3)/k_1 + [\text{S}]) \end{aligned}$$

D'où:
$$[\text{ES}] = [\text{E}_0][\text{S}] / (K_m + [\text{S}]) \quad (4)$$

avec $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$, K_m est la constante de Michaelis en mol/L.

La vitesse initiale de la réaction est donnée d'après (1) et (4) par :

$$v_0 = v(t=0) = k_3 [\text{ES}]_{t=0} = k_3 [\text{E}_0][\text{S}_0] / (K_m + [\text{S}_0]) \quad (5)$$

C'est la vitesse de réaction en l'absence de produit pour une concentration initiale $[\text{S}_0]$ en substrat, elle s'exprime en $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ou M s^{-1} .

La vitesse initiale maximale de la réaction est atteinte lorsque l'enzyme est saturée en substrat c'est-à-dire lorsque la totalité de l'enzyme est sous forme ES ou encore lorsque $[E_0] = [ES]$.

On a donc d'après (1):

$$v_{\max} = k_3[E_0]$$

On peut réécrire l'équation (5) en fonction de v_{\max} :

$$v_0 = v_{\max} [S_0] / (K_m + [S_0]) \quad (6)$$

Ceci est l'équation de Michaelis-Menten, l'équation de base de la cinétique enzymatique. Elle est représentée graphiquement par une branche d'hyperbole.

Si on exprime $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$, on obtient à partir de (6) :

$$[S_0]/v_0 = [S_0] / (v_{\max} [S_0]) \times (K_m + [S_0])$$

$$[S_0]/v_0 = K_m/v_{\max} + [S_0]/v_{\max}$$

La représentation graphique de $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$ donne une droite de coefficient directeur $1/v_{\max}$ et d'ordonnée à l'origine K_m/v_{\max} . Il s'agit de la représentation de Hanes-Woolf, très utile d'un point de vue pratique pour la détermination de K_m et v_{\max} par régression linéaire.

La constante K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à $v_{\max}/2$ et correspond également à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (ES) ou à l'inverse de la constante d'affinité apparente du substrat pour l'enzyme.

En effet, $K_m = (k_2 + k_3) / k_1 = ([E][S]/[ES])$ d'après (3).

K_m varie en fonction de l'enzyme, du substrat, de la température et du pH.

Un couple enzyme-substrat est caractérisé par les grandeurs K_m et v_{\max} .

On définit également la constante catalytique d'une enzyme k_{cat} en s^{-1} :

$$k_{\text{cat}} = v_{\max} / [E_0]$$

On peut exprimer v_0 en fonction de k_{cat} :

$$v_0 = k_{\text{cat}} [E_0][S_0] / (K_m + [S_0])$$

Dans le modèle de Michaelis-Menten, $k_{\text{cat}} = k_3$.

k_{cat} représente le nombre de molécules de substrats transformés en produit par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme à saturation, on l'appelle aussi le « turnover number ».

Un couple enzyme-substrat peut donc aussi être caractérisé par les grandeurs K_m et k_{cat} .

Quand $[S_0] \ll K_m$, très peu de ES est formé, par conséquent $[E] \approx [E_0]$ et l'équation (5) devient une réaction d'ordre 2 :

$$\begin{aligned}v_0 &= k_3 [E_0][S_0] / K_m \\v_0 &= k_{\text{cat}} / K_m [E_0][S_0]\end{aligned}$$

où k_{cat} / K_m est la constante de vitesse apparente d'ordre 2 de la réaction enzymatique ; la vitesse de la réaction varie selon la fréquence de rencontre entre l'enzyme et le substrat. L'expression k_{cat} / K_m permet donc de mesurer l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Détermination expérimentale des paramètres K_m et k_{cat} ou K_m et v_{max} :

Expérimentalement on réalise des cinétiques de l'activité catalytique d'une enzyme sur un substrat pour plusieurs concentrations initiales en substrat. On se place dans des conditions permettant l'application de l'équation de Michaelis-Menten, c'est-à-dire à une concentration très faible en enzyme comparée à la concentration en substrat. On détermine la vitesse initiale de réaction de l'enzyme sur son substrat pour les différentes concentrations en substrat. On obtient plusieurs points ($v_0 ; [S_0]$) qui permettent de modéliser la fonction $[S_0]/v_0$ en fonction de $[S_0]$ par une droite dans la représentation de Hanes-Woolf. Cette modélisation donne accès aux coefficients K_m et v_{max} puis k_{cat} correspondants à l'équation de Michaelis-Menten.

Annexe 4

Article : Bergeret et al., 2008

TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis

Bergeret Evelyne, Perrin Jackie, Williams Michael, Grunwald Didier, Engel Elodie, Thevenon Dominique, Taillebourg Emmanuel, Bruckert Franz, Cosson Pierre and Fauvarque Marie-Odile. (2008) *J. Cell Science*, 121 : 3325-3234

TM9SF4 is required for *Drosophila* cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis

Evelyne Bergeret^{1,2,3}, Jackie Perrin^{1,2,3}, Michael Williams⁴, Didier Grunwald^{1,2,3}, Elodie Engel^{1,2,3}, Dominique Thevenon^{1,2,3}, Emmanuel Taillebourg^{1,2,3}, Franz Bruckert⁵, Pierre Cosson⁶ and Marie-Odile Fauvarque^{1,2,3,*}

¹CEA, IRTSV, LTS, 38054 Grenoble, France

²INSERM U873, 38054 Grenoble, France

³Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France

⁴Institute of Biological and Environmental Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen AB24 2TZ, UK

⁵Minatec, Grenoble Institute of Technology, LMPG, 38054 Grenoble, France

⁶Centre Médical Universitaire, Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Université de Genève, CH-1211 Geneva 4, Switzerland

*Author for correspondence (e-mail: marie-odile.fauvarque@cea.fr)

Accepted 7 July 2008

Journal of Cell Science 121, 3325-3334 Published by The Company of Biologists 2008

doi:10.1242/jcs.030163

Summary

Nonaspanins are characterised by a large N-terminal extracellular domain and nine putative transmembrane domains. This evolutionarily conserved family comprises three members in *Dictyostelium discoideum* (Phg1A, Phg1B and Phg1C) and *Drosophila melanogaster*, and four in mammals (TM9SF1-TM9SF4), the function of which is essentially unknown. Genetic studies in *Dictyostelium* demonstrated that Phg1A is required for cell adhesion and phagocytosis. We created *Phg1A/TM9SF4*-null mutant flies and showed that they were sensitive to pathogenic Gram-negative, but not Gram-positive, bacteria. This increased sensitivity was not due to impaired Toll or Imd signalling, but rather to a defective cellular immune response. *TM9SF4*-null larval macrophages phagocytosed Gram-negative *E. coli* inefficiently, although Gram-positive *S. aureus* were phagocytosed

normally. Mutant larvae also had a decreased wasp egg encapsulation rate, a process requiring haemocyte-dependent adhesion to parasitoids. Defective cellular immunity was coupled to morphological and adhesion defects in mutant larval haemocytes, which had an abnormal actin cytoskeleton. TM9SF4, and its closest paralogue TM9SF2, were both required for bacterial internalisation in S2 cells, where they displayed partial redundancy. Our study highlights the contribution of phagocytes to host defence in an organism possessing a complex innate immune response and suggests an evolutionarily conserved function of TM9SF4 in eukaryotic phagocytes.

Key words: Innate immunity, Macrophages, Adhesion, Phagocytosis, Cytoskeleton, Nonaspanin

Introduction

Pathogen engulfment by host phagocytic cells and their subsequent killing in the phagocytic vacuole are major events for bacterial clearance and contribute to a robust innate immunity in most multicellular organisms (Beutler, 2004). In mammals, phagocytosis is mainly achieved by neutrophils, monocytes and macrophages. These cells engage additional host defences by inducing an inflammatory response, mainly through the synthesis of Rel/NF- κ B-dependent cytokines.

The unicellular phagocytic amoeba *Dictyostelium discoideum* has been used as a model organism to study and discover new genes implicated in phagocytosis (Cornillon et al., 2000). A genetic screen identified *PHG1A*, alteration of which causes a marked decrease in *Dictyostelium* adhesion to certain substrates and a strong impairment in bacterial phagocytosis and killing (Benghezal et al., 2003; Benghezal et al., 2006; Cornillon et al., 2000). *PHG1A* encodes a member of the TM9 protein family (also known as nonaspanins or TM9SF) characterised by the presence of nine transmembrane domains, and a high degree of evolutionary conservation (Chluba-de Tapia et al., 1997; Schimmoller et al., 1998). TM9 proteins were found in endosomal or lysosomal fractions in yeast (Singer-Kruger et al., 1993), *Dictyostelium* (Benghezal et al., 2003) and human cells (Bagshaw et al., 2005; Diaz et al., 1997; Schimmoller et al., 1998) where they might participate in vesicular transport (Diaz et al., 1997). More recently,

TM9 proteins were implicated in lysosomal secretion in *Dictyostelium* and cell signalling in both *Dictyostelium* and yeast (Froquet et al., 2008). However, no mutant or functional data are available at the level of a metazoan organism possessing a complex immune response.

Thanks to its sophisticated immune system *Drosophila* represents a powerful host model for evaluating the contribution of phagocytic cells to host innate immunity. *Drosophila* has specialised circulating phagocytic cells derived from the haemocytic blood cell lineage (Crozier and Meister, 2007; Williams, 2007). Plasmatocytes are the most abundant type of circulating haemocytes and represent the primary macrophages required for bacterial phagocytosis (Avet-Rochex et al., 2005; Brennan et al., 2007; Kocks et al., 2005). Upon infection by parasites, such as wasp eggs, plasmatocytes can recognise and attach to the invader. Plasmatocytes then signal to the lymph gland to promote the differentiation of another kind of haemocyte called lamellocytes (Lanot et al., 2001). These large cells attach to the plasmatocyte layer and form a hermetic capsule around the invader (Russo et al., 1996; Williams et al., 2005). In insects, plasmatocyte adhesion to wasp eggs is a crucial step for encapsulation and strongly depends on cell surface molecules such as integrins (Irving et al., 2005; Zhuang et al., 2007). Besides the cellular immune response, *Drosophila* possesses a sophisticated humoral response, which includes the synthesis of antimicrobial peptides by fat body cells under the control of the two

conserved NF- κ B signalling pathways Toll and Imd (immune deficiency) (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ferradon et al., 2007). The Imd pathway is strongly stimulated by Gram-negative bacteria resulting in the activation of the NF- κ B transcription factor Relish, which in turn activates the transcription of numerous genes, in particular the antimicrobial-peptide-encoding genes *Attacin* (*Att*), *Diptericin* (*Dipt*) and *Drosocin* (*Dro*) (Georgel et al., 1993; Lemaitre et al., 1995; Levashina et al., 1998). The Toll pathway is mainly activated by fungi or Gram-positive bacteria resulting in the expression of another set of antimicrobial peptide genes including *Drosomycin* (*Drs*) (Lemaitre et al., 1995).

In this paper, we describe the molecular characterisation of the three *Drosophila* nonaspanins and the function in innate immunity of *Phg1A/TM9SF4*, the *Drosophila* orthologue of *Dictyostelium* Phg1A and human *TM9SF4*. We created *TM9SF4*-null mutant flies and showed that their sensitivity to Gram-negative bacteria was correlated to impaired haemocyte-dependent phagocytosis. *TM9SF4* mutant larvae failed to properly encapsulate eggs from the avirulent wasp strain *Leptopilina boulardi* G486. These phenotypes are coupled to abnormal adhesion and defective cytoskeleton reorganisation in mutant plasmatocytes. Both *TM9SF4* and *TM9SF2*, its closest paralogue, were required for phagocytosis in S2 cells. Our study shows that *TM9SF4* function in cell adhesion and bacterial engulfment might result from defective cytoskeleton control and that *TM9SF4* plays a crucial role in cellular immunity to ensure host defence against infections.

Results

Drosophila TM9 proteins

We identified three TM9 genes in the *Drosophila* genome: CG7364 (chromosome 2L-34D), CG9318 (2L-38E) and CG10590 (3L-64D). Nonaspanins are divided into two subgroups presenting differential characteristic features in their N-terminal amino acid sequence (Benghezal et al., 2006; Sugawara et al., 2001). Subgroup I is characterised by a shorter hydrophilic N-terminal sequence and a characteristic motif at position 50 (VGPYxNxQETY) whereas subgroup II contains a longer N-terminal domain (~280 amino acids) and a conserved sequence immediately after the signal peptide [FY(V/L)PG(V/L)AP] (Benghezal et al., 2003). Phylogenetic analysis revealed that CG10590 (*Drosophila* *TM9SF3*) belongs to subgroup I, along with *Dictyostelium* Phg1B and human *TM9SF1* and *TM9SF3*. CG9318 (*Drosophila* *TM9SF2*) and CG7364 (*Drosophila* *TM9SF4*) share 48% identity in their amino acid sequence and belong to subgroup II, together with *Dictyostelium* Phg1A and human *TM9SF2* and *TM9SF4* (Fig. 1). The *Drosophila* *TM9SF4* protein contains the FYVPGVAP consensus sequence at amino acid position 25 followed by nine conserved transmembrane domains; it is the closest homologue of *Dictyostelium* Phg1A and as such, it was previously referred to as DPhg1A (Benghezal et al., 2006). *Drosophila* *TM9SF4* exhibits 46% identity with *Dictyostelium* Phg1A and 65% identity with human *TM9SF4*. This high degree of conservation suggests that the corresponding genes might share similar functions. *TM9SF4* refers to *Drosophila* *TM9SF4/Phg1A* in this study.

Creating *TM9SF4*-knockout mutant flies

We created a *Drosophila* null mutant *TM9SF4*¹ by remobilising the P{lacW}CG7364^{k07245} transposon inserted into the *TM9SF4* transcription unit (Fig. 2A). A 1.4 kb deletion was characterised by PCR analysis, which removed a portion of *TM9SF4* coding sequences including the transcription start site and the N-terminus

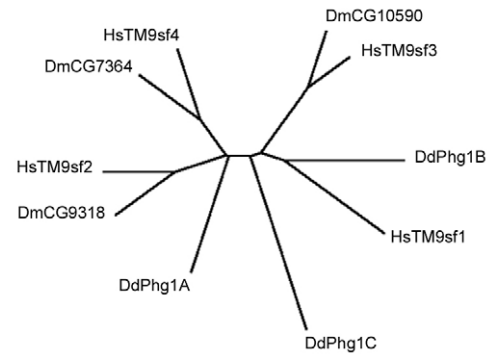


Fig. 1. The nonaspanin family in *Drosophila melanogaster*. Similarity tree of TM9 proteins in *D. melanogaster* (Dm; CG7364, CG9318, CG10590) compared with human (Hs; TM9SF1-TM9SF4) and *D. discoideum* (Dd; PHG1A, PHG1B, PHG1C).

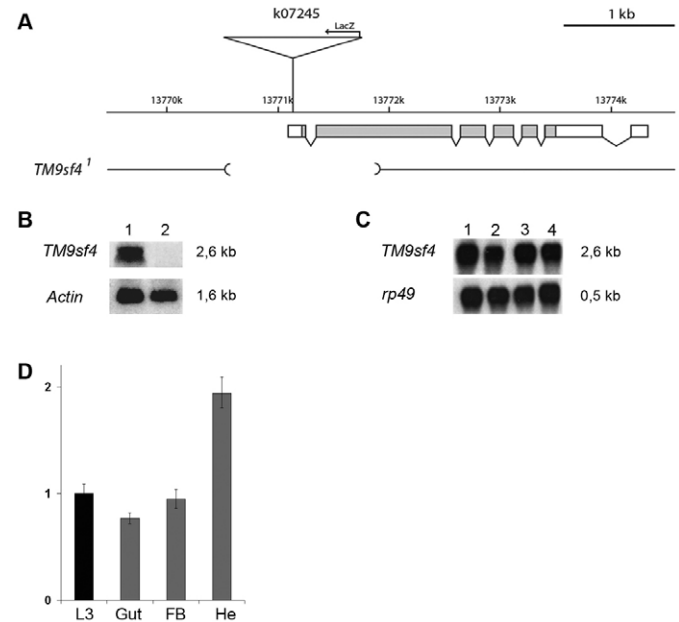


Fig. 2. *TM9SF4* gene map. (A) The *TM9SF4* gene produces one transcript of 2.6 kb which contains one coding sequence (coloured in grey). The insertion point for {lacW}CG7364^{k07245} is 94 bp upstream of the ATG translation start. One 1.4 kb deletion (*TM9SF4*¹) was recovered encompassing the transcription start site and the N-terminal part of the corresponding protein. (B) The deletion creates a null allele as visualised by northern analysis of *TM9SF4* transcripts in control *w*¹¹¹⁸ (lane 1) compared with mutant *TM9SF4*¹ (lane 2) flies. (C) Developmental northern blot. Lane 1, embryos; lane 2, third instar larvae; lane 3, pupae; lane 4, adult. (D) *TM9SF4* transcripts were quantified by real-time PCR from total RNAs extracted from either the whole third instar larvae (L3), the gut (Gut), the fat body (FB) or the larval circulating plasmatocytes (He). Results are mean \pm s.d.

(Fig. 2A). Sequence analysis indicated that the surrounding genes were not affected by this deletion (data not shown). A revertant strain (Rev45) showed wild-type sequence following mobilisation and was selected as a control strain possessing similar genetic background as *TM9SF4*¹. Northern blot analysis showed that no transcripts were detectable in *TM9SF4*¹ adult flies compared with the parental strain *w*¹¹¹⁸ (Fig. 2B) or Rev45 flies (not shown). *TM9SF4* is expressed at all developmental stages (Fig. 2C);

however, *TM9SF4*¹ flies are normally viable and fertile suggesting redundancy with other nonspanins during development. Quantitative real-time PCR allowed for the detection of *TM9SF4* transcripts from dissected third instar larval tissues and indicated that *TM9SF4* is expressed in the main immune organs such as circulating haemocytes, fat body cells and larval gut, with the maximum expression level in haemocytes compared with the whole larvae (Fig. 2D).

TM9SF4 mutant flies have reduced resistance to Gram-negative bacteria
 To assess *TM9SF4* function in *Drosophila* resistance to bacterial infection, *TM9SF4* mutant flies were infected with several bacterial species by septic injury. We reported previously that *TM9SF4* (*Dphg1A*) mutant flies showed normal resistance to *Pseudomonas aeruginosa*, but reduced resistance to the Gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* a pathogen that was specifically not permissive for the growth of *PHG1A* mutant *Dictyostelium* (Benghezal et al., 2006). Here we show that *TM9SF4* sensitivity to *Klebsiella pneumoniae* was not as strong as that observed for the mutant *TAK1*² which blocks activation of the Imd pathway (Rutschmann et al., 2000; Vidal et al., 2001) (Fig. 3A). We used a more physiological infection procedure consisting of oral infection by providing *P. aeruginosa* in the animal feed (Avet-Rochex et al., 2005; Avet-Rochex et al., 2007; Erickson et al., 2004; Vodovar et al., 2005). This procedure allowed detection of the significant sensitivity of *TM9SF4* mutant flies compared with control *Rev45* or *w*¹¹¹⁸ flies, suggesting a contribution of *TM9SF4* to the intestinal resistance to *P. aeruginosa* (Fig. 3B). In addition to *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, *TM9SF4* mutant flies were slightly sensitive to Gram-negative *Enterobacter cloacae* (Fig. 3C), whereas their resistance to nonpathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* or *Agrobacterium tumefaciens*, was similar to that in control flies (data not shown). No difference in sensitivity was observed between *TM9SF4* mutant and control flies following infection with Gram-positive *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (Fig. 3D,E) or *Micrococcus luteus* (not shown).

To rescue *TM9SF4*¹ sensitivity to infections we constructed UAS-*TM9SF4* transgenic flies allowing tissue-directed expression of the *TM9SF4* cDNA by various Gal4-specific driver lines (Brand et al., 1994). However, re-expressing *TM9SF4* in haemocytes either by *srpGal4* (Crozatier et al. 2004), or through the more specific *hmlGal4* (Goto et al., 2003) and *HeGal4* (Zettervall et al., 2004) driver lines, induced pupal lethality. Vials were placed at 18°C during development, which allowed for the recovery of adults in the case of *hmlGal4* (*TM9SF4*¹; *hmlGal4/UAS-TM9SF4*) and *HeGal4* (*TM9SF4*¹; *HeGal4/UAS-TM9SF4* flies) but not in the case of

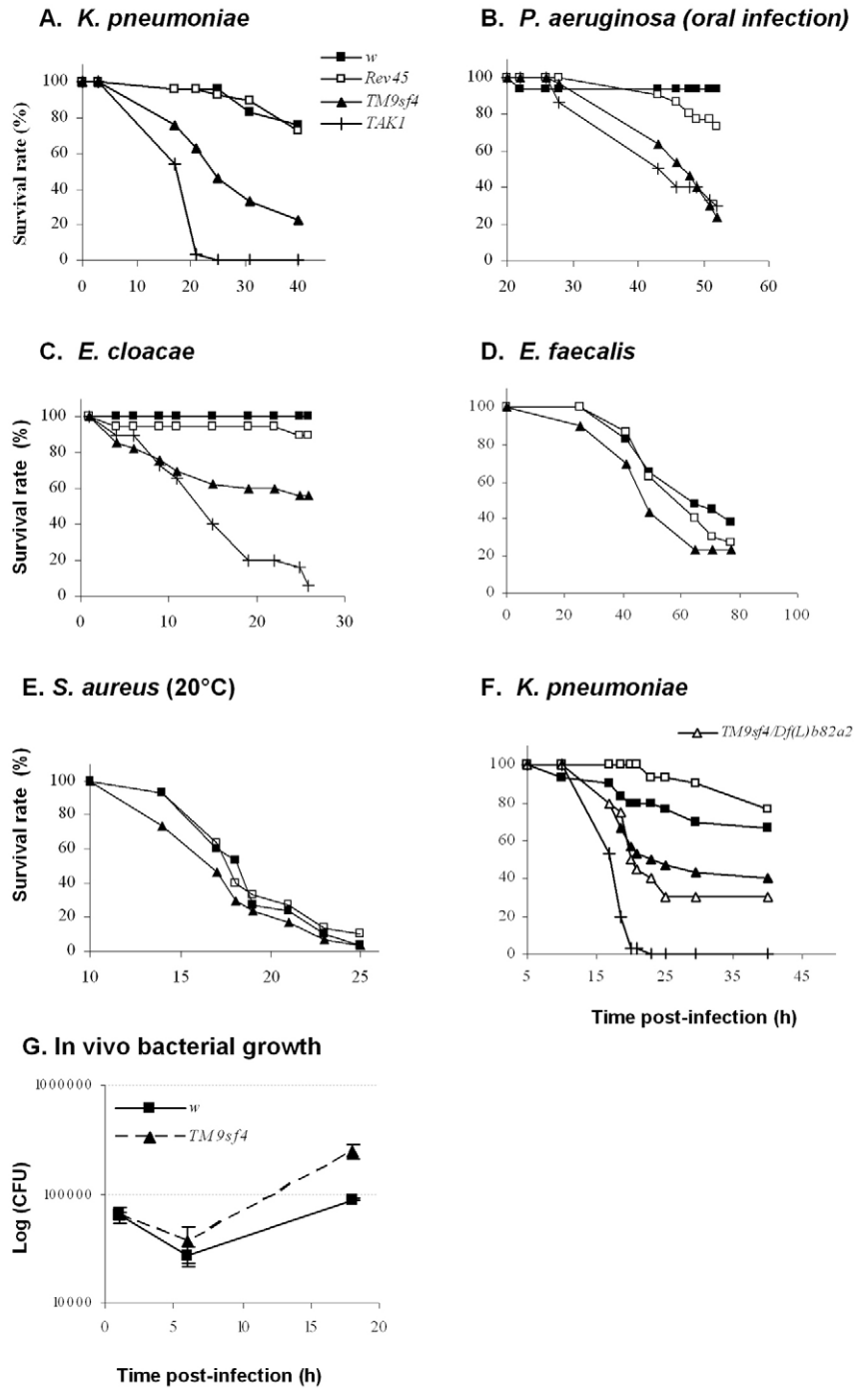


Fig. 3. Survival rate of infected *Drosophila* flies. 5- to 7-day-old males, previously raised at 25°C, were infected with indicated bacteria, either by septic injury onto the thorax with a thin needle previously dipped into the indicated bacterial solution (A,C-G) or by oral ingestion (B). Survival rate was followed at 25°C except in the case of *S. aureus* (20°C) as indicated. (A-F) Survival of *TM9SF4* mutant flies and *TM9SF4/Df(2L)b82a2* compared with control *w*¹¹¹⁸ (*w*), *Rev45* flies or *dTAK1*² (*TAK1*) mutant flies affected in the Imd pathway. (G) The number of colony forming units (CFUs), plotted in logarithmic scale, was calculated from bacteria isolated from infected flies.

srpGal4 (*srpGal4; TM9SF4*¹; *UAS-TM9SF4/+*). Surviving adult flies were placed at 25°C and infected 5 days later with *K. pneumoniae*. These flies expressed high levels of *TM9SF4* (data not shown), but were much more sensitive than *Rev45* control flies and even *TM9SF4*¹ flies, to *K. pneumoniae* infection (data not shown).

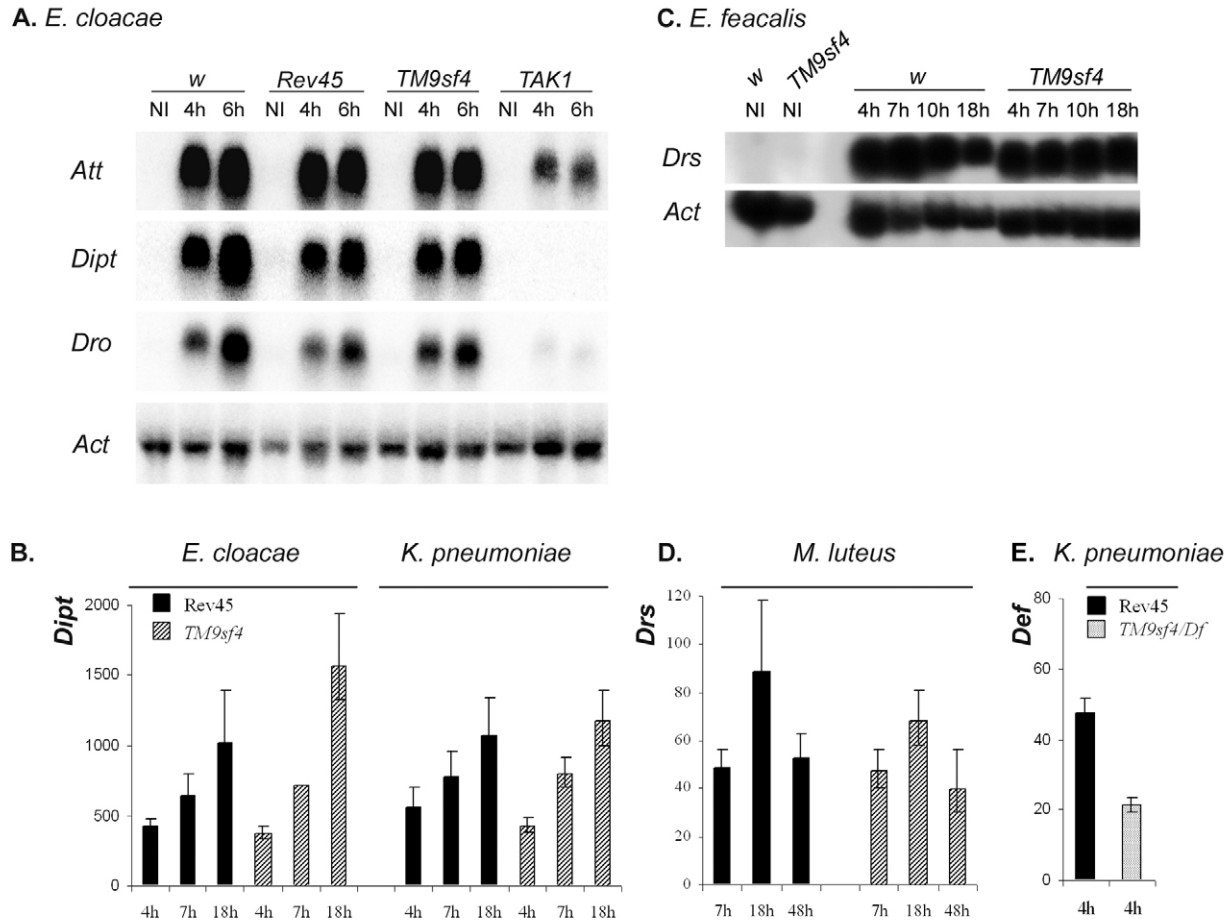


Fig. 4. Expression of genes encoding antimicrobial peptide is not affected in *TM9SF4* flies. (A,C) Expression of *Attacin* (*Att*), *Diptericin* (*Dipt*), *Drosocin* (*Dro*) and *Drosomyacin* (*Drs*) as indicated, and of *Actin* (*Act*) which served as a loading control, was detected by northern blot. Expression of *Diptericin*, *Drosomyacin* and *Defensin* (*Def*) by quantitative real-time PCR (B,D,E) was performed with total RNA isolated from 5- to 7-day-old flies. Control (*w¹¹¹⁸*, Rev45) or mutant [*TM9SF4*, *TM9SF4/Df(2L)b82a2*, *TAK1²*] flies were sacrificed before infection (NI) or at several time points (in hours) following infection. (A) Northern analysis of antimicrobial gene expression in *E. cloacae*-infected flies. Expression level of all antimicrobial encoding is similar in *TM9SF4* mutants compared with Rev45 flies. Note that, because of different genetic background, *w¹¹¹⁸* flies expressed slightly higher levels of antimicrobial peptides transcripts than Rev45 flies, although both strains displayed similar resistance to infection. (B) Quantitative analysis of *Diptericin* expression level in either *E. cloacae*- or *K. pneumoniae*-infected *TM9SF4* mutant and Rev45 control flies. (C) Northern analysis of *Drosomyacin* expression in *Enterococcus faecalis* *TM9SF4* mutant and *w¹¹¹⁸* (*w*) control infected flies. (D) Quantitative analysis of the expression level of *Drosomyacin* in *Micrococcus luteus*-infected flies. (E) Quantitative analysis of *Defensin* expression in Rev45 and *TM9SF4/Df(2L)b82a2* transheterozygous flies (*TM9SF4/Df*). These flies are deficient for *TM9SF4* and hemizygous for the *Defensin* locus. In B,D and E, results are expressed as the fold induction compared with non-infected flies. Post-infection times in hours are indicated below each histogram.

Increased sensitivity is probably due to the poor viability of *TM9SF4*-expressing flies. Indeed, *TM9SF4* ectopic expression might interfere with unknown signalling pathways as suggested by the observation that tissue-directed expression of *TM9SF4* induces strong morphogenesis defects (unpublished observations). Similarly, increased sensitivity was observed when *Rac2* was overexpressed in the haemocyte lineage (Avet-Rochex et al., 2007). These observations indicate that expression of *TM9SF4* must be finely tuned in phagocytic cells to preserve their function. Since Rev45 flies presented a wild-type phenotype (similarly to *w¹¹¹⁸* control flies) (Fig. 3A-C), the sensitivity of *TM9SF4* mutant flies is unlikely to be due to a background effect. In addition, transheterozygous flies *TM9SF4¹/Df(2L)b82a2*, where the deficiency includes the *TM9SF4* gene, presented a survival phenotype to *K. pneumoniae* infections similar to that of *TM9SF4¹* homozygous flies (Fig. 3F).

We then observed that bacterial growth is facilitated in mutant *TM9SF4* flies infected with *K. pneumoniae*. Indeed, bacterial numbers were greater in mutant *TM9SF4* flies compared with

control flies at 18 hours post infection (Fig. 3G). Therefore, sensitivity of *TM9SF4*-deficient flies was observed with Gram-negative pathogenic bacteria and this sensitivity is coupled to a higher bacterial growth rate.

NF- κ B-dependent immune signals are not affected in *TM9SF4*-deficient flies

Antimicrobial peptide production by fat body cells is a major mechanism contributing to bacterial clearance following fly infection and we therefore analysed whether immune signalling was affected in *TM9SF4* mutant flies. The activation of the Imd pathway was followed through the induction of *Attacin*, *Diptericin* and *Drosocin* (Georgel et al., 1993; Lemaitre et al., 1995; Levashina et al., 1998) and the activation of the Toll pathway, through the induction of *Drosomyacin* (Lemaitre et al., 1996). Northern blot analysis revealed a strong induction of *Attacin*, *Diptericin* and *Drosocin* in *TM9SF4* mutant flies, similarly to control flies, following infection with *E. coli*, *E. cloacae* or *K. aerogenes* (Fig. 4A, *E. cloacae*). As expected,

a strong inhibition of antimicrobial peptide gene expression was observed in *TAK1*² mutant flies (Fig. 4A). Additional quantitative real-time PCR analysis confirmed that no significant differences exist between Rev45 and *TM9SF4* mutant flies in the induction of *Diptericin* following infection by the Gram-negative bacteria *E. cloacae*, *K. pneumoniae* (Fig. 4B) or *E. coli* (not shown). Similarly, the Toll pathway was activated normally in *TM9SF4* mutants following infection by the Gram-positive bacteria *E. faecalis* (Fig. 4C) or *M. luteus* (Fig. 4D), resulting in the increased expression of *Drosomycin*. No significant changes in *TM9SF4* expression were observed in flies infected with *E. cloacae*, *K. pneumoniae* or *M. luteus*, suggesting that *TM9SF4* is not regulated at the transcriptional level by infection (data not shown).

Previous observations suggested that expression of the antimicrobial peptide encoding *Defensin* was particular in that it required normal haemocyte function (Brennan et al., 2007), raising the question whether *TM9SF4*, having defective haemocyte-dependent phagocytosis (see below), would be necessary for the induction of *Defensin* expression. Since genomic PCR analysis of the *TM9SF4*¹ chromosome revealed that the *Defensin* locus was absent in this strain (data not shown), we analysed *TM9SF4/Df(2L)b82a2* transheterozygous flies. These flies strongly induced *Defensin* expression following infection by *K. pneumoniae*, reaching half the level of control flies, as expected for *Defensin* hemizygous flies (Fig. 4E). This indicates that *TM9SF4* is not required for *Defensin* expression. Lack of *Defensin* expression in *TM9SF4*¹ homozygous flies is unlikely to be the cause for increased sensitivity to Gram-negative bacteria because *TM9SF4*¹/*Df(2L)b82a2* transheterozygotes showed a similar sensitivity to Gram-negative bacterial infection (Fig. 3F). In addition, *Defensin* is essentially active against Gram-positive bacteria in vitro (Rutschmann et al., 2002) and *TM9SF4*¹ homozygous flies resisted Gram-positive infection in the normal manner (Fig. 3D,E).

Our results demonstrate that activation of Toll and Imd immune signalling pathways by bacterial infection is not affected in *TM9SF4*-deficient flies, indicating that increased sensitivity of mutant flies to Gram-negative bacteria was not due to defective production of antimicrobial peptides.

TM9SF4 is required for haemocyte-dependent phagocytosis

In adult *Drosophila*, clusters of sessile haemocytes are present along the dorsal vessel on the anterior dorsal part of the abdomen. To assess engulfment of living bacteria by these cells, *TM9SF4* mutant and Rev45 flies were injected with GFP expressing *K. pneumoniae*. Less ingested fluorescence was observed in the clustered dorsal haemocytes in *TM9SF4* mutants compared with Rev45 flies at 3 hours post infection (arrowheads, Fig. 5A,B), suggesting that more bacteria escaped phagocytosis in mutant flies. Bacterial proliferation was detected in 20% of mutant flies as early as 5 hours post infection (arrows, Fig. 5D). In these flies, fluorescence was observed in the haemolymph and was also visualised in a drop of haemolymph bled from injured flies (not shown). This indicates that ingested bacteria do not multiply in phagocytic cells and that bacterial growth occurred extracellularly. In addition, haemocyte-associated fluorescence decreased both in Rev45 and *TM9SF4* mutant flies (arrowheads, Fig. 5D), indicating that bacteria were, most probably, properly killed by *TM9SF4* mutant haemocytes.

To quantify the phagocytosis defect of *TM9SF4* mutant haemocytes, circulating plasmatocytes from *TM9SF4* mutant or Rev45 third instar larvae were isolated and their ability to engulf fluorescent latex beads was observed. Mutant plasmatocytes

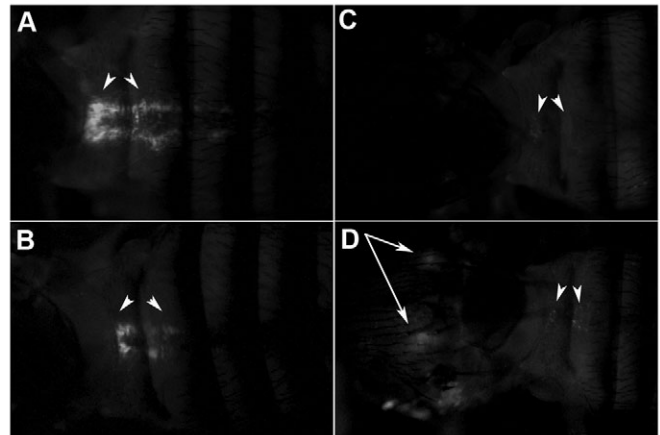


Fig. 5. In vivo engulfment of GFP-labelled *K. pneumoniae* by *Drosophila* haemocytes. Dorsal view of Rev45 (A,C) and *TM9SF4*¹ mutant (B,D) fly abdomen injected with GFP-expressing *K. pneumoniae* at 3 hours (A,B) and 5 hours (C,D) post injection time. Arrowheads in A–D indicate the position of clustered haemocytes. Arrows in D indicate extracellular fluorescence associated with haemolymph.

displayed a reduced number of internalised fluorescent beads (Fig. 6A). We further measured the phagocytosis index of FITC-labelled latex beads or *E. coli* or *S. aureus*, as described previously (Avet-Rochex et al., 2005; Pearson et al., 2003). *TM9SF4* plasmatocytes phagocytosed latex beads and *E. coli* two times less efficiently than wild-type cells, whereas phagocytosis of *S. aureus* was unaffected (Fig. 6B). By using the *sprGal4* driver line, *TM9SF4* expression was mainly induced in haemocytes (Crozatier et al., 2004) in either a Rev45 or a *TM9SF4* mutant context. Rescue of the phagocytosis defect was observed in mutant plasmatocytes expressing *TM9SF4* in larvae raised at 18°C (Fig. 6B). Our results indicate that *TM9SF4* is required for phagocytosis of hydrophilic particles and the Gram-negative bacteria *E. coli* by plasmatocytes, whereas it is dispensable for the internalisation of the Gram-positive bacteria *S. aureus*.

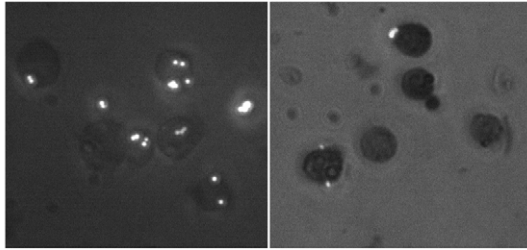
TM9SF4 is required for proper encapsulation of wasp eggs

Cellular immunity in *Drosophila* plays a major role against bigger pathogens such as parasitoids. To elucidate whether *TM9SF4* is involved in the cellular immune response against parasitisation, an encapsulation assay was performed on larvae parasitised by the avirulent *Leptopilina boulardi* wasp strain G486. When the avirulent wasp strain G486 parasitises *Drosophila* larvae a darkened cellular capsule is visible in the haemocoel 30–40 hours later. At room temperature (24°C) *w¹¹¹⁸* or Rev45 control larvae encapsulated the wasp eggs 88% and 79%, respectively, whereas only 48% of *TM9SF4* mutant larvae properly encapsulated and melanised foreign eggs (Fig. 6C). A stronger phenotype was observed by elevating the temperature in larvae first raised at 29°C before being parasitised. At this higher temperature, 86% of *w¹¹¹⁸* larvae and 76% of Rev45 larvae still properly encapsulated and melanised the wasp egg, yet only 13% of the homozygous *TM9SF4* mutant larvae properly encapsulated the egg (Fig. 6C). From this we conclude that *TM9SF4* is necessary for haemocytes to properly encapsulate *L. boulardi* eggs.

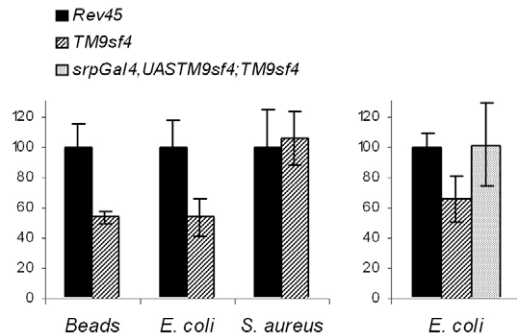
TM9SF4 mutant macrophages display defective lamellipodia and actin organisation

The first step of phagocytosis or encapsulation requires adhesion of phagocytes to the pathogen and strong cytoskeleton

A. Latex beads internalization



B. Phagocytic index (% of control)



C. Encapsulation assay (% of control)

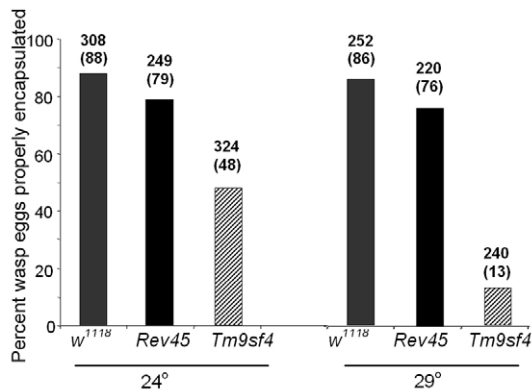


Fig. 6. *TM9SF4* mutant larval haemocytes have defective phagocytosis and encapsulation. (A) Circulating plasmatocytes were isolated from third instar larvae and incubated for 15 minutes with fluorescent latex beads. The internalisation of FITC-latex beads was observed following addition of quenching Trypan Blue solution. (B) Using the same procedure as in A, the internalisation rate of FITC-labelled beads or *E. coli* or *S. aureus*, was calculated as the number of internalised particles per haemocyte from 300–500 haemocytes. A phagocytic rate of 100% was attributed to control Rev45 cells in each experiment. The results are the mean \pm s.d. of three independent experiments. A significant difference (Student's *t*-test, $P < 0.03$) was found in phagocytic rate for latex beads and *E. coli*, but not *S. aureus* between Rev45 and *TM9SF4* mutant cells (left panel). Directed expression of *TM9SF4* mainly in the haemocyte lineage through the *srpGal4* driver line (*srpGal4/Y; TM9SF4¹; UASTM9SF4/+* larvae) partially rescued the phagocytic properties of circulating plasmatocytes (right panel) ($P < 0.01$, Student's *t*-test). (In this experiment, larvae were raised at 18°C.) (C) Encapsulation rate of control (*w¹¹¹⁸*, Rev45) and mutant (*TM9SF4*) larvae following wasp parasitisation. The total number of parasitised larvae examined is indicated on the top of each histogram, the number in parenthesis indicates the number of larvae presenting a dark capsule. Experiments were performed at 24°C and 29°C as indicated.

rearrangements to engulf or spread on it. Circulating plasmatocytes were isolated from *Drosophila* Rev45 control or *TM9SF4* mutant larvae, and their ability to spread on glass coverslips was studied

by reflection interference contrast microscopy (RICM). Unlike phase-contrast imaging (Fig. 7A,B), RICM allows visualisation of cell-substrate contact areas, which appear dark (Gingell and Owens, 1992; Pierres et al., 2003). Control Rev45 cells displayed wild-type cell-substrate contact area morphology: they spread isotropically, and a dark ring characteristic of a lamellipodium surrounded the cells after about 15–45 minutes, indicating a close contact of the cell circumference to the substrate (Fig. 7C). By contrast, *TM9SF4* plasmatocytes spread in an irregular manner and although large lamellipodium protrusions were clearly visible (Fig. 7D), the adhesive belt was absent (Fig. 7D, arrowhead) or severely disrupted. Instead, non-uniform white areas were often visible, representing portions of cells, at about 260 nm above the surface (Fig. 7D, arrow).

To further analyse their cytoskeleton organisation, circulating plasmatocytes from third instar larvae were labelled with Texas-Red-tagged phalloidin and examined by confocal microscopy. Control cells displayed a homogeneously sized surface and a round shape, as previously reported (Williams et al., 2007; Williams et al., 2006) (Fig. 7E–G). By contrast, *TM9SF4* mutant cells presented heterogeneous sizes and shapes and displayed disorganised frequently long actin spikes and punctate actin accumulation (Fig. 7H–J). Quantification of the area of the actin cytoskeleton network in close contact with the surface demonstrated that mutant cells had a 2.3-fold larger average size than control Rev45 cells. This indicates that mutant cells displayed increased spreading on the substrate (Fig. 7K). Expressing *TM9SF4* cDNA in mutant plasmatocytes partially reduced the extent of the cytoskeleton network, because these cells possessed a 1.34-fold larger average surface area compared with Rev45 cells (Fig. 7K). Our observations demonstrate that the nonaspanin *TM9SF4* may control cell adhesion, cell shape and signalling to the actin cytoskeleton.

TM9SF4 and *TM9SF2* contribute to bacterial phagocytosis in *Drosophila* S2 cells

Drosophila S2 cells are derived from a primary culture of late-stage embryos (Schneider, 1972). They express macrophage-specific markers, such as the two phagocytic receptors dSR-CI and Eater, and can bind and engulf particles (Kocks et al., 2005; Ramet et al., 2001). To assess functional redundancy of nonaspanins in bacterial phagocytosis, we evaluated the effect of inactivating *TM9SF4* and *TM9SF2*, either alone or in combination. Both genes are constitutively expressed in S2 cells (data not shown) and were inactivated by silencing RNAs (siRNA) as described (Clemens et al., 2000). An equivalent reduction in phagocytosis of FITC-labelled *E. coli* was observed in *TM9SF4*- or *TM9SF2*-silenced cells, presenting an internalisation rate of 53% and 57%, respectively, compared with levels in wild-type cells (Fig. 8A). This phagocytosis rate was reduced to 38% when both genes were silenced. For comparison, cells treated with siRNA targeting *PGRP-LC*, which encodes a receptor protein required for Gram-negative bacteria internalisation by S2 cells (Ramet et al., 2002), exhibited a phagocytosis rate of FITC-labelled *E. coli* of 34% compared with that in control cells (Fig. 8A). No significant inhibition of FITC-labelled *S. aureus* internalisation was observed in *TM9SF4* silenced S2 cells (Fig. 8B). By contrast, *TM9SF2* silencing provoked a reduction of the phagocytosis rate of FITC-labelled *S. aureus* to 56% that of control cells. This inhibition was significantly increased, leading to a phagocytosis rate of 32%, when *TM9SF4* was co-silenced with *TM9SF2*, suggesting that *TM9SF4* contribution to *S. aureus*

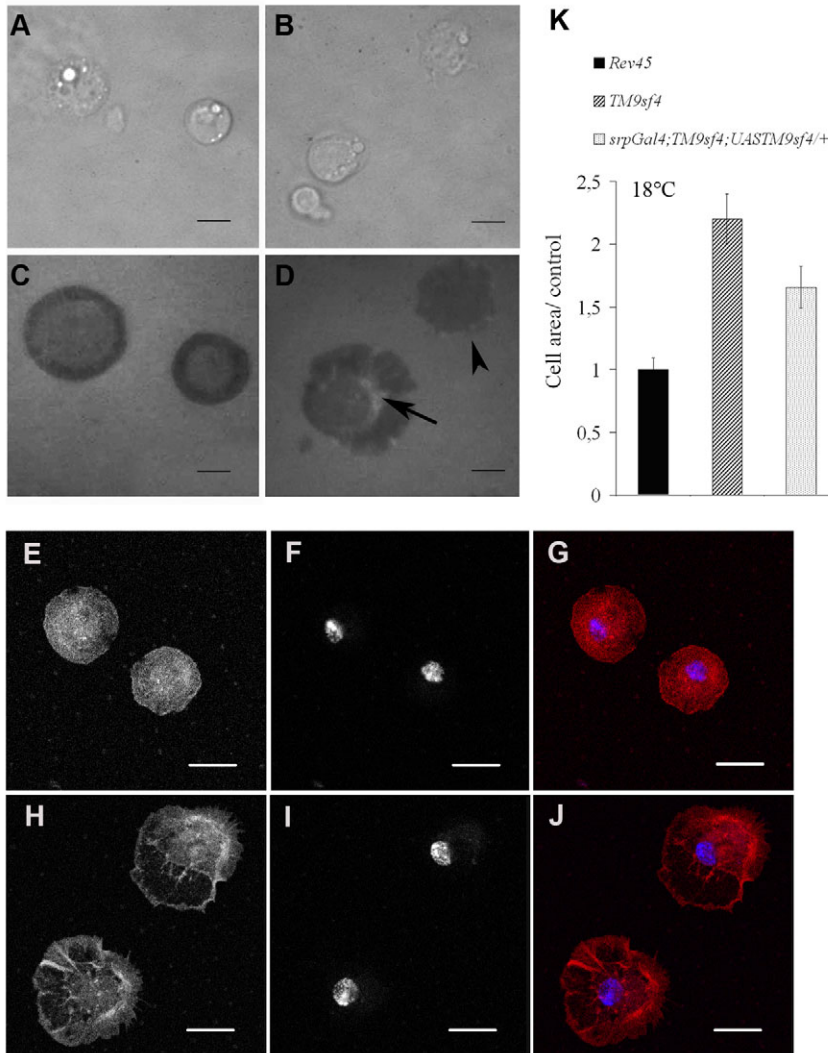


Fig. 7. Impaired lamellipodia formation and defective actin reorganisation in *TM9SF4* mutant macrophages. Circulating plasmatocytes were isolated from wild-type (A,C) or mutant *TM9SF4* (B,D) third instar larvae and allowed to spread for 15 minutes in a glass coverslip chamber. (A,B) Phase contrast. (C,D) Reflection interference contrast microscopy. Arrowhead indicates the loss of adhesive belt; arrow indicates the white area that represents more distant contacts. (E–I) Confocal analysis of actin network in isolated larval macrophages. Texas-Red-phalloidin fluorescent labelling revealed polymerised actin (E,H) and nuclei were stained with Hoechst 33258 (F,I); overlays are shown in G,J. Control cells are regularly sized and round (E–G), whereas most *TM9SF4* mutant cells have a larger area and differentiate long actin-stained filopodia (H–J). (K) The surface of the cytoskeleton network was calculated from 500–1000 cells. Mutant *TM9SF4* cells were 2.3-fold larger than Rev45 control cells ($P < 0.0001$, Student's *t*-test). Cell size was partially rescued by expression of *TM9SF4* cDNA in the haemocyte lineage. A significant difference between *TM9SF4* mutant and *srpGal4; TM9SF4; UAS-TM9SF4/+* rescued plasmatocytes was found ($P < 0.004$, Student's *t*-test) (larvae raised at 18°C). Scale bars: 10 μ m.

engulfment was masked by redundancy with TM9SF2. Silencing Dscar, a component of the cytoskeleton required for the phagocytic process of both types of particles (Pearson et al., 2003) resulted in a strong, although not complete, reduction of phagocytosis of both FITC-labelled *E. coli* (22%) and FITC-labelled *S. aureus* (37%) (Fig. 8A,B). Our results show that the two nonaspanins TM9SF2 and TM9SF4 are both required for bacterial phagocytosis by *Drosophila* cultured cells and possess partial functional redundancy in this process.

antimicrobial peptide genes by fat body cells, were not affected in *TM9SF4* mutant flies, which is consistent with the fact that these mutant flies were not as sensitive as *TAK1* mutant flies to Gram-negative pathogenic bacteria and resisted non-pathogenic strains. In an independent large siRNA screen performed in cultured *Drosophila* S2 cells, *TM9SF4* (CG7364) was also shown to be required for the internalisation of the yeast *Candida albicans* (Stroschein-Stevenson et al., 2006). In fact, we observed that *TM9SF4* mutant flies were sensitive to *C. albicans* infections (E.B.

Discussion

TM9SF4 function in cell adhesion and haemocyte-dependent phagocytosis is coupled to cytoskeleton defects

The function of the nonaspanin Phg1A in bacterial phagocytosis and cell adhesion was first demonstrated in the free-living amoeba *Dictyostelium* (Benghezal et al., 2003; Cornillon et al., 2000). Here, we show that these functions are conserved throughout evolution because *DPhg1A/TM9SF4* mutant circulating plasmatocytes isolated from *Drosophila* third instar larvae presented defective phagocytosis of latex beads and *E. coli*, two types of particles that were very poorly internalised by mutant amoeba. In addition, as observed by RISM, *Drosophila TM9SF4* mutant macrophages have a severely disrupted adhesive belt compared with control cells, which displayed a regular lamellipodium around the entire cell circumference. In *PHG1A* mutant amoeba, no cytoskeleton defects were reported (Cornillon et al., 2000). By contrast, in *Drosophila TM9SF4* mutant macrophages, defects in cell adhesion and phagocytosis were coupled with an abnormal actin cytoskeleton: whereas control cells presented a wild-type round shape, mutant macrophages presented disorganised actin staining and actin spikes. Interestingly similar actin spike phenotypes were described in S2 *Drosophila* cells following silencing of actin regulatory proteins such as Dscar (Kunda et al., 2003; Pearson et al., 2003). Our study thus indicates that *TM9SF4* function in cell adhesion and phagocytosis might result from defective signalling in the control of actin reorganisation during cell attachment.

TM9SF4 requirement in host cellular immunity

When infected with pathogens, *TM9SF4* mutant flies were sensitive to the Gram-negative pathogenic bacteria but they resisted Gram-positive bacteria as well as wild-type flies did. Interestingly, *TM9SF4* mutant plasmatocytes were specifically defective for the internalisation of the Gram-negative bacteria *E. coli*, whereas no defects were observed in the internalisation of the Gram-positive bacteria *S. aureus*, putatively because of redundancy with TM9SF2 in this process (see below). Therefore, sensitivity of *TM9SF4* flies to Gram-negative bacteria might be correlated with defective phagocytosis. Supporting this hypothesis, the activation of the two NF- κ B-dependent pathways, Toll and Imd, controlling the activation of the

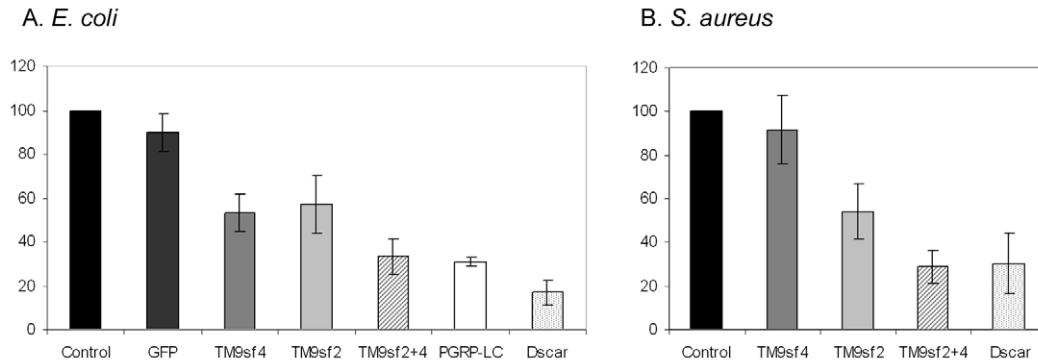


Fig. 8. TM9SF2 and TM9SF4 are required for phagocytosis in S2 cells. S2 cells were untreated (Control) or treated for 3 days with siRNA GFP (Green fluorescent protein), *TM9SF4*, *TM9SF2*, *PGRP-LC* or *Dscar*, either alone or in combination (TM9SF2+4), as indicated. Cells were then incubated for 10 minutes with FITC-labelled *E. coli* (A) or FITC-labelled *S. aureus* (B) and the internalised fluorescence was measured in the presence of external Trypan Blue quenching solution. The phagocytosis index was quantified as the percentage of fluorescence-positive cells multiplied by the mean fluorescence of these cells. We counted 10,000–20,000 cells from each sample. A phagocytosis index of 100% was attributed to control cells. The results presented are the mean \pm s.d. of three experiments. Significant differences were observed using Student's *t*-test between: (A) TM9SF4 and control ($P < 0.003$), TM9SF2 and control ($P < 0.02$), PGRP-LC and control ($P < 0.001$), Dscar and control ($P < 0.001$); and (B) TM9SF2 and control ($P < 0.001$), TM9SF2+4 and TM9SF2 ($P < 0.05$), Dscar and control ($P < 0.001$).

and J.P., unpublished results) suggesting that the correlation between defective phagocytosis and sensitivity to infection extends to another kind of pathogen which provokes severe infections in humans.

Finally, we showed that encapsulation of wasp eggs was partially impaired in *TM9SF4* mutant larvae and that this defect was increased at elevated temperature (29°C). Since lamellocytes differentiate and are present in the haemolymph, the adhesion defects of *TM9SF4*-null plasmatocytes might account for the reduced encapsulation rate of parasitoid eggs. Indeed, partial loss of function of the adhesion receptor β -integrin in *mys* mutant larvae is sufficient to induce temperature-sensitive encapsulation defects (Irving et al., 2005). Since *TM9SF4*¹ is a null allele, the temperature-sensitive phenotype of *TM9SF4* mutant flies might be an indirect consequence of increased cell adhesion defects at elevated temperature, because of loss or instability of cell surface proteins, such as integrins. In amoebae, the *PHG1A*-null mutant also displayed a temperature-sensitive phenotype (Benghezal et al., 2003). As is the case for *Dictyostelium*, removing both TM9SF2 and TM9SF4 will be required in *Drosophila* in the future to strengthen the phenotype and further elucidate the physiological causes for phagocytosis and encapsulation defects.

TM9SF2 and TM9SF4 contribute to phagocytosis in S2 cells

TM9SF4 was also required in *Drosophila* S2 cells for efficient internalisation of *E. coli*, but not *S. aureus*. By contrast, TM9SF2 was required for the internalisation of both types of bacteria in these cells, indicating that TM9SF2 and TM9SF4 are only partially redundant. When compared with silencing either *TM9SF2* or *TM9SF4* alone, silencing both *TM9SF2* and *TM9SF4* resulted in a modest enhancement of the phagocytosis defect in the case of *E. coli*, whereas a significant enhancement was observed in the case of *S. aureus*. This suggests that TM9SF4 is necessary in *S. aureus* internalisation but that this function was masked in mutant cells by redundancy with TM9SF2. Specificity towards pathogens depends on primary events such as bacterial recognition, whereas downstream events, such as cytoskeleton reorganisation, might be equally required for every type of particle. It is thus probable that the two proteins play redundant and non-redundant functions in both the intracellular mechanisms underlying phagocytosis and the

mechanisms underlying bacterial recognition, such as expression of pathogen-recognition receptors (PRRs) at the cell surface. In support of this hypothesis, it was previously established in *Dictyostelium* cells that TM9 proteins are most probably not recognition molecules by themselves, but contribute to the expression of cell surface proteins (Benghezal et al., 2003). Further analysis of cell surface protein expression in single and double TM9SF2- and TM9SF4-knockout cells will be required to explore the specific involvement of TM9SF2 and TM9SF4 in cell adhesion and phagocytosis.

Materials and Methods

Stocks

Flies were raised on standard culture medium at 25°C unless indicated otherwise. The following stocks were from the *Drosophila* Bloomington Stock Center: *w*;P{lacW}CG7364^{k07245}/CyO and *w*;Df(2L)b82a2 (BL#6072), which deletes the interval [34D1–34E5] including the *TM9SF4* locus, which we verified by RT-PCR (not shown). Mutant *dTAK1*² and *Key*¹ were from Bruno Lemaitre. The lethal *l(2)k0724* mutation was not attributable to the P{lacW}CG7364^{k07245} insertion since transheterozygous flies P{lacW}CG7364^{k07245}/Df(2L)b82a2 were semi-viable. The cryptic lethal mutation was removed by outcrossing P{lacW}CG7364^{k07245} flies over three generations with a *w*¹¹¹⁸ strain. Remobilisation of the P{lacW}CG7364^{k07245} was performed following standard procedures (Robertson et al., 1988). Imperfect excisions were screened by PCR analysis of the sequence flanking the insertion site with forward primer: (7AVTP sens) 5'-TTAAGCCGCAAAGGAAAGGAAATGT-3' and reverse primer (fasta as) 5'-CTAAAACGCAACGCTCACGCTCCTG-3'. One deletion was recovered among 160 independently excised lines analysed.

Survival rate experiments and bacterial growth in vivo

E. coli 1106, *A. tumefaciens*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (PAO1) were used as Gram-negative bacterial strains. *S. aureus* and *E. faecalis* and *M. luteus* were used as Gram-positive strains. All strains were grown on standard Luria-Broth media (LB) over night at 37°C except *A. tumefaciens* (30°C). A pellet from 50 ml overnight cultures was used to infect flies, except in the case of *P. aeruginosa* for which an exponential phase culture diluted to OD₆₀₀=0.4 was used (to reach an approximate multiplicity of infection of 50 bacteria per fly). For septic infection, 30 adult male flies 5–7 days old were pricked in the upper part of the thorax with a thin needle previously dipped into the bacterial pellet. Oral infections were conducted as described (Avet-Rochex et al., 2005). Results are expressed as percentage of surviving infected flies at different time points following infection. Experiments were repeated at least three times with results similar to those presented.

The multiplication of bacteria during *Drosophila* infection was quantified as described (Fauvarque et al., 2002): at each time point, 10 infected flies were harvested in Eppendorf tubes kept on ice and grounded with Teflon pestle. The homogenate was suspended in LB medium (400 μ l) and centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm. Supernatants were serially diluted in LB and spread on LB plates.

Northern blotting and RT-PCR

Total RNAs were extracted from adult flies using RNA^{plus} from QBiogene. Northern blots (15 µg RNA/lane) were probed with a ³²P-labelled fragment of *TM9SF4* cDNA (2619 bp) or Dipterin (1000 bp) or Drosocin (759 bp) or Drosomycin (376 bp), and with actin as an internal loading control (1239 bp). For the RT-PCR, total RNA were similarly extracted either from a pool of 10⁶ S2 cells or from circulating plasmatocytes isolated from eighth instar larvae. One µg of total RNAs were submitted to a DNase digestion step [DNA-freeTM kit (Ambion, Inc.)] and the amplification was performed according to the manufacturer's instructions [Titanium One-Step RT-PCR kit (BD Biosciences)]. Primers were as follows: *TM9SF4* forward, 5'-GAGGTGCGGATGAACCAGCAGGTCA-3'; reverse, 5'-CTGGACATCGGCATGCCAAGGTAG-3'; Actin forward, 5'-ACCGCGTGCAGTTTTCCTTCTA-3'; reverse, 5'-TATGGTTTGTCTATGCGTCGTGA-3'. Controls were run with no reverse transcriptase. Amplified cDNA were either visualised by ethidium bromide staining on agarose gel, or transferred onto nitrocellulose by Southern blot and probed with a *TM9SF4*-specific probe.

For real-time PCR analysis, cDNAs were synthesised with AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene). An amount of cDNA equivalent to 500 ng to 1 µg of total RNA was subjected to 40 cycles of PCR amplification consisting of a 10 second incubation at 95°C and 30 seconds at 60°C. Output was monitored using SYBR Green core reagents and the Mx3000P instrument (Stratagene). All the results were normalised to the *rpl32* RNA level. The primer sequences used were: *Diptericin* forward, 5'-ACTTTGCTGCGCAATCGTCTTAC-3', *Diptericin* reverse, 5'-TCCCTGAAGATTGAGTGGTACTG-3'; *Rpl32* forward, 5'-AAGAAGTTCCTGGTGCACAACGTG-3'; *Rpl32* reverse, 5'-AATCTCCTTGGCCTTCTTGAGGA-3'; *Drosomycin* forward, 5'-AAGTACTTGTTCGCCCTTTCGCT-3'; *Drosomycin* reverse, 5'-CCTGTATCTCCGACAGGACAGT-3'; *Defensin* forward, 5'-TTCTTCGTCTCGTGGCTATCGCT-3'; *Defensin* reverse, 5'-ACCAGGACATGATCCTCTGGAATTGG-3'; *TM9SF4* forward, 5'-AGTCTCGTCCAGC-TGCAGAAATCA; *TM9SF4* reverse, 5'-AGTTAGCTCACATGGCTGAGTCGT-3'.

In vivo and ex vivo phagocytosis tests on isolated third instar larval plasmatocytes

In vivo phagocytosis test was performed by injecting living GFP-expressing *K. pneumoniae* into the fly thorax. The phagocytosis of bacteria by the blood cells concentrated in the dorsal vessel was then observed using a Leica MZ FLIII dissecting microscope and photographs were taken using a numeric camera (LEICA, DC300F). For ex vivo phagocytosis tests, larval circulating plasmatocytes were obtained from eighth larvae by gently ripping the larval cuticle near the posterior end and plasmatocytes were left to attach to microplaque wells for 2 minutes. Ex vivo phagocytosis monitoring was then performed essentially as described (Avet-Rochex et al., 2005; Pearson et al., 2003).

Wasp infection

The encapsulation assay was done according to published methods (Sorrentino et al., 2002). Briefly, 2 days before parasitisation, the appropriate fly strains were crossed and kept at 21–25°C. Four or five females of *L. bouhardi* G486 were allowed to infest at room temperature for 2 hours, after which the *Drosophila* larvae were transferred to apple juice plates and left at room temperature for 40–42 hours. After this time, the larvae were collected, washed in PBS, and then viewed under a stereomicroscope for the presence of a dark capsule. Larvae in which no dark capsule was observed were dissected in 20 µl PBS to determine whether they had been parasitised. Larvae containing eggs from the parasitoid that had not darkened by this time were scored as non-encapsulated. Non-parasitised larvae were excluded from the count.

RICM and Phalloidin staining on isolated third instar larvae plasmatocytes

To visualise cell-substrate contact areas, haemocytes were bled from larvae into 300 µl Schneider medium (Invitrogen) and allowed to attach to a coverslip glass chamber (LAB-TEK Nalge Nunc International). Before use, the glass chamber was previously washed with 14.5 M NaOH for 5 minutes, and rinsed thoroughly with deionised water. Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) was performed on an inverted Olympus IX71 microscope, selecting the 546 nm peak of the episcopic mercury lamp by a combination of interference and blue-green filters and illuminating through an episcopic cube. The image of the field diaphragm was used to focus at the glass-liquid interface. Light intensity was reduced 100-fold with neutral density filters. RICM images were recorded by an intensified cooled CCD video camera (Photonic Science, UK) controlled by Image Pro Plus software (MediaCybernetics). In addition, cells were also imaged by transilluminating phase-contrast microscopy to localise the cell body. Cells extend lamellipodia after close contact with the glass substrate in about 15 minutes, which are stable for at least 45 minutes. These experiments were reproduced three times with comparable results.

To visualise filamentous actin, haemocytes were bled from larvae into 700 µl Schneider medium (Invitrogen) and allowed to attach to a CC2 glass slide (LAB-TEK Nalge Nunc International) for 1 hour. The cells were fixed at room temperature directly in medium for 5 minutes with 16% paraformaldehyde/PBS (3.7% final), washed twice for 5 minutes with PBS, then once for 5 minutes with PBST (PBS/0.1% Triton X-100), and twice for 5 minutes with PBS. The cells were then stained for 40

minutes at room temperature with Texas-Red-phalloidin (Invitrogen) diluted to a final concentration of 10 U in PBS/1% BSA. Cells were then washed twice for 5 minutes with PBS, once for 3 minutes with PBS containing Hoechst 33258 (1 µg/ml) and mounted using FluorSave (Calbiochem). Samples were analysed by confocal laser-scanning microscopy, using a Leica TCS-SP2 operating system. Texas Red and Hoechst 33258 fluorescence were excited by using the 543 nm line of an helium-neon laser and a 405 nm diode, respectively. Fluorescence emission was collected from 570–650nm for Texas Red, and from 420–480nm for Hoechst 33258.

The extent of the actin cytoskeleton network in close contact with the glass substrate was measured using the Image Pro Plus software. The background of the fluorescence images was flattened by spatial filtration (0.5 µm⁻¹) and the resulting images were segmented to determine the contours of the actin cytoskeleton network of each cell. Cells in contact with the image borders were not taken into account. For each genotype, 500–1000 cells were counted. The error on the average area was calculated as the s.d. divided by the square root of the number of cells examined. One representative experiment of three is shown.

Cell culture and FACS analysis

Drosophila S2 cells were maintained in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (all from Invitrogen). Gene inactivation was obtained by incubating 15 µg double strand RNA (RNAi) for 72 hours at 26°C with 10⁶ S2 cells cultured in six-well tissue culture plates (Clemens et al., 2000). DNA templates were generated by PCR using the primers specific for each target gene: Dscar forward, 5'-taatacagactactatagggGCATGTGGCCCGCTCCGTGTATCAG-3'; Dscar reverse, 5'-taatacagactactatagggCCATGGAATTCGGTGTGCGGTAGA-3'; GFP forward, 5'-taatacagactactatagggagaccaGTATAGTTCATCCATGCCATGTG-3'; GFP reverse, 5'-taatacagactactatagggagaccaGGAGAAGAACTTTCACTGGATTG-3'; TM9SF4 forward, 5'-taatacagactactatagggGGAGAGACGCAGCATATATTT-3'; TM9SF4 reverse, 5'-taatacagactactatagggTCGCGACCCTTCATTGTT-3'; TM9SF2 forward, 5'-taatacagactactatagggCCCCTGGAGAACGGAAGCAATAC-3'; TM9SF2 reverse, 5'-taatacagactactatagggCCCCTGGAGAACGGAAGCAATAC-3'; PGRP-LC forward, 5'-taatacagactactatagggGACCAAGATCGGGGAC-3'; PGRP-LC reverse, 5'-taatacagactactatagggGCTTATCCCGAACGTCAC-3'.

Purified PCR products were used as DNA templates for in vitro transcription of RNA using the MEGAscript RNAi kit (Ambion). Flow-cytometry-based phagocytosis assays were performed as described (Ramet et al., 2002). Briefly, S2 cells were incubated for 10 minutes at 26°C with FITC-labelled particles and flow cytometry was used to analyse the ability internal fluorescence rate produced by internalised *E. coli* (K-12 strain) BioParticles FITC and *S. aureus* (Wood strain without protein A) BioParticles FITC (Molecular Probes). The samples were analysed using the CELLQuest program (Becton Dickinson).

We thank Marie-Claire Joseph for fly food and stocks maintenance, Véronique Collin for help in FACS analysis, Chrystel Pic and Fanny Decarpenterie who participated to this work as rotating students, Marie Meister, Michèle Crozatier, Marie Gottar, Nicolas Doll and Jacques Montagne for advice and stimulating discussions. We thank Michel Satre and Jacques Baudier for their support as former and present laboratory supervisors, respectively. We thank Dominique Ferrandon for sending bacterial strains, Bruno Lemaître and the Bloomington Stock Center for sending flies. This work was supported by grants from the Région Rhône-Alpes ('Emergence' program in 2005 including an 'Allocation Doctorale de Recherche' to J.P. and 'Clusters de Recherche' program in 2006). P.C. and M.O.F. are part of the NEMO network supported by the 3R Foundation (www.forshung3r.ch).

References

- Avet-Rochex, A., Bergeret, E., Attree, I., Meister, M. and Fauvarque, M. O. (2005). Suppression of *Drosophila* cellular immunity by directed expression of the ExoS toxin GAP domain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell. Microbiol.* **7**, 799–810.
- Avet-Rochex, A., Perrin, J., Bergeret, E. and Fauvarque, M. O. (2007). Rac2 is a major actor of *Drosophila* resistance to *Pseudomonas aeruginosa* acting in phagocytic cells. *Genes Cells* **12**, 1193–1204.
- Bagshaw, R. D., Mahuran, D. J. and Callahan, J. W. (2005). A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 133–143.
- Benghezal, M., Cornillon, S., Gebbie, L., Alibaud, L., Bruckert, F., Letourneur, F. and Cosson, P. (2003). Synergistic control of cellular adhesion by transmembrane 9 proteins. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2890–2899.
- Benghezal, M., Fauvarque, M. O., Tournebise, R., Froquet, R., Marchetti, A., Bergeret, E., Lardy, B., Klein, G., Sansonetti, P., Charette, S. J. et al. (2006). Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cell. Microbiol.* **8**, 139–148.
- Butler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**, 845–859.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. and Perrimon, N. (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol.* **44**, 635–654.

- Brennan, C. A., Delaney, J. R., Schneider, D. S. and Anderson, K. V. (2007). Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr. Biol.* **17**, 67-72.
- Chluba-de Tapia, J., de Tapia, M., Jaggin, V. and Eberle, A. N. (1997). Cloning of a human multispanning membrane protein cDNA: evidence for a new protein family. *Gene* **197**, 195-204.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A. and Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6499-6503.
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 34287-34292.
- Crozatier, M. and Meister, M. (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cell. Microbiol.* **9**, 1117-1126.
- Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol.* **2**, E196.
- Diaz, E., Schimmoller, F. and Pfeffer, S. R. (1997). A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J. Cell Biol.* **138**, 283-290.
- Erickson, D. L., Lines, J. L., Pesci, E. C., Venturi, V. and Storey, D. G. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect. Immun.* **72**, 5638-5645.
- Fauvarque, M. O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M. and Attree, I. (2002). Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb. Pathog.* **32**, 287-295.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 862-874.
- Froquet, R., Cherix, N., Birke, R., Benghezal, M., Cameroni, E., Letourneur, F., Mosch, H. U., De Virgilio, C. and Cosson, P. (2008). Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and dictyostelium. *J. Biol. Chem.* **283**, 6764-6772.
- Georgel, P., Meister, M., Kappler, C., Lemaitre, B., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1993). Insect immunity: the dipterin promoter contains multiple functional regulatory sequences homologous to mammalian acute-phase response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 508-517.
- Gingell, D. and Owens, N. (1992). How do cells sense and respond to adhesive contacts? Diffusion-trapping of laterally mobile membrane proteins at maturing adhesions may initiate signals leading to local cytoskeletal assembly response and lamella formation. *J. Cell Sci.* **101**, 255-266.
- Goto, A., Kadowaki, T. and Kitagawa, Y. (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev. Biol.* **264**, 582-591.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C. and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval hemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.* **7**, 335-350.
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M. et al. (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* **123**, 335-346.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V. and Baum, B. (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr. Biol.* **13**, 1867-1875.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **230**, 243-257.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 697-743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B. and Imler, J. L. (1998). Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J. Mol. Biol.* **278**, 515-527.
- Pearson, A. M., Baksa, K., Ramet, M., Protas, M., McKee, M., Brown, D. and Ezekowitz, R. A. (2003). Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* **5**, 815-824.
- Pierres, A., Eymeric, P., Baloch, E., Touchard, D., Benoliel, A. M. and Bongrand, P. (2003). Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys. J.* **84**, 2058-2070.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M. and Ezekowitz, R. A. (2001). *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**, 1027-1038.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. and Ezekowitz, R. A. (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**, 644-648.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K. and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 461-470.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y. and Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112**, 135-142.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A. and Ferrandon, D. (2000). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat. Immunol.* **1**, 342-347.
- Rutschmann, S., Kilinc, A. and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* **168**, 1542-1546.
- Schimmoller, F., Diaz, E., Muhlbauer, B. and Pfeffer, S. R. (1998). Characterization of a 76 kDa endosomal, multispanning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. *Gene* **216**, 311-318.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**, 353-365.
- Singer-Kruger, B., Frank, R., Crausaz, F. and Riezman, H. (1993). Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 14376-14386.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y. and Govind, S. (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* **243**, 65-80.
- Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H. and Johnson, A. D. (2006). Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* **4**, e4.
- Sugasawa, T., Lenzen, G., Simon, S., Hidaka, J., Cahen, A., Guillaume, J. L., Camoin, L., Strosberg, A. D. and Nahmias, C. (2001). The iodycyanopindolol and SM-11044 binding protein belongs to the TM9SF multispanning membrane protein superfamily. *Gene* **273**, 227-237.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M. and Lemaitre, B. (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev.* **15**, 1900-1912.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. and Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11414-11419.
- Williams, M. J. (2007). *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* **178**, 4711-4716.
- Williams, M. J., Ando, I. and Hultmark, D. (2005). *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* **10**, 813-823.
- Williams, M. J., Wiklund, M. L., Wikman, S. and Hultmark, D. (2006). Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J. Cell Sci.* **119**, 2015-2024.
- Williams, M. J., Habayeb, M. S. and Hultmark, D. (2007). Reciprocal regulation of Rac1 and Rho1 in *Drosophila* circulating immune surveillance cells. *J. Cell Sci.* **120**, 502-511.
- Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. and Hultmark, D. (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14192-14197.
- Zhuang, S., Kelo, L., Nardi, J. B. and Kanost, M. R. (2007). An integrin-tetraspanin interaction required for cellular innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **282**, 22563-22572.

Annexe 5**Les Ubiquitin Binding Domains (UBDs)**

UBD	Domaine (patch) de l'ubiquitine interagissant avec l'UBD	K _d	Longueur du domaine UBD en acides aminés	Exemples de protéines contenant l'UBD
UBA	Ile ⁴⁴	10 à 500µM (mono-Ub) ~30nM (poly-Ub)	45 à 55	Dsk2; Rad23; hHR23A; Mud; Ede1; NEMO
CUE	Ile ⁴⁴ (plus Leu ⁸ et Ile ³⁶ pour Vsp9)	20 à 160µM	42 à 43	Vps9; Cue2; Tollip
GAT	Ile ⁴⁴	180 à 410µM	~135	GGA1; GGA3; TOM1; TOM1L1
UIM	Ile ⁴⁴	70 à 1700µM	~20	Vps27; S5A; Eps15; Epsin1/2; Ent1/2;
DUIM	Ile ⁴⁴	~200µM	2 x ~20	Hrs
MIU	Ile ⁴⁴	~30µM	~20	Rabex-5
VHS	Inconnu	Inconnu	~150	STAM
NZF	Ile ⁴⁴	100 à 400µM	~35	Npl4; TAB2/3; Vps36
UEV	Ile ⁴⁴ et Gln ⁶²	100 à 500µM	~145	Vps23, Tsg101
Ubc = E2	Liaison thioester entre un résidu cystéine conservé de l'Ubc et l'Ub	~300µM	~150	UbcH5
GLUE	Inconnu	430 à 490µM	~135	Vps36; Eap45
Jab1/MPN	Ile ⁴⁴	~380µM	Inconnu	Prp8p
PFU	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Doa1
A20-ZnF	Asp ⁵⁸	12 à 22µM	Inconnu	Rabex-5
ZnF-UBP = PAZ	Ile ³⁶	~3µM	~130	HDAC6; Isopeptidase T
UBM	Leu ⁸	~180µM	~30	Famille Y de DNA polymérase
UBZ	Inconnu	Inconnu	~30	Famille Y de DNA polymérase

Tableau 6. Les Ubiquitin Binding Domains (UBDs) et leurs caractéristiques. Les valeurs des K_d (constante de dissociation) sont données pour la mono-ubiquitine sauf spécification. *D'après Hurley et al., 2006.*

Signification des abréviations:

A20-ZnF	A20 Zinc-Finger
CUE	Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation
DUIM	Double-sided UIM
GAT	GGA (Golgi-localized, Gamma-ear-containing, ADP-ribosylation-factor-binding protein) And TOM (Tagget Of Myb)
GLUE	Gram-Like Ubiquitin-binding in Eap45
MIU	Motif Interacting with Ubiquitin
NZF	Npl4 Zn-F
PAZ	Polyubiquitin-Associated Zinc binding
PFU	PLAA Family Ubiquitin binding
UBA	Ubiquitin Associated
Ubc	Ubiquitin conjugating enzyme
UBM	Ubiquitin-Binding Motif
UBZ	Ubiquitin-Binding ZnF
UEV	Ubc E2 Variant
UIM	Ubiquitin-Interacting Motif
VHS	Vps (vacuolar sorting protein) 27/Hrs/STAM
ZnF-UBP	Zinc-Finger-Ubiquitin-Binding domain

Identification des « Ubiquitin Specific proteases » impliquées dans la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile

Chez les mammifères, les voies d'activation des facteurs de transcription NF-kappaB (NF-κB) sont impliquées dans la survie cellulaire et l'inflammation. Leur dérégulation est souvent associée à des pathologies inflammatoires chroniques et à des cancers. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'identifier de nouveaux régulateurs négatifs des voies NF-κB conservées au cours de l'Evolution, Toll et Imd, chez la mouche *Drosophila melanogaster*.

De nombreux éléments des voies NF-κB voient leur stabilité ou leur activité régulée par la liaison de monomères ou de polymères d'ubiquitine. Les « Ubiquitine Specific Proteases » (USPs) constituent ainsi un nouveau champ d'investigation pour rechercher des régulateurs de ces voies. J'ai établi une collection d'ARN interférents pour inactiver chacune des 21 USPs de drosophile en cellules S2. Le crible de cette collection a mis en évidence trois régulateurs négatifs de la voie Imd, dont un montre également une activité sur la voie Toll. Le faible nombre de candidats détectés suggère une grande spécificité de cible pour les USPs. Parmi ces candidats, dUSP36, un homologue de la protéine humaine USP36, avait été préalablement sélectionné par un crible génétique au laboratoire. Des études de l'équipe auxquelles j'ai contribué, montrent son rôle *in vivo* dans la régulation négative de la protéine adaptatrice Imd via son activité catalytique. Afin de caractériser la fonction des deux autres USPs, j'ai mené des expériences de transgénèse chez la drosophile qui prouvent que ces deux USPs répriment la voie Imd en cas d'infection et qu'elles sont requises pour maintenir l'état inactif de la voie Imd en l'absence d'infection. J'ai également entrepris de caractériser l'activité catalytique des deux USPs *in vitro*.

L'originalité de mon travail a consisté à limiter le crible à une famille de gènes, ce qui a permis de détecter de nouveaux régulateurs qui n'avaient pas été mis en évidence dans des cribles antérieurs réalisés sur une grande partie ou la totalité du génome, et de prouver la fonction des candidats *in vivo*.

Mots clés : NF-κB, ubiquitine protéase, transduction du signal, immunité innée, réponse au stress

Identifying ubiquitin specific proteases inhibiting immune signals in *Drosophila*

In mammals, NF-kappaB (NF-κB) signalling pathways are involved in cell survival and inflammation. Their deregulation is often associated to chronic inflammatory diseases and cancers. The aim of this thesis was to identify negative regulators of the conserved NF-κB pathways, Toll and Imd, in *Drosophila melanogaster*.

The stability or activity of several compounds of NF-κB pathways is regulated by ubiquitination. Consequently, the ubiquitine specific proteases (USPs) constitute a new area to look for regulators of these pathways. To do this, I constructed a collection of interfering RNA able to inactivate the 21 USPs of drosophila in S2 cells. The screening of this collection identified three negative regulators of the Imd pathway, one of them having also an effect on the Toll pathway. The target specificity of USPs could explain the small number of candidates. Among these candidates, dUSP36, a homologue of human USP36, was previously detected in the lab in a genetic screening. Team studies, in which I participated, show its *in vivo* effect on the adaptative protein Imd through its catalytic activity. In order to characterise the two other candidates I performed transgenesis experiments in drosophila. These studies show that the two USPs are able to prevent activation of the Imd pathway in case of infection and that they are required to maintain the inactivated state of the Imd pathway in absence of infection. I also started to characterise the catalytic activity of both candidates *in vitro*.

My work's novelty was to limit the screening to only one gene family, which allowed the detection of new regulating genes which had not been revealed in previous screenings performed on a large part or the entire genome, and to prove their function *in vivo*.

Key words: NF-κB, ubiquitin protease, signal transduction, innate immunity, stress response