



**HAL**  
open science

# Impact de la protéine CHMP2B et de ses variants pathogènes sur le modelage des membranes biologiques

Gilles Bodon

► **To cite this version:**

Gilles Bodon. Impact de la protéine CHMP2B et de ses variants pathogènes sur le modelage des membranes biologiques. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00594742

**HAL Id: tel-00594742**

**<https://theses.hal.science/tel-00594742>**

Submitted on 20 May 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.

THESE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE**

Discipline : Neurosciences et Neurobiologie

Soutenue publiquement par **Gilles Bodon**

Jeudi 16 décembre 2010

Amphithéâtre Serge Kampf, Institut des Neurosciences de Grenoble

# **Impact de la protéine CHMP2B et de ses variants pathogènes sur le modelage des membranes biologiques**

Directeur de thèse: Yves Goldberg

Membres du Jury :

Dr Guy Schoehn (président de jury)  
Dr Patricia Bassereau (rapporteur)  
Dr François Letourneur (rapporteur)  
Dr David Perrais (examineur)  
Dr Olivier Destaing (examineur)  
Dr Yves Golberg

Thèse préparée dans le laboratoire :  
Neurodégénérescence et plasticité, U836 INSERM/UJF  
Grenoble Institut des neurosciences

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
<b>1. La machinerie ESCRT et complexes associés</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. L'endocytose des protéines de surface</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. Découverte des protéines ESCRT</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. Composition et structure des complexes ESCRT et associés.</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3.1. ESCRT-0</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3.2. ESCRT-I</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3.3. ESCRT-II</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.4. ESCRT-III</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3.5. Complexe VPS4-VTA1</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.6. Alix.</b> .....	<b>25</b>
<b>1.4. Fonctionnement de la machinerie ESCRT</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4.1. Recrutement du cargo ubiquitinylé.</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4.2. Formation du bourgeon:</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4.3. Scission membranaire.</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4.4. Désassemblage d'ESCRT-III</b> .....	<b>37</b>
<b>1.5. Rôles physiologiques</b> .....	<b>40</b>
<b>1.5.1. ESCRT et trafic des protéines de surface.</b> .....	<b>42</b>
1.5.1.1. Dégradation des protéines de surface.....	42
1.5.1.2. ESCRT et recyclage .....	43
<b>1.5.2. ESCRT et bourgeonnement des virus enveloppés</b> .....	<b>44</b>
<b>1.5.3. ESCRT et cycle cellulaire :</b> .....	<b>49</b>
1.5.3.1. ESCRT et mitose : .....	50
1.5.3.2. ESCRT et cytokinèse : .....	51
<b>1.5.4. ESCRT et autophagie</b> .....	<b>55</b>
<b>1.6. Implication de la machinerie ESCRT dans les maladies neurodégénératives.</b> .....	<b>58</b>
1.6.1. Des sous unités de complexes ESCRT reliées aux maladies neurodégénératives (MND). .....	59
1.6.2. Des mutations dans le gène codants pour CHMP2B sont la cause de MND. ....	60
1.6.2.1. Démences fronto-temporales. ....	60
1.6.2.2. Une cause endosomale de la DFT?.....	62
1.6.2.3. Des dysfonctionnements de l'autophagie à l'origine de DFT ? .....	62
1.6.2.4. Sclérose latérale amyotrophique .....	64
<b>1.7. Conclusion générale ESCRT</b> .....	<b>65</b>
<b>2. Mécanismes de remodelage membranaire</b> .....	<b>67</b>
<b>2.1. Principes généraux :</b> .....	<b>67</b>
<b>2.2. Courbure membranaire par des lipides.</b> .....	<b>68</b>
<b>2.2.1. Action des Flipases :</b> .....	<b>69</b>

2.2.2.	<i>Enzymes de modification des lipides :</i>	69
2.2.3.	<i>Les sphingomyélinases :</i>	69
2.3.	<i>Courbure membranaire par les protéines.</i>	70
2.3.1.	<i>Protéines d'échaffaudage : Exemple des protéines à domaines BAR :</i>	71
2.3.2.	<i>Insertion hydrophobe dans une monocouche.</i>	73
2.4.	<i>Fission et fusion membranaire.</i>	74
2.4.1.	<i>Principes généraux :</i>	74
2.4.2.	<i>Machinerie de fusion membranaire : Les SNAREs.</i>	75
2.4.3.	<i>Fission membranaire.</i>	77
2.4.3.1.	<i>Protéines de déformation membranaire et fission.</i>	77
3.	<i>Rôle de la morphologie des épines dendritiques dans l'activité neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives</i>	79
3.1.	<i>Structure et fonction des épines dendritiques</i>	79
3.1.1.	<i>Présentation générale</i>	79
3.1.2.	<i>Plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme.</i>	83
3.1.3.	<i>LTP/LTD et morphologie des épines dendritiques</i>	84
3.1.4.	<i>Formation et maintien des épines dendritiques : Filopodes précurseurs développementaux des épines dendritiques</i>	85
3.2.	<i>Bases moléculaires de la morphologie des épines dendritiques.</i>	86
3.2.1.	<i>L'actine.</i>	86
3.2.2.	<i>Les endosomes.</i>	88
3.2.3.	<i>Les protéines de la densité postsynaptique.</i>	88
3.2.4.	<i>Molécules d'adhérence.</i>	89
3.2.5.	<i>Récepteurs aux neurotransmetteurs</i>	89
3.2.6.	<i>Lipides.</i>	90
3.2.7.	<i>Rôle des mitochondries</i>	90
3.3.	<i>Pathologies des épines dendritiques.</i>	91
	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>96</b>
1.	<i>Plasmides et anticorps</i>	97
1.1.	<i>Anticorps</i>	97
2.	<i>Biologie moléculaire</i>	98
2.1.	<i>Mise en évidence des ARNm issus de l'épissage alternatif des ARNm de CHMP3 et CHMP2B</i>	98
2.2.	<i>Clonages.</i>	98
3.	<i>Microscopie électronique</i>	99

<b>4.</b>	<b><i>Culture cellulaire</i></b> .....	<b>100</b>
4.1.	<i>Lignés</i> .....	100
4.2.	<i>Culture primaire de neurones d'hippocampe de rat</i> .....	100
<b>5.</b>	<b><i>Transfection</i></b> .....	<b>101</b>
5.1.	<i>Transfection d'ADN dans les cellules Hela ou Hek</i> .....	101
5.2.	<i>Transfection des neurones</i> .....	102
5.3.	<i>Transfection des ARN interférants.</i> .....	102
<b>6.</b>	<b><i>Immunocytofluorescence</i></b> .....	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b><i>Western blot et immunodetection</i></b> .....	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b><i>Fractionnements subcellulaires et approches biochimiques</i></b> .....	<b>104</b>
8.1.	<i>Purification de mitochondries de cerveaux de rat</i> .....	104
8.3.	<i>Alourdissement des mitochondries par iodonitrotétrazolium (INT)</i> .....	105
8.4.	<i>Digestion des mitochondries par la protéinase K</i> .....	105
8.5.	<i>Perméabilisations de mitochondries purifiées par BAX et TBid recombinants</i> .....	105
<b>9.</b>	<b><i>Mesure de la longueur des mitochondries</i></b> .....	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b><i>Purification des interacteurs de CHMP2B</i></b> .....	<b>106</b>
10.1.	<i>Production de protéines recombinantes et production des colonnes Streptactines les contenant</i> 106	
10.2.	<i>Préparation de fraction cytosolique de lysats de cerveaux de rats</i> .....	106
10.3.	<i>Purification</i> .....	107
	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>110</b>
1.	<b>Article 1 : CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines.</b> 112	
2.	<b>Article 2: The ESCRT-III protein CHMP2B is recruited at the plasma membrane and polymerises into hollow tubes protruding from the cell surface.</b> .....	<b>128</b>
3.	<b>Rôle potentiel de CHMP2B dans dynamique mitochondriale.</b> .....	<b>166</b>
3.1.	<i>Import dans les mitochondries.</i> .....	166
3.2.	<i>Formes courtes d'ESCRTIII et mitochondries.</i> .....	174
-	<i>CHMP3β</i> .....	174
-	<i>CHMP2Bβ</i> .....	179
3.3.	<i>CHMP2B et fission mitochondriale.</i> .....	182

-	<i>Cellules Hela</i> .....	182
-	<i>Rôle de CHMP2B dans la morphologie des mitochondries de neurones d'hippocampe</i> .....	184
4.	<i>Purification de nouveaux interacteurs neuronaux de CHMP2B</i> .....	187
<b>DISCUSSION</b> .....		<b>192</b>
1.	<i>Les mutants de CHMP2B associés à une démence fronto-temporale altèrent la maturation des épines dendritiques</i> .....	193
2.	<i>Les partenaires potentiels de CHMP2B suggèrent de nouvelles les fonctions pour cette protéine</i> .....	195
2.1.	<i>CHMP2B et remodelage du cytosquelette d'actine</i> .....	195
2.2.	<i>Implication de CHMP2B dans le recyclage de protéines membranaires</i> .....	196
3.	<i>Implication de CHMP2B dans la dynamique des mitochondries</i> .....	197
4.	<i>Remodelage membranaire par des assemblages supramoléculaires de CHMP2B</i> .....	200
4.1.	<i>Ultra-structure des tubes composés de CHMP2B</i> .....	200
4.2.	<i>CHMP2B déforme la membrane plasmique</i> .....	201
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>206</b>

# Introduction

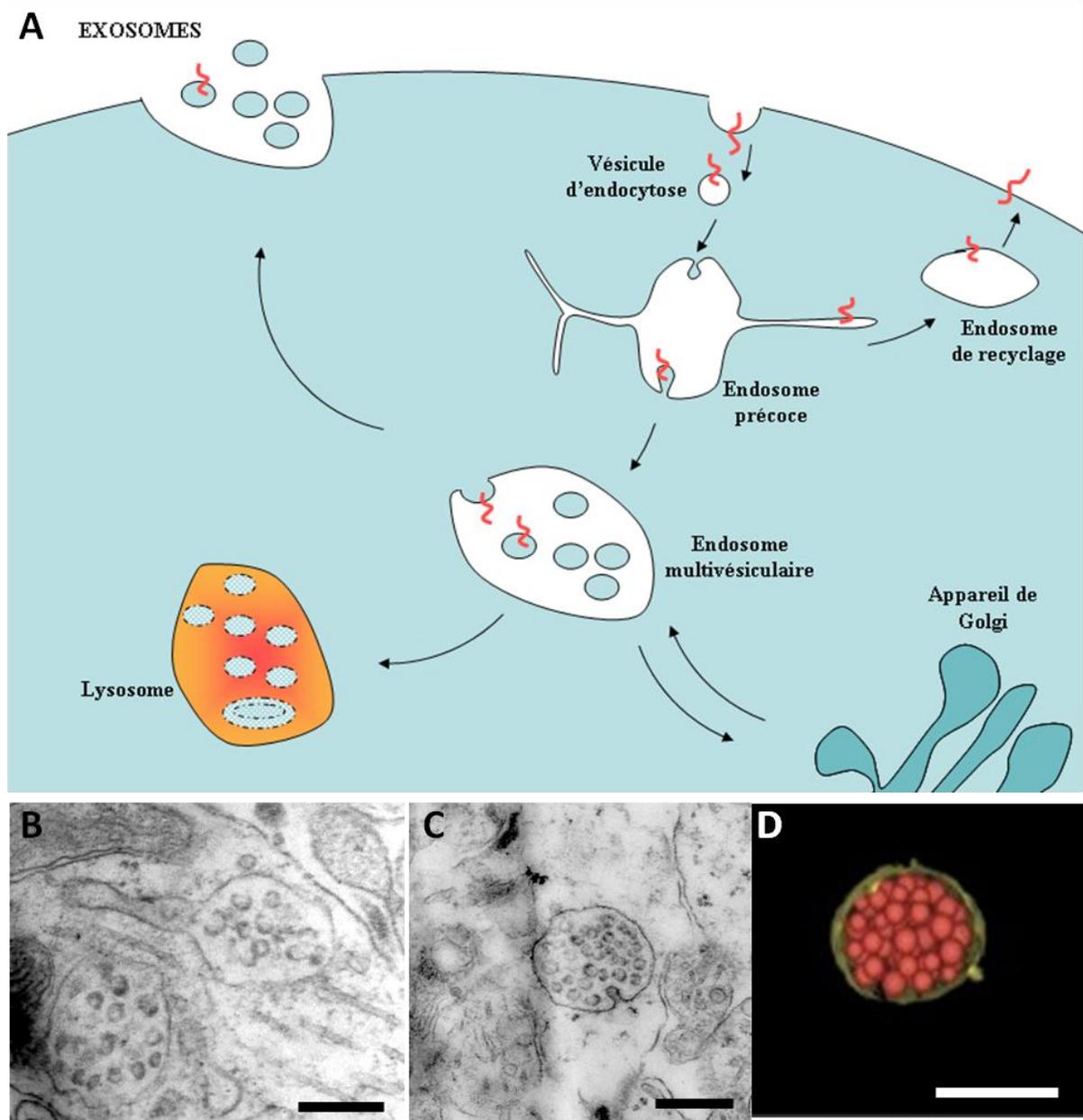
# **1. La machinerie ESCRT et complexes associés**

## **1.1. L'endocytose des protéines de surface**

Les protéines et lipides de surface sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique, pour ensuite être adressées à la membrane plasmique après maturation dans l'appareil de Golgi. Le matériel présent à la membrane plasmique subit un perpétuel renouvellement par endocytose et exocytose. Les protéines et lipides de surface sont internalisés dans des vésicules d'endocytose, et envoyés vers les endosomes précoces. Ces organelles, de forme tubulo-vésiculaire (Geuze et al., 1987; Gruenberg and Howell, 1987) sont de véritables plateformes de tri. En fonction de signaux portés par ces protéines, ou adressés par d'autres voies de signalisation, elles sont renvoyées vers la membrane plasmique ou dirigées vers le lysosome pour y être dégradées. Par exemple les « récepteurs de ménage » (house keeping receptors) comme le récepteur à la transferrine, ou le récepteur LDL (Low Density lipoprotein), sont constitutivement recyclés vers la membrane, alors que d'autres comme le récepteur à l'EGF, sont directement envoyés vers les lysosomes.

Les protéines ne portant pas de signaux de dégradation, diffusent dans les régions tubulaires. Quelques unes sont directement renvoyées vers la membrane plasmique (recyclage rapide) (Hopkins and Trowbridge, 1983), mais la majorité d'entre elles accompagnent des portions de tubules de l'endosome précoce qui se détachent pour se concentrer autour du centrosome et former un nouveau compartiment : l'endosome de recyclage (Dautry-Varsat, 1986). Elles seront ensuite acheminées vers la membrane plasmique. Les protéines porteuse d'un signal de dégradation quant à elles, se concentrent à la partie vacuolaire de l'endosome dans des micro-domaines où elles vont être incorporées dans les vésicules intraluminales (VIL) qui se détachent de la membrane limitante de l'endosome vers la lumière de celui-ci (Hurley and Hanson; Bilodeau et al., 2002; Saksena et al., 2007; Hurley, 2010; Hurley and Hanson, 2010) . L'accumulation de ces vésicules à l'intérieur de l'endosome précoce accompagne sa maturation en endosome tardif plus acide appelé corps multivésiculé (CMV)(Gruenberg et al., 1989; Aniento et al., 1993), qui migre le long du réseau microtubulaire pour fusionner avec le lysosome (Luzio et al., 2009a; Luzio et al., 2009b). Les CMV sont des sphères de 200 à 500 nm de diamètre, remplis de VIL d'un diamètre allant de 50 et 100nm (25nm dans la levure). La fusion entre le CMV et le lysosome expose les vésicules intraluminales aux hydrolases et lipases lysosomales qui dégradent leur

contenu.



**Fig. 1: La voie endocytaire dans une cellule eucaryote.**

**A.** Les protéines de surface sont internalisés dans des vésicules d'endocytose et transportés jusqu'aux endosomes précoces où ils sont triés. Une partie de ces protéines est renvoyée vers la membrane plasmique via les endosomes de recyclage, l'autre vers les lysosomes via les corps multivésiculés. Certains corps multivésiculés fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent dans le milieu extracellulaire leurs VIL.

**B.** Endosome tubulo-vésiculaire et endosome multivésiculaire vus en microscopie électronique à transmission dans des neurones corticaux en culture à DIV 15.

**C.** Bourgeonnement d'une vésicule dans le lumen d'un endosome dans des tranches d'hippocampe de souris à P16.

**D.** Reconstruction 3D d'un MVB par tomographie électronique chez *S. Cerevisiae*, (d'après Nickerson et al, 2006). Barre: 500nm

Toutefois le CMV peut prendre une autre route et fusionner à la membrane plasmique pour libérer ses VIL dans le milieu extra cellulaire ; ces vésicules sont alors

appelées exosomes (Trams et al., 1981; Pan et al., 1985). Les CMV constituent donc des compartiments intermédiaires entre les endosomes de tri, d'une part, et les lysosomes ou la membrane plasmique, d'autre part. Mais ils sont aussi impliqués dans le trafic de protéines entre l'appareil de Golgi et le lysosome. En effet, les hydrolases nouvellement synthétisées sont adressées au lysosome via les CMV. Elles peuvent par exemple être prises en charge à l'appareil de Golgi par leurs récepteurs (mannose 6-phosphatase receptor : MPR) puis acheminées par transport vésiculaire vers les endosomes tardifs pour être libérées dans leur lumière.

Les endosomes jouent donc un rôle crucial dans le contrôle des protéines de surface, en coordonnant le trafic vésiculaire entre la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et le lysosome.

## **1.2. Découverte des protéines ESCRT**

Les protéines VPS (Vacuolar protein sorting) ont été découvertes suite aux études menées chez *Saccharomyces cerevisiae* sur l'adressage à la vacuole d'hydrolases acides comme la carboxypeptidase Y (CPY) ou la protéinase A (PrA). Ces protéines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, puis transportées au sein de l'appareil de Golgi. Au niveau du trans-Golgi, elles sont triées et séparées de celles destinées à être sécrétées ou adressées à la membrane plasmique pour être acheminées à la vacuole par transport vésiculaire (Schauer et al., 1985; Griffiths and Simons, 1986; Klionsky et al., 1988).

Des mutations dans le domaine d'adressage à la vacuole de CPY ou de PrA, induisent un trafic aberrant de ces protéines qui ne sont plus transportées vers la vacuole mais délivrées à la surface de la cellule et donc sécrétées (Johnson et al., 1987; Valls et al., 1987). La sécrétion de ces protéines témoigne donc d'un trafic correct de la protéine jusqu'à l'appareil de Golgi mais d'un problème d'adressage à la vacuole. En 1986, Rothman et Stevens (Rothman and Stevens, 1986) utilisèrent cette observation pour caractériser les gènes impliqués dans le trafic de ces protéines du trans-Golgi vers la vacuole en caractérisant des mutants de levures qui sécrètent CPY. Ils identifièrent alors 8 sous groupes de complémentation de ces gènes qu'ils nommèrent vpl (Vacuolar Protein localisation defective mutants). A la même époque et par une approche très similaire l'équipe de Scott Emr identifia aussi 8 sous groupes de complémentation de ces gènes qu'ils nommèrent vpt

(Vacuolar Protein Targeting). Ces gènes portent aujourd'hui le nom de Vps (Vacuolar Protein Sorting) et plus de 60 d'entre eux ont été identifiés (Bryant and Stevens, 1998).

Raymond et collaborateurs ont ensuite classé ces mutants en fonction de la morphologie de leur vacuole (Raymond et al., 1992) (tableau1). Ils remarquèrent alors chez une partie de ces mutants (13 gènes), « l'accumulation d'une nouvelle organelle distincte de la vacuole et contenant des protéines golgiennes tardives... ». Ils rassemblèrent ces mutants particuliers en un sous-groupe qu'ils nommèrent protéines Vps de ClasseE.

Ces nouveaux compartiments sont en fait des endosomes multi-lamellaires aberrants provenant d'un défaut de formation des corps multivésiculés (CMV). Ces compartiment de classe E sont formés de longues « citernes » membranaire, plates, empilées les unes sur les autres, qui ne sont pas connectées les unes aux autres.

Les protéines de classe E sont impliquées dans la genèse des vésicules intra-luminales des CMV, et le transport de protéines destinées à la vacuole via cet organite. Elles font pour la plupart partie de la machinerie de transport endosomale appelée ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), qui est composée de quatre complexes protéiques: ESCRT-0 (Bilodeau et al., 2002; Katzmann et al., 2003), ESCRT-I (Katzmann et al., 2001), ESCRT-II (Babst et al., 2002a), ESCRT-III (Babst et al., 2002b)(tableau1). Le reste des VPS de classe E sont des protéines accessoires comme Bro1 (ALIX chez les mammifères) et celles formant le complexe Vps4-Vta1 permettant le désassemblage des complexes ESCRTs.

Tout ces complexes protéiques sont conservés chez les métazoaires, où ils sont responsables du transport de récepteurs de surface comme l'EGFR jusqu'aux vésicules intra-luminales des CMV, mais aussi d'autres processus cellulaires fondamentaux (cytokinèse, autophagie) ou pathologiques (bourgeonnement viral, neurodégénérescence...).

### **1.3. Composition et structure des complexes ESCRT et associés.**

#### **1.3.1. ESCRT-0**

ESCRT-0 est formé de Hrs et STAM (Vps27 et Hse chez la levure) (Bilodeau et al., 2002). Il existe deux isoformes de STAM (STAM1 et STAM2) chez les humains et une seule d'Hrs. A l'origine, ce complexe n'était pas considéré comme un membre de la machinerie ESCRT. Il y a été inclus plus tardivement lorsqu'il a été impliqué dans le recrutement

d'ESCRT-I sur l'endosome auprès du cargo ubiquitylé (Asao et al., 1997; Bilodeau et al., 2002; Bache et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003). Les sous unités de ce complexe ne semblent pas exister seules dans le cytosol, mais sont constitutivement associées sous forme d'un hétérodimère Hrs-STAM qui forme ESCRT-0 (Ren et al., 2009).

Cette dimérisation est assurée par le cœur du complexe qui forme une structure allongée composée de deux domaines GAT entrecroisés, et d'un domaine coiled-coil anti-parallèle (Prag et al., 2007; Ren et al., 2009)(figure2) Ces deux protéines sont assez similaires de par leurs structures : elles contiennent un domaine de liaison à l'ubiquitine (domaine VHS) à leurs extrémités amino-terminales (Hofmann and Falquet, 2001; Ren and Hurley, 2010), suivis d'un domaine en doigt de zinc (FYVE) qui se lie et s'insère dans les membranes riches en PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) avec une très forte affinité (10nM) (Gaullier et al., 1998; Stahelin et al., 2002). Il permet le recrutement d'ESCRT-0 aux endosomes précoces (Raiborg et al., 2001b). Ce domaine est suivi de deux domaines UIM de liaison à l'ubiquitine chez Vsp27 (Bilodeau et al., 2002; Shih et al., 2002; Fisher et al., 2003; Swanson et al., 2003) et d'un seul domaine UIM à deux côtés (DUIM) chez Hrs qui peut donc lier deux ubiquitines (Hirano et al., 2006a). STAM et Hse quant à eux contiennent un seul domaine UIM (Fisher et al., 2003; Urbe et al., 2003). Au total, chaque complexe ESCRT-0, qu'il soit de levure ou humain, contient cinq domaines de liaison à l'ubiquitine.

Tableau 1 : ESCRT et protéines associées (Hurley and Hanson, 2010).

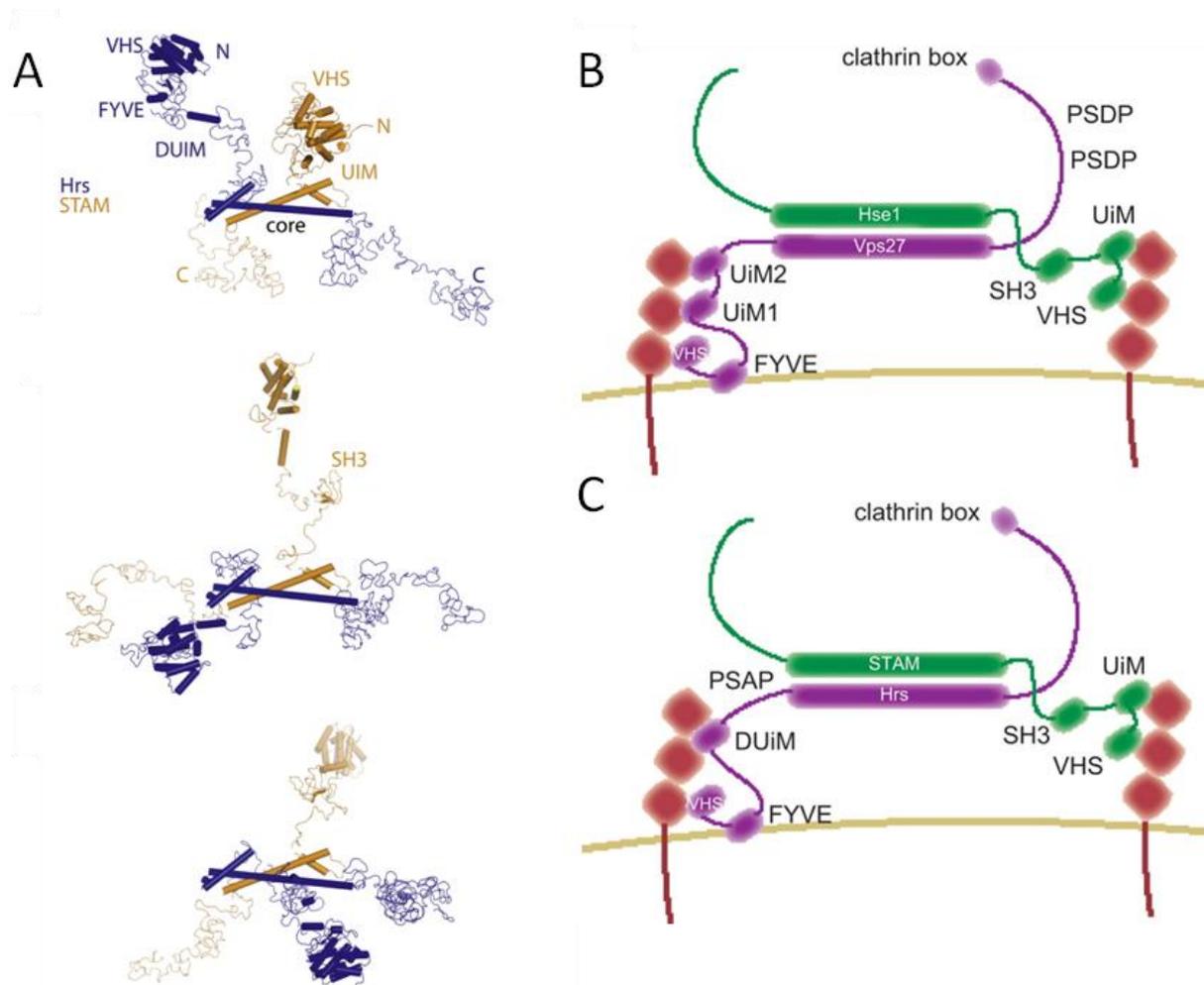
ESCRT activity	Yeast protein*	Metazoan protein*	Motifs and domains	Biochemical role*	Biological role
<b>ESCRT-0</b>					
Clustering of ubiquitylated cargo	Vps27	HRS (HGS)	VHS, FYVE, UIM (yeast), DUIM (metazoan), PTAP, GAT, coiled-coil core, clathrin-binding	Binds phosphatidylinositol-3-phosphate-containing membranes, ESCRT-I, ubiquitin and clathrin	MVB biogenesis, autophagy
	Hse1	STAM1, STAM2	VHS, UIM, SH3, GAT, coiled-coil core	Binds ubiquitin and DUBs	MVB biogenesis, autophagy
<b>ESCRT-I</b>					
Membrane budding (with ESCRT-II)	Vps23	VPS23 (TSG101)	UEV, Pro-rich linker, stalk, headpiece	Binds ubiquitin and ESCRT-0 in the MVB pathway and PTAP motifs in viral Gag proteins; adaptor for CEP55	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Vps28	VPS28	Headpiece, Vps28 C-terminal	Binds ESCRT-II	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Vps37	VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D	Basic helix, stalk, headpiece	Binds membranes (mammalian VPS37 binds ESCRT-III protein IST1)	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Mvb12	MVB12A, MVBB	Stalk, ubiquitin-binding C terminus	Stabilizes ESCRT-I oligomers by contacting each subunit; C terminus binds ubiquitin	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
<b>ESCRT-II</b>					
Membrane budding (with ESCRT-I)	Vps22	VPS22 (EAP30)	Basic helix, WH2	Binds membranes	MVB biogenesis, autophagy
	Vps25	VPS25 (EAP20)	WH2	Binds Vps20 of ESCRT-III to recruit ESCRT-III to the bud neck and activate it	MVB biogenesis, autophagy
	Vps36	VPS36 (EAP45)	GLUE, NZF1 (yeast), NZF2 (yeast), WH2	Binds phosphoinositide-containing membranes, ubiquitin and ESCRT-I	MVB biogenesis, autophagy
<b>ESCRT-III</b>					
Membrane scission	Vps20	VPS20 (CHMP6)	Myristoylated; MIM2	Initiates ESCRT-III assembly in MVB biogenesis by binding Snf7; initiates membrane scission; MIM2 binds Vps4 for subsequent disassembly	MVB biogenesis, autophagy
	Snf7 (Vps32)	SNF7A (CHMP4A), SNFB (CHMP4B), SNFC (CHMP4C)	MIM2	Main driver of membrane scission; recruits DUBs (in yeast); binds Bro1 domain-containing proteins, including ALIX	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Vps24	VPS24 (CHMP3)	MIM1	Completes membrane scission; recruits the DUB AMSH (in mammals)	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Vps2	VPS2A (CHMP2A), VPS2B (CHMP2B)	MIM1	Recruits Vps4; initiates ESCRT-III disassembly	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
<b>ESCRT-III related</b>					
Regulation of membrane scission and ESCRT-III disassembly	Did2 (Vps46)	DID2A (CHMP1A), DID2B (CHMP1B)	MIM1	Recruits Vps4 and the microtubule-severing enzyme spastin (mammalian DID2B)	MVB biogenesis, viral budding, cytokinesis
	Vps60	CHMP5	Not determined	Binds Vta1 with high affinity	MVB biogenesis, cytokinesis
	Ist1	IST1	MIM1, MIM2	Binds Vps4, Vta1, Did2 and ESCRT-I	MVB biogenesis, cytokinesis
	None	CHMP7	MIM1, MIM2	The tandem ESCRT-III domains bind SNF7B and the DUB UBPY (USP8)	MVB biogenesis, viral budding
<b>Vps4 and Vta1</b>					
ESCRT-III disassembly	Vps4	VPS4A, VPS4B (SKD1)	MIT, AAA	AAA + ATPase that acts as an assembled oligomer on ESCRT-III	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
	Vta1	VTA1 (LIP5)	MIT, VSL	Binds MIMs; binds Vps4 to promote oligomer assembly and ESCRT-III recycling	MVB biogenesis, autophagy, viral budding, cytokinesis
<b>Other</b>					
Multiple modulatory and targeting functions	Bro1 (Vps31)	ALIX (AIP1)	Bro1, V, Pro-rich	Recruits Snf7 for scission; recruits DUBs; adaptor for CEP55 and viral YPXL motifs; interacts with apoptosis factors and the cytoskeleton with unclear significance for the ESCRT pathway	MVB biogenesis, viral budding and cytokinesis

AMSH, associated molecule with the SH3 domain of STAM; Bro1, Bro1 domain-containing protein 1; CHMP, charged multivesicular body protein; DID, DOA4-independent degradation protein; DUB, deubiquitylating enzyme; DUIM, double-sided ubiquitin-interacting motif; ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; GAT, GGA and TOM; GLUE, GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45; HRS, hepatocyte growth factor-regulated Tyr kinase substrate; Ist1, increased sodium tolerance protein 1; MIM, MIT-interacting motif; MIT, microtubule-interacting and transport; MVB, multivesicular body; NZF, Npl4-type zinc finger; SH3, SRC homology 3; UBPY, ubiquitin isopeptidase Y; UEV, ubiquitin E2 variant; UIM, ubiquitin-interacting motif; VHS, Vps27, HRS and STAM; Vps, vacuolar protein sorting; VSL, VTA1, SBP1 and LIP5; WH2, winged helix 2. \*Alternative names are provided in brackets.

STAM possède aussi un domaine SH3 responsable du recrutement des désubiquitylases UBPY et AMSH, et situé entre le domaine UIM et celui d'interaction avec Hrs (Kato et al., 2000).

Hrs interagit avec la chaîne lourde de la Clathrine au niveau de son extrémité C-terminale (Raiborg et al., 2001a). Cette interaction permet à la fois le recrutement de la Clathrine au niveau des endosomes précoces, et la séquestration de Hrs et de son cargo dans les micro-domaines dénués d'EEA1 formés par un manteau plat de Clathrine. STAM peut aussi interagir avec lui-même *in vitro* (McCullough et al., 2006).

Enfin, la queue C-terminale de Hrs contient le motif PSAP (PSDP pour Vps27) responsable du recrutement d'ESCRT-I par interaction directe avec la sous-unité TSG101, (Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003).



**Figure 2 : Structure du complexe ESCRT-0**

**A :** Le modèle de la structure du complexe ESCRT-0 (Ren et al., 2009). Trois points de vue à 90° l'un de l'autre sont représentés.

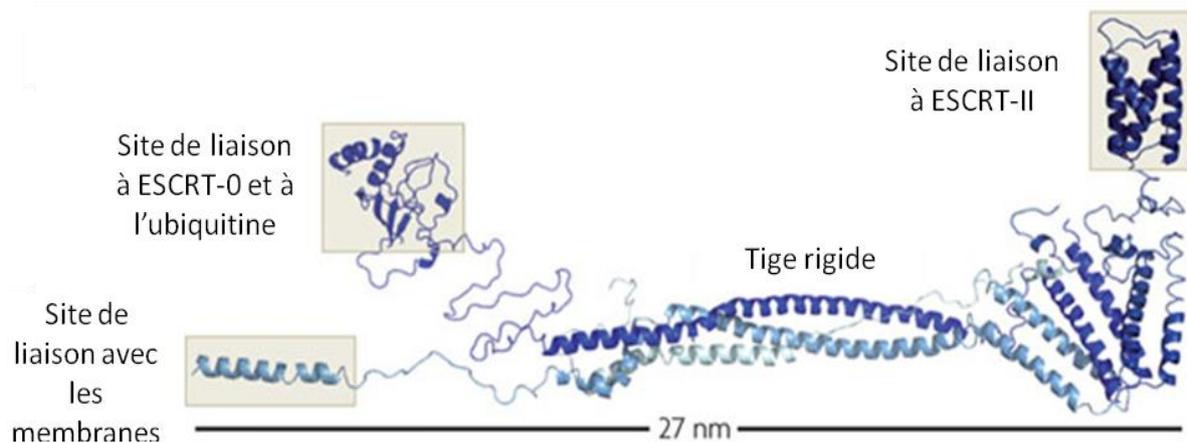
**B et C** : Organisation schématique du complexe ESCRT-0 représenté associé à un cargo ubiquitylé de levure (B) et d'humain (C) (d'après (Hurley, 2010).

### 1.3.2. ESCRT-I

ESCRT-I est formé de TSG101 (Vps23 chez la levure), VPS28, VPS37 et MVB12 (Katzmann et al., 2001; Chu et al., 2006; Morita et al., 2007a)(figure3). Chez la levure, il y a une seule isoforme pour chaque protéine. Chez les humains, une seule de TSG101 et de VPS28, mais deux de MVB12 (MVB12 A et B) et quatre de VPS37 (VPS37 A, B, C et D).

Un modèle de la structure de ce complexe qui a été obtenu à partir de protéines de levure révèle un hétéro-tétramère composé d'une copie de chaque sous-unité (Kostelansky et al., 2006; Kostelansky et al., 2007). ESCRT-I présente une structure allongée et rigide d'environ 18nm formée d'une « coiffe » globulaire de  $25 \times 55 \times 60 \text{ \AA}$ , reliée à une tige rigide de 13nm de long et de 2nm de diamètre. La coiffe est composée de portions des quatre sous-unités alors que la tige est formée de portions de Vps23, Vps37, et Mvb12, qui s'organisent en 4 hélices  $\alpha$  parallèles (deux de Vps23 et une de Vps 37 et de Mvb12) pour former en partie un triple coiled-coil composé d'une hélice de chaque sous unité.

Au bout de cette tige, il y a une petite partie du complexe, où se situe le domaine Ubiquitin E Variant (UEV) (sur l'extrémité amino-terminale de Vps23) responsable de l'interaction avec le cargo ubiquitylé (Katzmann et al., 2001; Sundquist et al., 2004; Teo et al., 2004a), et avec les motifs de type PSAP de Hrs ou de protéines virales, qui permet le recrutement d'ESCRT-I aux endosomes ou aux sites de bourgeonnement de virus enveloppés (Bache et al., 2003; Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003). Juste après UEV, se situe un domaine riche en proline contenant le motif GPPX<sub>3</sub>P responsable de l'interaction avec CEP55 (centrosomal protein of 55kDa) et qui permet le recrutement d'ESCRT-I au corps intermédiaire (midbody en anglais) lors de la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007b; Lee et al., 2008).



**Figure 3: Modèle structural du complexe ESCRT-I.**

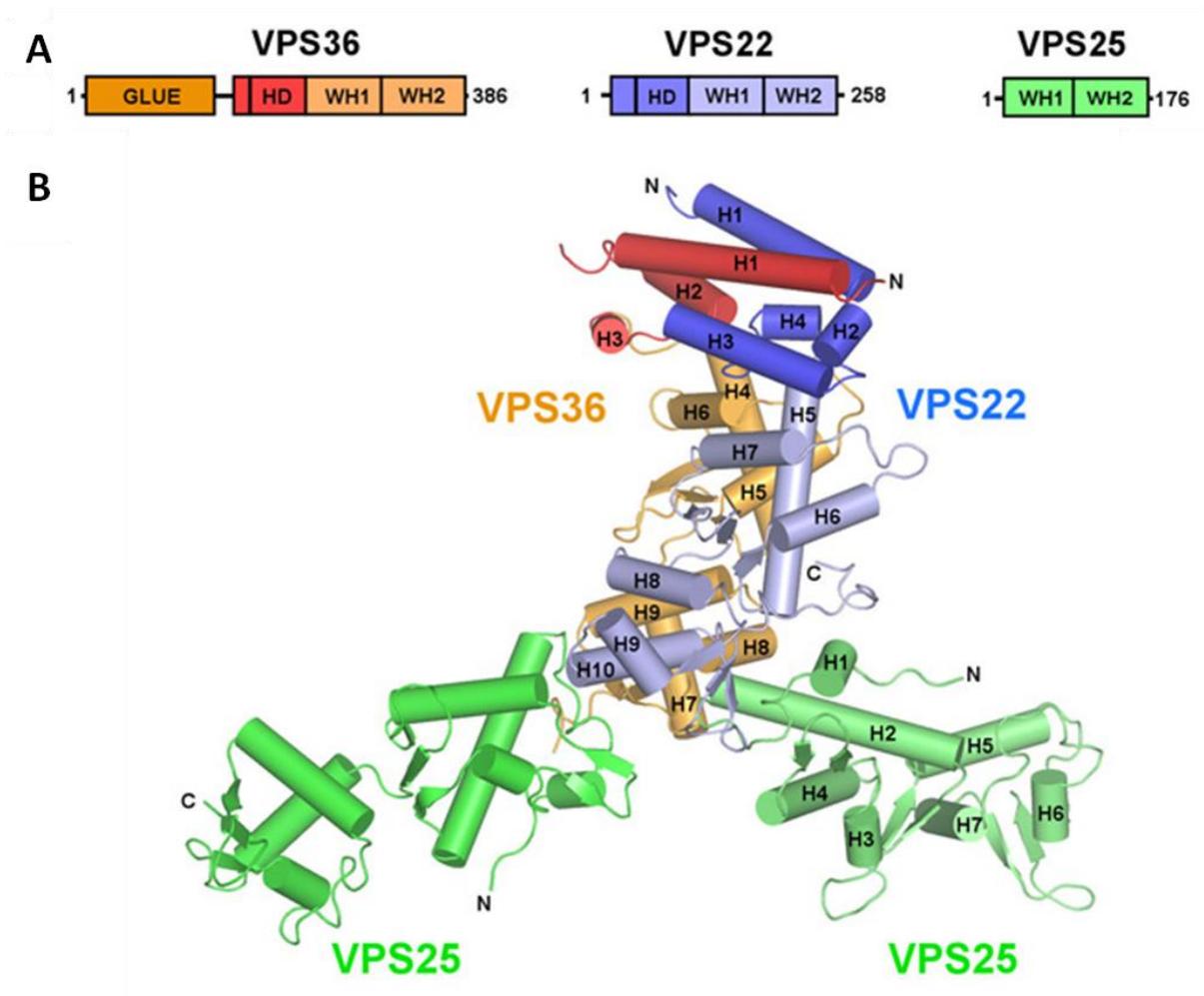
La tête globulaire où réside le site de recrutement d'ESCRT-II est séparée du site d'interaction à ESCRT-O et du domaine de liaison aux membranes par une tige rigide d'environ 18 nm. Cet agencement présente une structure de 27nm.

La partie amino-terminale de Vps37 est elle aussi située au bout de la tige où elle forme une hélice basique qui contribue à l'interaction d'ESCRT-I avec les membranes (Kostelansky et al., 2007).

De l'autre côté de ce complexe au niveau de la coiffe, Vps28 de levure contient à son extrémité carboxy-terminale, un domaine CTD interagissant avec Vps36 et permettant le recrutement d'ESCRT-II (Kostelansky et al., 2006; Gill et al., 2007). Chez les humains, le site de recrutement d'ESCRT-II sur ESCRT-I est encore inconnu. ESCRT-I est donc capable de recruter ESCRT-O et ESCRTII de part et d'autre d'une structure rigide longue de 18nm.

### 1.3.3. ESCRT-II

ESCRT-II est un hétéro-tétramère composé d'une unité de Vps22, deux de Vps25 et une de Vps36 adoptant une conformation en Y (Hierro et al., 2004; Teo et al., 2004b; Im and Hurley, 2008)(figure4). Les deux branches du haut étant formées de Vps25 et celle du bas de Vps36 et Vps22. Vps22 et Vps36 interagissent intimement l'un avec l'autre via leurs domaines WH (tandem Winged Helix). VPS36 contient à son extrémité N-terminale un domaine GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45) qui lie avec l'ubiquitine sur une face et le PI3P sur une autre face (Slagsvold et al., 2005; Alam et al., 2006; Hirano et al., 2006b; Teo et al., 2006). Il peut donc lier à la fois les membranes et l'ubiquitine. ESCRT-II possède plusieurs interfaces de liaison aux lipides puisque la première hélice de Vps22 interagit avec les phosphoinositides fortement chargés ( $PI(3,5)P_2$  et  $PI(3,4,5)P_3$ ) (Im and Hurley, 2008).



**Figure 4: Structure du complexe ESCRT-II**

**A:** Organisation en domaines des sous unités d'ESCRT-II.

**B:** Le modèle structural du complexe ESCRT-II humain (Im and Hurley, 2008).

Chez la levure, deux domaines en doigts de zinc NZF1 et 2 viennent s'insérer dans le domaine GLUE. NZF1 est le site d'interaction avec ESCRT-I (Vps28) (Gill et al., 2007), et NZF2 est un site de liaison supplémentaire à l'ubiquitine (Alam et al., 2004). La première hélice de VPS22 pourrait aussi participer à l'association avec les membranes du complexe (Teo et al., 2006). Tout comme le CTD d'ESCRT-I, ces domaines NZF d'ESCRT-II ne sont pas conservés chez les mammifères. Les modalités d'interaction entre ESCRT-I et ESCRT-II restent donc obscures.

Les deux molécules de VPS25 possèdent chacune un deuxième domaine WH situé au bout du Y qui sont les sites d'interaction de la sous unité CHMP6 (Vps20 chez la levure)

d'ESCRT-III (Hierro et al., 2004; Im et al., 2009). Chaque sous unité Vps25 lie une molécule de CHMP6 et sont toutes deux nécessaires à la dégradation du cargo (Teis et al., 2010). Donc chaque complexe ESCRT-I lie un complexe ESCRT-II qui formerait alors une plateforme capable d'induire la polymérisation de deux complexes ESCRT-III.

#### **1.3.4. ESCRT-III**

Les complexes ESCRT-III et l'ATPase Vps4 sont au cœur de la machinerie ESCRT. Ils sont requis pour tous les processus cellulaires impliquant les ESCRTs (genèse de CMV, bourgeonnement viral, cytokinèse, autophagie) et sont les seuls à avoir des homologues chez certaines archaebactéries où ils sont tous deux impliqués dans la division cellulaire (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008; Makarova et al., 2010). Les composants d'ESCRT-III ont une nomenclature spécifique chez les mammifères où ils sont appelés CHMP (Charged Multivesicular body Proteins). Chez la levure, ESCRT-III est constitué d'un cœur de complexe de quatre protéines suffisant à son activité de scission membranaire (Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010), et qui s'assemblent dans l'ordre suivant: Vps20, Snf7, Vps24, Vps2 (respectivement CHMP6, CHMP4 (A, B et C), CHMP3 et CHMP2(A et B) chez les mammifères)(Teis et al., 2008); et de trois protéines régulatrices périphériques: Did2, Vps60, et Ist1 (increased sodium tolerance) (respectivement CHMP1(A et B), CHMP5 et IST1 chez les mammifères).

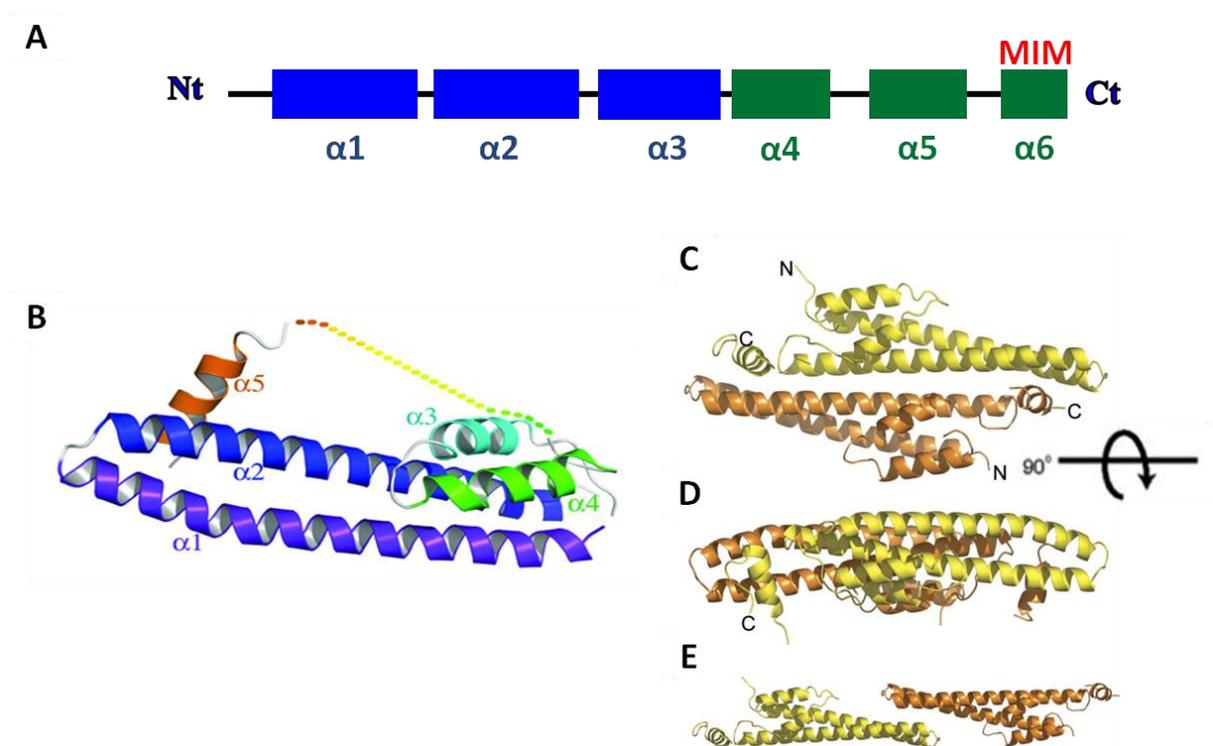
Dans la suite de ce manuscrit, par soucis de clarté la nomenclature des mammifères précédée de l'indice sc (scCHMP) sera employée pour les protéines du complexe ESCRT-III de levure.

Il y a donc 7 protéines ESCRT-III dans la levure, et 12 chez les mammifères incluant plusieurs isoformes de CHMP1, CHMP2 et CHMP4(tableau1). Le rôle respectif de ces isoformes est encore peu connu mais elles pourraient former différents sous-types de complexes ESCRT-III impliqués dans divers processus cellulaires (Carlton et al., 2008).

Contrairement à ESCRT-0, I et II; ESCRT-III ne forme pas un complexe cytosolique stable mais plutôt un polymère extrêmement dynamique s'assemblant de manière transitoire à la surface de membranes (Babst et al., 2002b). La stœchiométrie exacte d'ESCRT-III n'est pas connue, et il n'est pas dit qu'elle soit strictement définie. Toutefois des

complexes ESCRT-III d'environ 450 kDa ont été isolés à partir d'endosomes de levures. ScCHMP4 est la plus abondante des sous-unités au sein de ces complexes (Teis et al., 2008).

Les séquences primaires des protéines CHMPs sont assez différentes, mais présentent toutes la même organisation avec une partie N-terminale basique et une partie C-terminale acide plus courte (figure 5A). La compréhension de l'agencement tridimensionnel des protéines CHMPs provient des résolutions de la structure cristallographique de CHMP3 (Muziol et al., 2006; Bajorek et al., 2009b) (figure 5B). Les deux premières hélices amino-terminales s'agencent en une épingle à cheveux  $\alpha$  (hairpin  $\alpha$ ) de 7nm de long qui, avec les deux suivantes, constituent le cœur de la protéine composé de 150 acides aminés. Cette région est responsable de l'interaction avec les membranes, et de la polymérisation du complexe (Muziol et al., 2006).



**Figure 5 : Structure commune des protéines CHMPs.**

A: Structure secondaire des protéines CHMPs. Les rectangles bleus représentent les hélices  $\alpha$  dont le point isoélectrique (PI) est supérieur à 8, et les verts celles dont le PI est inférieur à 8. La dernière hélice contient le domaine MIM (MIT interacting motif)

B: Structure de CHMP3 8-222 en conformation fermée « inactive » (Bajorek et al., 2009b).

C et D: Structure du « dimère 1 » de CHMP3 8-183.

E: Structure du « dimère 2 » (interaction type bout à bout) de CHMP3 8-183 (Muziol et al., 2006).

Les deux dernières hélices, acides, sont impliquées dans l'interaction intramoléculaire avec le cœur basique de la protéine (Zamborlini et al., 2006). Les protéines CHMPs sont présentes dans le cytosol sous forme de monomères solubles et inactifs (ou peut être de dimères) (Babst et al., 2002b; Shim et al., 2007). La troncature de cette partie C-terminale induit la formation aux membranes de polymères ESCRT-III résistant aux détergents non ioniques (Shim et al., 2007). Comme il a été montré pour CHMP3, les protéines CHMPs semblent donc pouvoir adopter deux types de conformation en solution. Une où la partie C-terminale est repliée sur le cœur de la protéine qui est alors inactive et cytosolique (Lata et al., 2008a; Bajorek et al., 2009b), et une autre, ouverte, pouvant se polymériser et interagir avec les membranes (Zamborlini et al., 2006 Shim et al., 2007). Les mécanismes de régulation permettant la transition entre ces deux états sont encore inconnus tout comme ceux régissant la polymérisation d'ESCRT-III.

Plusieurs interfaces de dimérisation de CHMP3 ont été décrites (Muziol et al., 2006; Bajorek et al., 2009b). Le premier dimère (dimère1) est un assemblage antiparallèle impliquant des interactions le long des épingles à cheveux N-terminale et de leurs 5<sup>èmes</sup> hélices  $\alpha$  (cristallographiée avec CHMP3 tronqué constitué des résidus 8 à 183) (figure5C, D). La deuxième interface (dimère2) consiste en une interaction de type symétrique au niveau des bouts fermés des épingles à cheveux des deux protéines observées qui s'assemblent bout à bout (figure5E) (tiptotip interaction : cristallographiée avec CHMP3 tronqué constitué des résidus 8 à 183 (Muziol et al., 2006) et avec CHMP3 tronqué des 7 premiers acides aminés (Bajorek et al., 2009b)).

Le dimère1 expose sur l'une de ses faces une large surface basique ( $5500\text{\AA}^2$ ) permettant de fortes interactions électrostatiques avec les membranes (Muziol et al., 2006). Les résidus composant cette surface sont parfaitement conservés chez les différents orthologues de CHMP3 depuis la levure jusqu'aux mammifères, mais varient entre les protéines CHMPs humaines. Cette variation pourrait traduire différentes caractéristiques de liaison des CHMPs aux membranes, ou de possibles variations subtiles au niveau de leurs agencements tridimensionnels.

Les extrémités C-terminale des CHMPs comportent deux types de domaines MIM (MIT interaction motif) (MIM1 :CHMP3, CHMP2A et B, CHMP1A et B ; MIM2 : CHMP6, CHMP4 A, B et C, IST1) (Scott et al., 2005a) qui permettent le recrutement direct de

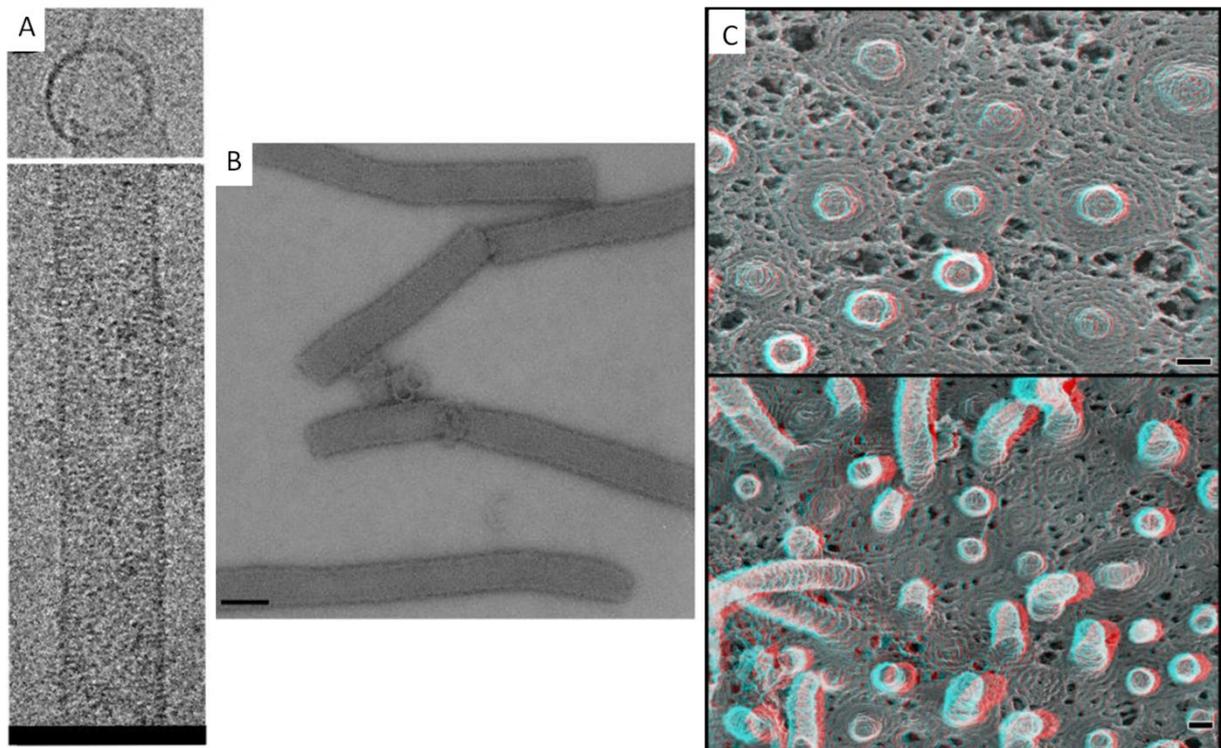
protéines à domaines MIT (Microtubule Interacting) dont VPS4 (A ou B), AAA+ ATPase responsable de la dépolymérisation des complexes ESCRT-III (Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007), voir plus loin ci-dessous). L'extrémité C-terminale de CHMP3 se projette du côté opposé à la surface d'interaction avec les membranes (Muziol et al., 2006). Les protéines CHMPs peuvent donc se lier simultanément aux membranes et aux protéines à domaine MIT.

Les interfaces de dimérisation ainsi que la surface de liaison aux membranes sont nécessaires à l'effet dominant négatif de CHMP3 $\Delta$ C sur le bourgeonnement du HIV (Muziol et al., 2006). Néanmoins aucun élément ne suggère l'existence d'un homodimère ou homopolymère CHMP-3 *In vivo*. Les études faites chez la levure suggèrent plutôt une interaction entre scCHMP3 et scCHMP2 (Babst et al., 2002b) ce qui a été vérifié chez les mammifères pour CHMP3 et CHMP2A (Martin-Serrano et al., 2003; Bajorek et al., 2009b).

Ensemble, CHMP3 et CHMP2A coopèrent pour se lier aux membranes, et les mutants de dimérisation de CHMP3 $\Delta$ C (résidus 1-150) ne sont plus recrutés à la membrane plasmique (Muziol et al., 2006; Lata et al., 2008b). Le recrutement aux membranes est donc dépendant de la polymérisation de ces protéines.

Certaines protéines ESCRTIII peuvent s'assembler en filaments d'environ 5nm, parfois capables de se structurer en assemblages hélicoïdaux plus complexes ((Hanson et al., 2008; Lata et al., 2008b; Bajorek et al., 2009b). Par exemple, *in vitro*, si au moins une des protéines est activée, CHMP3 et CHMP2A polymérisent ensemble pour former de longues structures tubulaires creuses d'une cinquantaine de nanomètres de diamètre (figure 6A, B) (Lata et al., 2008b; Bajorek et al., 2009b). La dimérisation de type bout à bout décrite pour le dimère 2 CHMP3 permet l'interaction avec CHMP2A et la formation de ces tubes (Bajorek et al., 2009b). Ces structures peuvent se lier aux membranes, puisque les surfaces d'interaction membranaire des sous unités les composant sont orientées vers l'extérieur des tubes. VPS4 est recrutée à l'intérieur de ces tubes et les désassemble en présence d'ATP. Leurs extrémités sont en forme de dôme (Lata et al., 2008b). Des calculs énergétiques indiquent que la liaison de la membrane à ce dôme au niveau du cou de la vésicule pourrait engendrer une contrainte élastique sur la membrane, suffisante pour expliquer la scission membranaire par ESCRT-III (Fabrikant et al., 2009), voir chapitre « scission membranaire par ESCRT-III »).

Des structures similaires à ces tubes ont été observées *in vivo* à la membrane plasmique de cellules surexprimant CHMP4A et un mutant catalytiquement inactif de VPS4B (figure6C) (Hanson et al., 2008). La surexpression simple de CHMP4A ou de CHMP4B provoque leur assemblage en fins filaments de 5nm de diamètre qui s'enroulent en forme d'escargot sur la face interne de la membrane plasmique. L'expression d'un mutant de VPS4B incapable d'hydrolyser l'ATP avec l'une de ces protéines, provoque la formation de structures tubulaires hélicoïdales de 100 à 120 nm de diamètre semblant émerger de l'intérieur de ces « escargots », et dressées vers l'extérieur de la cellule. La composition de ces structures n'a pas été déterminée. Il n'est donc pas clair si les isoformes de CHMP4 déforment directement la membrane, ou si elles forment une plateforme qui recrute et structure d'autres CHMPs, comme CHMP2A et CHMP3, qui se polymériseraient alors en forme de tube comme ceux observés *in vitro*. D'autre part, des filaments de CHMP4B ont été obtenus *in vitro* mais aucune structure tubulaire n'a été rapportée jusqu'à présent (Lata et al., 2008b).



**Figure 6 : Structures tubulaires hélicoïdales formées par ESCRT-III**

A et B : Tubes formés par CHMP2 $\Delta$ C-CHMP3 $\Delta$ C *in vitro*, observés par cryo-microscopie électronique (A) ou microscopie électronique avec coloration négative (B) (Barre 100nm) (Lata et al., 2008b).

C : Image en microscopie électronique des tubes et bourgeons émergents sous la membrane plasmique suite à l'expression de CHMP4A et d'un mutant inactif de VPS4 (Hanson et al., 2008) (Barre 100nm).

Bien qu'ils ne fassent pas partie du cœur de la machinerie ESCRT chez la levure, CHMP1B et la partie N-ter d'IST1 (IST1-NTD) forment aussi de longues structures tubulaires *in vitro* qui sont différentes de celles observées avec CHMP2A et CHMP3. En présence de faibles concentrations salines, CHMP1B forme des tubes d'environ 350nm de diamètre. Les structures produites par IST1-NTD ressemblent à des tubes ouverts d'un côté et forment donc un feuillet recourbé d'environ 700nm de diamètre.

Deux autres interactions pouvant former des polymères de CHMP3 ont été décrites. Le cristal de CHMP3 amputé de ses deux hélices  $\alpha$  C-terminales (résidus 1 à 150) présente une interaction entre les bouts fermés des épingles à cheveux  $\alpha$  différente de celle décrite précédemment. En effet, cette interaction n'est plus symétrique, chaque épingle à cheveux  $\alpha$  interagit avec la face opposée de la suivante (Bajorek et al., 2009b). Le bout de chaque épingle à cheveux contient ainsi deux surfaces d'interactions, ce qui permet l'assemblage d'un filament infini de sous unités CHMP3 qui se polymérisent en hélice autour d'un axe central ; chaque tour de l'hélice étant constitué de trois sous-unités (Bajorek et al., 2009b). Vps24 (CHMP3 chez la levure) peut former des filaments hélicoïdaux, *in vitro* (Ghazi-Tabatabai et al., 2008) ; mais la relation entre ces filaments et cette structure cristallographique n'est pas encore établie. D'autre part, ce type d'interaction de part et d'autre de l'épingle à cheveux a pu être observé uniquement dans le cristal de CHMP3 1-150 et pas dans ceux de CHMP3 8-222 et 8-183 (Muziol et al., 2006; Bajorek et al., 2009b) et son implication dans les processus cellulaires dépendant d'ESCRT-III n'a pas été testée.

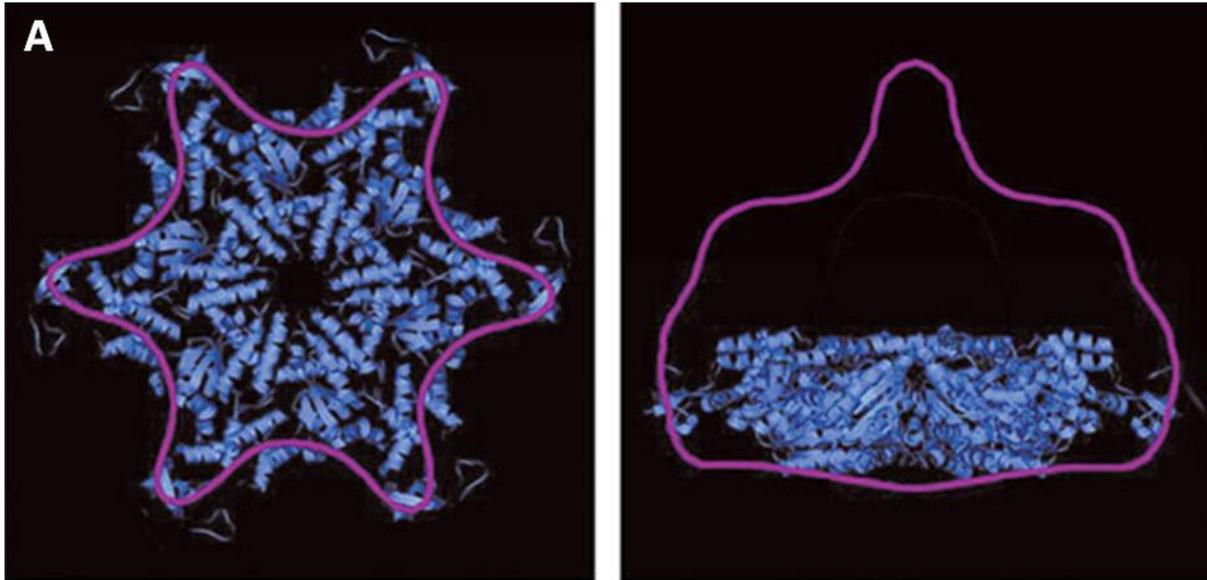
### **1.3.5. Complexe VPS4-VTA1**

Vps4 est une AAA+ATPase qui désassemble le complexe ESCRT-III. Cette opération nécessite la consommation d'ATP et constitue l'apport principal d'énergie dans le cycle de polymérisation d'ESCRTIII. Il n'est pas tout à fait clair si la force motrice fournie par cette hydrolyse d'ATP est directement transmise aux membranes lors du phénomène de scission ou si elle est stockée dans les sous unités d'ESCRTIII qui repeuplent le cytosol après désassemblage du complexe (voire les deux). De récents travaux où la genèse de vésicules par les complexes ESCRT a été reconstituée *in vitro* plaide en faveur de cette dernière hypothèse (Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010).

Il y a une seule isoforme de Vps4 chez la levure et deux chez les mammifères : VPS4A et VPS4B (aussi appelée SKD1). Le rôle respectif de chaque isoforme n'est pas encore connu.

L'extrémité N-terminale de Vps4 contient un domaine MIT (Microtubule Interacting and Transport) caractérisé pour son affinité pour les domaines MIM (MIT domain interacting motif) des sous-unités d'ESCRT-III (Scott et al., 2005a). Une région flexible relie ce domaine MIT à deux domaines AAA ATPase (un grand mixte  $\alpha/\beta$  et petit  $\alpha$ ) qui ressemblent fortement à celui de l'ATPase AAA P97.

Tout comme ESCRTIII, Vps4 est présent dans le cytosol sous forme de monomères (ou de dimères) qui ne s'assemble que transitoirement en un complexe protéique actif (Scott et al., 2005b; Azmi et al., 2008; Gonciarz et al., 2008). Cette oligomérisation est stimulée par l'hydrolyse de l'ATP et l'interaction avec différentes sous unités d'ESCRTIII (Merrill and Hanson, 2010; Shestakova et al., 2010). Vps4 forme un dodécamère constitué de deux cercles hexamériques superposés aux conformations différentes, le tout formant une sorte de bol avec un cercle plus large en haut et un plus compact en dessous (figure 7A) (Inoue et al., 2008; Yu et al., 2008; Landsberg et al., 2009). La structure fine de ce complexe est inconnue. Celle du large pore du haut l'est donc aussi, mais celle du pore du bas semble être analogue à celle de l'AAA ATPase P97 et a ainsi pu être modélisée (Inoue et al., 2008). Les acides aminés formant le pore central de la structure sont très conservés et nécessaires à la fonction de Vps4 (Scott et al., 2005b). Dans le modèle d'étude actuel, basé sur l'analogie avec d'autres AAA+ATPase, les sous unités du complexe ESCRTIII seraient tirées à travers le pore pour être libérées sous forme monomérique soluble dans le cytosol (Scott et al., 2005b; Gonciarz et al., 2008; Merrill and Hanson, 2010; Shestakova et al., 2010).



**Figure 7: structure du dodécamère de VPS4.**

Modèle de la structure d'un hexamère de VPS4 (bleu) placé au sein de la reconstitution du dodécamère de VPS4 obtenue par cryomicroscopie électronique, vue de dessous et de coté (Hanson et al., 2009).

Toutes les sous-unités d'ESCRT-III, excepté CHMP5 (et CHMP7 chez les mammifères), interagissent avec Vps4 via leurs extrémités C-terminales, par deux types de domaines MIM (MIM1 pour CHMP4 et CHMP6, MIM2 pour CHMP2 et CHMP3). Sur le domaine MIT, les surfaces d'interaction des domaines MIM1 et au MIM2 sont distinctes si bien qu'il peut lier les deux en même temps. Les affinités de ces interactions sont assez faibles (constante de dissociation de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) mais l'avidité doit être importante, puisque la concentration de ces domaines MIM est très forte à la surface des complexes ESCRT-III. CHMP2 semble jouer un rôle particulier, puisqu'il est indispensable au désassemblage de complexes ESCRT-III *in vitro* (Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Lata et al., 2008b; Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010). Néanmoins chacune des sous-unités d'ESCRT-III semble participer au recrutement de Vps4 aux endosomes et à son activité (Shestakova et al., 2010).

D'autres protéines (IST1, CHMP1, CHMP5 et VTA1), semblent réguler Vps4 de manière différente des protéines du cœur du complexe ESCRTIII.

VTA1 (LIP5 chez les mammifères) est un dimère qui se lie aux domaines  $\beta$  de Vps4 via son domaine de dimérisation VHL. (Azmi et al., 2006; Azmi et al., 2008; Xiao et al., 2008). Le dimère Vta1 favorise l'oligomérisation, stabilise la structure du dodécamère, stimule son

activité ATPasique. Il comporte lui aussi deux domaines MIT qui se rajoutent alors à ceux de VPS4 (Azmi et al., 2008; Xiao et al., 2008). VTA1 interagit avec CHMP5 (Vps60) qui est probablement impliqué dans son recyclage (Shiflett et al., 2004; Ward et al., 2005; Rue et al., 2008).

CHMP1 et IST1 interagiraient ensemble dans le cytoplasme (Shestakova et al., 2010), et peuvent même former *in vitro* des structures hélicoïdales décrites précédemment dans ce manuscrit (Bajorek et al., 2009a; Bajorek et al., 2009b). Ist1 interagit aussi avec les domaines  $\beta$  et MIT de VPS4 (via ses domaines ELYC, MIM1 et MIM2).

CHMP1 est considéré comme un activateur de Vps4 alors que IST1 l'inhibe (Dimaano et al., 2008; Rue et al., 2008; Nickerson et al., 2010). En fait ces deux protéines semblent réguler le recrutement et l'assemblage du complexe VPS4/VTA1 sur son substrat (ESCRTIII) (Dimaano et al., 2008; Shestakova et al., 2010).

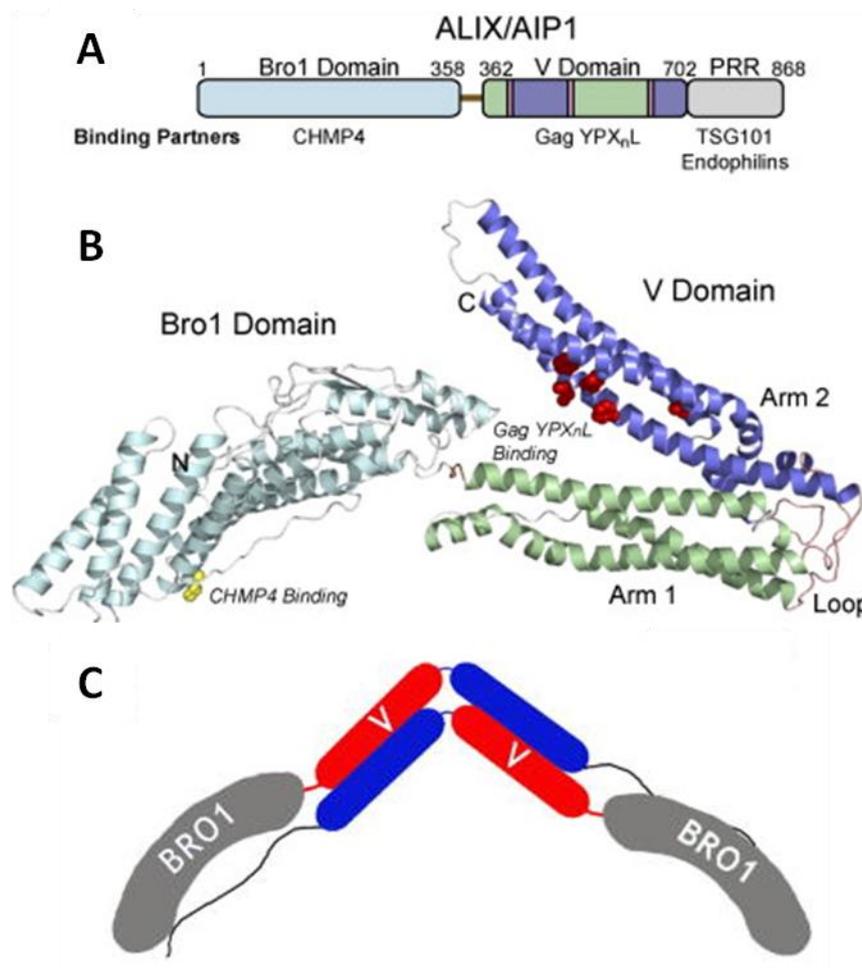
### 1.3.6. Alix.

Alix ne semble pas être impliqué dans la genèse des CMV, puisqu'il ne semble pas être impliqué dans la dégradation du récepteur à l'EGF. Elle est en revanche requise pour le bourgeonnement des virus enveloppés, et le recrutement d'ESCRTIII au corps intermédiaire (Martin-Serrano et al., 2003; Strack et al., 2003; Morita et al., 2007b; Carlton et al., 2008).

Alix est composée de trois domaines principaux : un domaine Bro1 N-terminal, un domaine central en forme de V (V domain), et une partie C-terminale flexible, riche en proline (Prolin-rich domain, PRD). Le domaine Bro1 est recourbé et allongé, et il ressemble aux domaines BAR impliqué dans les courbures de membranes même si aucune activité de ce type n'a été détectée pour Alix (Kim et al., 2005; Pires et al., 2009). CHMP4 (A, B et C) (McCullough et al., 2008) se lie au centre de cette surface concave via son extrémité C-terminale. A une extrémité du domaine Bro1 se situe un site de liaison à la kinase Src impliquant la Tyrosine 319 d'Alix qui est elle-même phosphorylée par Src (Schmidt et al., 2005).

Le domaine en V d'Alix est constitué de onze hélices  $\alpha$ , qui forment deux bras allongés en forme de V (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007c; Zhai et al., 2008). Le motif de liaison à la séquence YPXL (dans le domaine « tardif ») de la protéine virale GAG ( $K_d=5\mu\text{M}$ ) et du recrutement d'Alix au site de bourgeonnement des rétrovirus est situé sur un de ces

bras à l'intérieur du V. Alix peut aussi se dimériser via ce domaine par une interaction antiparallèle pour former une sorte de croissant allongé avec les domaines Bro1 et PRD de différentes protéines au deux bouts (figure8C) (Pires et al., 2009).



**Figure 8: Structure d'ALIX**

**A:** Organisation en domaines d'ALIX humaine.

**B:** Structure tridimensionnelle d'ALIX sans son domaine riche en proline (PRD) qui semble peu structuré (Fisher et al., 2007).

**C:** Modèle de dimérisation d'ALIX via son domaine en V (Pires et al., 2009).

Le PRD semble peu organisé, sa structure n'a pas encore été résolue. Plusieurs modèles d'agencements tridimensionnels ont toutefois été proposés à partir de données obtenues par SAXS (small-angle X-ray scattering)(Shi et al., 2010).

- Le motif GPPX<sub>3</sub>Y permet le recrutement de CEP55 (Lee et al., 2008) et de ALG2 (Suzuki et al., 2008, 2009).

- Le motif P(S/T)XP permet le recrutement d'ESCRTI via son interaction avec TSG101(Strack et al., 2003).

- Le motif PXRPPPP se lie aux endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002). Hck-SH3 (human haemopoietic cell kinase Src homology domain 3) semble aussi être recrutée au niveau de cette séquence (Shi et al., 2010).

Le PRD aussi participe à un processus d'auto inhibition qui masque le domaine Bro1 d'Alix et inhibe son interaction avec CHMP4 (Zhou et al., 2008; Zhou et al., 2009).

#### **1.4. Fonctionnement de la machinerie ESCRT**

La machinerie ESCRT provoque un type de remodelage membranaire original. Elle induit la formation d'un bourgeon de membrane, et d'une constriction à la base de celui-ci que l'on appelle cou de la vésicule. Ensuite, ESCRT-III catalyse la scission des membranes au niveau de ce cou. La particularité de ce système vient du fait que la déformation se fait du cytosol vers le lumen (ou le milieu extérieur); et que contrairement aux vésiculations induites par les protéines de « manteau » (Clathrine, COPI, COPII), la machinerie ESCRT agit sur la face interne du bourgeon et de son cou, et ce sans être emportée à l'intérieur de la vésicule. Il est très difficile d'étudier séparément ces processus de bourgeonnement et de vésiculation *in vivo* puisqu'ils sont intimement liés et extrêmement transitoires. Le mieux caractérisé des phénomènes cellulaires mettant en jeu cette machinerie est la formation des vésicules intra-luminales des CMVs notamment chez la levure. De récents travaux réalisés *in vitro* ont considérablement fait progresser la compréhension de la possible séquence d'évènements aboutissant à la formation des ILV.

##### **1.4.1. Recrutement du cargo ubiquitinylé.**

L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à greffer par un lien isopeptidique un monomère ou polymère du peptide ubiquitine (8kDa) sur une ou plusieurs lysines de la protéine cible. L'ubiquitinylation a d'abord été caractérisée comme un marquage de protéines cytosoliques destinées à la dégradation par le protéasome. Elle sert en fait à une gamme de signalisation beaucoup plus large dont le marquage de protéines membranaires destinées à la dégradation par le lysosome. En effet, la mono-ubiquitinylation sur plusieurs sites (mono-ubiquitination multiple) ou la poly-ubiquitinylation (par la lysine 63

de l'ubiquitine) de protéines membranaires de surface constitue un signal de trafic endosomal vers le lysosome.

La première étape de reconnaissance du cargo se fait donc par ESCRT-0 qui est recruté aux membranes des endosomes précoces par son interaction avec le phospholipide PIP3 via le domaine FYVE de HRS (Misra and Hurley, 1999; Raiborg et al., 2001b; Stahelin et al., 2002).

Chaque complexe ESCRT-0 contient aussi cinq domaines de liaison à l'ubiquitine. Une fois ESCRT-0 lié aux membranes, ces sites peuvent coopérer pour former des interactions de forte avidité avec les cargos poly-ubiquitinylés (Ren and Hurley, 2010), et les regrouper en « clusters » (Wollert and Hurley, 2010).

ESCRT-0 et son cargo se concentrent au niveau d'un manteau plat de clathrine que Hrs recrute aux endosomes (ter Haar et al., 2000; Raiborg et al., 2001a; Sachse et al., 2004). Ce manteau pourrait donc former au sein des endosomes précoces des réservoirs locaux de cargos.

ESCRT-0 pourrait donc initier la séquence de recrutement des différents complexes ESCRT aux cargos via l'interaction entre Hrs et TSG101 d'ESCRT-I (Bache et al., 2003; Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003).

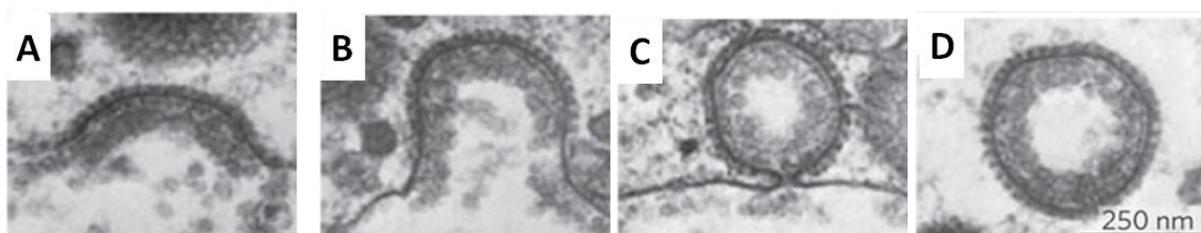
Ces trois complexes sont recrutés séquentiellement aux endosomes dans leur ordre numérique (Katzmann et al., 2001; Babst et al., 2002b; Babst et al., 2002a; Katzmann et al., 2003). Ils pourraient s'associer pour former un super-complexe autour du cargo, ou se succéder sur celui-ci. ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II lient tous trois la même poche hydrophobe de l'ubiquitine. Or ils ne peuvent pas se lier en même temps à la même molécule d'ubiquitine. Il est donc supposé que le cargo passe d'un complexe à l'autre. Mais contrairement à ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II n'ont qu'un seul domaine de liaison à l'ubiquitine, et il est peu vraisemblable que le cargo puisse voyager le long de la tige rigide qui sépare le domaine de liaison à l'ubiquitine d'ESCRT-I de celui d'ESCRT-II. De plus, cette liaison est coopérative (Shields et al., 2009). Il est donc plausible que ces complexes puissent ensemble former une structure beaucoup plus importante autour du cargo.

De récentes données obtenues *in vitro* vont dans ce sens. Thomas Wollert et James H. Hurley ont reconstitué *in vitro* une vésiculation autour d'un cargo ubiquitinylé semblable à ce qui se passe au niveau des endosomes, en ajoutant séquentiellement des complexes ESCRT composés de protéines recombinantes de levures à des liposomes unilamellaires géants (GUV : Giant Unilamellar Liposomes), (Wollert and Hurley, 2010). Ces expériences confirment la capacité d'ESCRT-0 à concentrer les cargos dans des régions membranaires, et à recruter le reste de la machinerie ESCRT à ces domaines. ESCRT-I et ESCRT-II se concentrent tout deux au cou du bourgeon où ils créent une barrière de diffusion à la membrane empêchant ainsi la sortie du cargo indépendamment d'ESCRT-0.

Toutes ces observations aboutissent au modèle suivant : ESCRT-0 serait recruté aux endosomes précoces riche en PI3P par son domaine FYVE. Par ses multiples domaines de liaison à l'ubiquitine. Il concentrerait ensuite les cargos dans des micro-domaines membranaires formés de manteaux plats de Clathrine. Il recruterait alors ESCRT-I et ESCRT-II aux bords de ces domaines pour piéger le cargo dans le bourgeon.

#### 1.4.2. Formation du bourgeon:

La première étape de la vésiculation est le remodelage membranaire qui provoque la formation d'une sphère l'on appelle bourgeon, encore lié à la membrane d'origine par une tige ouverte : le cou (figure9C).



**Figure 9 : Les phases de la vésiculation.**

Principe général de la vésiculation illustré par l'exemple du bourgeonnement de vésicules recouvertes de clathrine visualisées à différentes étapes par microscopie électronique à transmission. La courbure de la membrane par des facteurs protéiques (A et B) aboutit à la formation d'un bourgeon relié à membrane d'origine par un fin cou (C). La scission de la membrane au niveau de ce cou aboutit à la libération de la vésicule

La surexpression d'une forme tronquée de CHMP4A ou de la forme entière avec un mutant inactif de VPS4B, provoque l'apparition de bourgeons et de filaments à la membrane

plasmique dans une topologie similaire à celle de la formation des VIL (Hanson et al., 2008). De plus, ESCRT-III (scCHMP6 et scCHMP4) est capable *in vitro* d'induire des déformations membranaires semblables à des bourgeons (Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009a). Plusieurs modèles expliquant la formation du bourgeonnement par ESCRT-III ont donc été proposés :

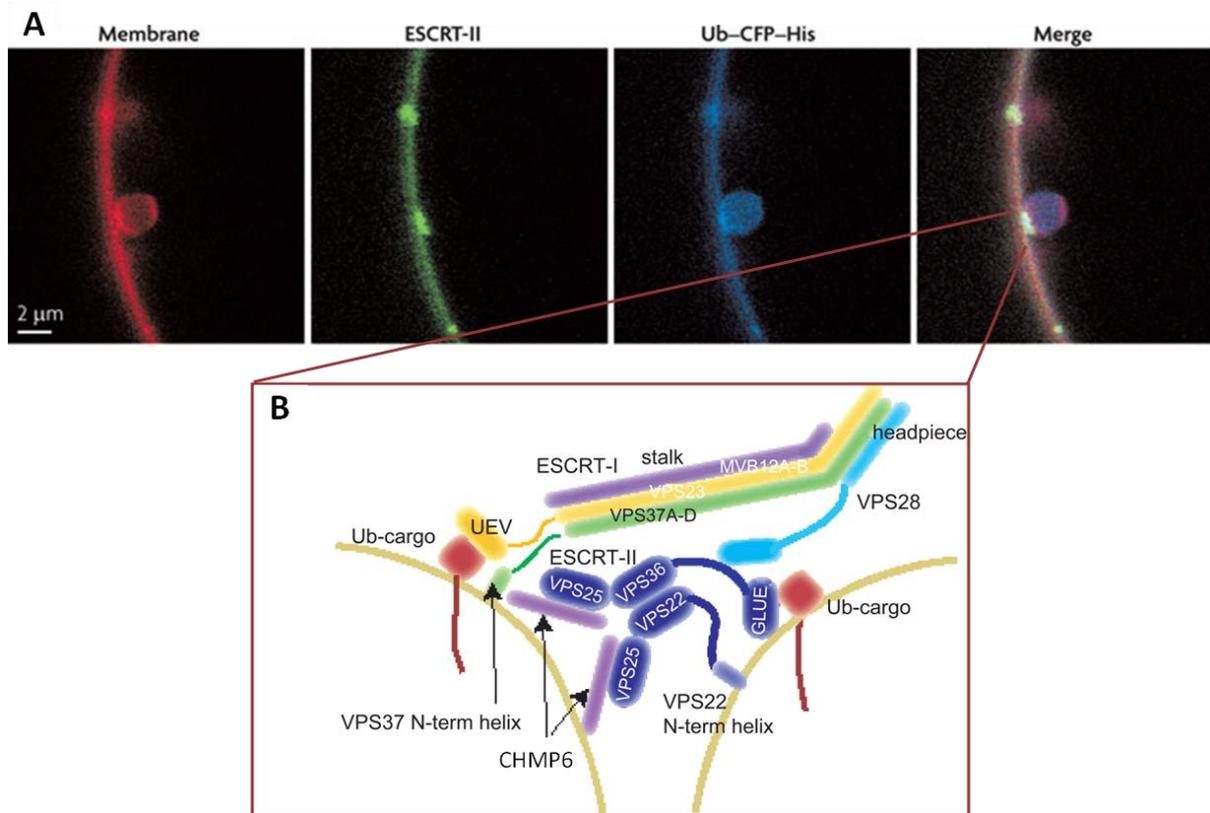
- Un filament circulaire ou en forme de spirale de CHMP4 pourrait directement induire ou stabiliser la courbure négative de la membrane à l'intérieur du bourgeon un peu à la manière de la protéine impliquée dans la formation des filipodes, IRSp53 (figure....) (Mattila et al., 2007; Hanson et al., 2008).
- Les filaments circulaires d'ESCRT-III entoureraient les cargos ubiquitylés, et les piègeraient ainsi en empêchant leur diffusion latérale. Vps4 serait alors recruté et désassemblerait séquentiellement le filament, qui se réassemblerait à chaque cycle avec un diamètre plus petit, ce qui provoquerait la formation du bourgeon.

Mais cette année, dans de récents travaux de reconstitution *in vitro* de la formation des VIL par la machinerie ESCRT, l'équipe de James Hurley a montré pour la première fois qu'ensemble les complexes ESCRT-I et ESCRT-II peuvent aussi provoquer des bourgeonnements de membranes (Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010). Contrairement à ScCHMP6 et scCHMP4 qui ne provoquent ces déformations qu'à forte concentration (600nM pour scCHMP4) ESCRT-I et ESCRT-II les induisent à des concentrations inférieures (15nM) à celles estimés physiologiques (environ 75nM). De plus, ESCRT-I et ESCRT-II ne sont pas détectables à l'intérieur du bourgeon comme observé *In Vivo*, alors que les vésicules formées par ESCRT-III n'excluent pas les protéines de leurs lumens. Il est donc probable qu'ESCRT-I et ESCRT-II soient les acteurs de ce bourgeonnement.

L'absence d'ESCRT-I et ESCRT-II à l'intérieur du bourgeon suggère qu'ils ne le façonnent pas en formant un manteau à la membrane comme le font la Clathrine ou les protéines COPII. Il semblerait plutôt qu'ils agissent au niveau du cou de la vésicule où ils se concentrent.

Séparément, ESCRT-I et ESCRT-II ne forment pas de bourgeon; ils ont une très forte affinité l'un pour l'autre et forment un super-complexe aux membranes (figure9) (Gill et al.,

2007). Le bourgeonnement est donc la caractéristique de ce super-complexe. Sa structure est encore inconnue mais d'après celles d'ESCRT-I et d'ESCRT-II, ils peuvent former un long dimère où les domaines de liaison aux membranes de chaque complexe sont séparés d'au moins 18nm par une tige rigide. Ces bourgeonnements étant rares et extrêmement transitoires, la taille précise du cou n'est pas connue. Cependant les vésicules intra-luminales ont un diamètre d'environ 25nm chez la levure et 50nm chez l'humain. Le cou du bourgeon doit donc être inférieur à ces valeurs, c'est-à-dire de l'ordre de grandeur d'un dimère ESCRT-I/ESCRTII qui pourrait donc le stabiliser.



**Figure 10 : Bourgeonnement membranaire par ESCRT-I et ESCRT-II.**

A: Reconstitution sur liposomes géants du bourgeonnement membranaire induit par ESCRT-I et ESCRT-II. La photo de gauche représente la membrane, la deuxième la localisation d'ESCRT-II au cou du bourgeon et son absence dans la vésicule. La troisième montre la présence du cargo ubiquitinylé dans le bourgeon. La dernière, la superposition de ces trois images (Wollert and Hurley, 2010).

B: Organisation schématique du super complexe : ESCRT-I/ESCRT-II au cou du bourgeon (Hurley, 2010).

Le nombre de ces dimères nécessaires à la formation d'un bourgeon, la cinétique, les mécanismes de déformation membranaire de ce super-complexe sont encore inconnus, et plusieurs pièces semblent manquer au puzzle.

- Les vésicules obtenues *In Vitro* mesurent 2 $\mu$ m de diamètre soit 130 fois la taille des VIL de levure. La taille des vésicules est donc certainement déterminée par d'autres facteurs influençant la tension et la courbure membranaires.

- Des expériences de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) montrent que le super-complexe ESCRT-I/II séquestre le cargo ubiquitinylé. Est-ce le fait de ses domaines de liaison à l'ubiquitine, ou forme-t-il une barrière à la membrane limitant la diffusion des protéines transmembranaires ?

- Dans la levure, la genèse des ILV peut être restaurée chez les mutants de délétion d'ESCRT-I par surexpression d'ESCRT-II (Babst et al., 2002b), alors que la surexpression d'ESCRT-I n'a aucun effet chez les mutants de délétion d'escrtII. Ces résultats suggèrent qu'*in vivo* ESCRT-II possède cette capacité de déformation membranaire indépendamment d'ESCRT-I.

ESCRT-II semble donc jouer un rôle central dans la formation du bourgeon précédant les VIL. Ce complexe n'est cependant pas requis dans la cytokinèse ou le bourgeonnement du VIH. Dans ces situations, le « bourgeon » est une des cellules filles ou le virus naissant. L'activité de bourgeonnement et de formation du cou est alors exercée par les mécanismes de formation du corps intermédiaire (anneau contractile, microtubules...), ou la protéine GAG pour le VIH.

#### 1.4.3. **Scission membranaire.**

La formation du bourgeon n'est pas suffisante pour produire des vésicules. Un mécanisme de scission membranaire nécessitant un apport d'énergie substantiel et catalysé par ESCRT-III est nécessaire pour la séparation de la vésicule et de la membrane d'origine.

Dans le cadre de la genèse des VIL, ESCRT-II serait responsable du recrutement d'ESCRT-III au cou du bourgeon et de sa polymérisation via l'interaction entre CHMP6 et Vps25 (Teo et al., 2004b; Im et al., 2009; Saksena et al., 2009; Teis et al., 2010; Wollert and Hurley, 2010). Le simple recrutement aux endosomes de CHMP6 ne dépend pas d'ESCRT-II puisque qu'elle est constitutivement associée aux membranes sous forme monomérique

inactive par myristoylation dans sa partie Nterminale (Babst et al., 2002a; Yorikawa et al., 2005). L'interaction avec ESCRT-II permet plutôt le ciblage et l'activation de CHMP6 au cou du bourgeon où elle induit alors l'assemblage d'ESCRT-III (Teo et al., 2004b; Teis et al., 2010).

Chaque ESCRT-II contient deux molécules de Vps25 qui constituent les deux « bras » du Y que forme ce complexe (figure11). Une seule molécule (ou « bras ») de Vps25 est pourtant suffisante pour induire la polymérisation d'ESCRTIII, mais pas pour sa fonction (Teis et al., 2010). En effet les deux molécules sont nécessaires pour à la dégradation des cargos. Il a donc été proposé que chaque complexe ESCRT-II coordonne la formation de deux polymères ESCRT-III. Mais aucune donnée expérimentale n'a encore montré l'existence de ces deux filaments.

Chez la levure, le cœur d'ESCRT-III responsable de la scission membranaire est composé de scCHMP6, scCHMP4, scCHMP3 et scCHMP2. La stœchiométrie exacte de ce complexe n'est pas connue, mais sa séquence d'assemblage a été caractérisée dans la levure (Teis et al., 2008) et la scission de cou de vésicules par ce cœur de complexe a pu être reconstituée *in vitro* (Teis et al., 2008; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009a; Teis et al., 2010; Wollert and Hurley, 2010). L'ensemble de ces expériences a abouti au modèle suivant: ScCHMP6 serait le « nucléateur » du complexe. Son recrutement au cou du bourgeon par ESCRT-II l'activerait et induirait le recrutement et la polymérisation à la membrane de scCHMP4 en un filament enroulé. ScCHMP3 qui serait une protéine de coiffe (capping protein), bloquerait la polymérisation à 10-20 molécules de scCHMP4 par filament. *In vitro*, scCHMP6, scCHMP4, et scCHMP3 sont suffisants pour induire la scission (Wollert et al., 2009a; Wollert and Hurley, 2010), mais scCHMP2 et Vps4 sont nécessaires pour permettre plusieurs cycles de vésiculation. ScCHMP3 se lierait donc à scCHMP2 qui recruterait le complexe Vps4/Vta1 sur le filament permettant ainsi son démantèlement et le recyclage ses sous-unités d'ESCRT-III vers le cytosol.

*In vitro*, scCHMP3 seul limite la polymérisation de scCHMP4 à la membrane. Mais dans la levure, la délétion de scCHMP2 ou de VPS4 provoque la formation de complexes ESCRT-III beaucoup plus longs (Teis et al., 2008). Il est donc possible qu'*in vivo* ce soit l'ensemble scCHMP3-scHMP2-scVps4 qui contrôle la taille du filament d'ESCRTIII et peut être la vésiculation plutôt que scCHMP3 seul.



**Figure 11: Modèle d'assemblage d'ESCRT-III par ESCRT-II:**

Deux molécules de VPS25 (rectangles jaunes) recrutent deux scCHMP6 (rectangles gris) ce qui l'active et lui permet de nucléer la polymérisation de scCHMP4 (Teis et al., 2010). L'élongation de ce polymère est stoppée par scCHMP3 (rectangle bleu foncé) et scCHMP2 (rectangle bleu clair). Un complexe ESCRT-II induit donc la polymérisation de deux filaments d'ESCRT-III qui pourraient s'agencer de différentes manières.

Ce modèle propose une séquence d'assemblage d'ESCRT-III, mais il ne rend pas compte de l'arrangement tridimensionnel du complexe, et n'explique pas comment les filaments d'ESCRT-III procèdent à cette scission. Le remodelage et la scission membranaire nécessitent un apport substantiel d'énergie (Chernomordik and Kozlov, 2003; Kozlov et al., 2010). Un modèle énergétiquement plausible de scission membranaire par des structures ESCRT-III a été proposé, basé sur les travaux de l'équipe de Winfried Wiessenhorn (figure 11) (Fabrikant et al., 2009). CHMP2A et CHMP3 s'assemblent *in vitro* pour former des structures tubulaires hélicoïdales aux extrémités en forme de dômes (Lata et al., 2008b; Bajorek et al., 2009b). Les surfaces basiques d'interaction membranaire de ces CHMPs sont orientées vers l'extérieur des tubes et permettent de fortes interactions électrostatiques avec les membranes riches en lipides anioniques. Des structures semblables ont été observées *in vivo* à la membrane plasmique de cellules surexprimant CHMP4A et un mutant inactif de VPS4

(Hanson et al., 2008). Selon le modèle, l'adhérence de la membrane au dôme constitué par CHMP2A et CHMP3 provoque un rétrécissement du cou du bourgeon et l'accumulation de stress élastique (figure11C). Quand le diamètre du cou atteint environ 3nm, le relâchement de ce stress qu'accompagne la fission du cou rend celle-ci énergétiquement favorable, et le cou se scinde au dessus du dôme.

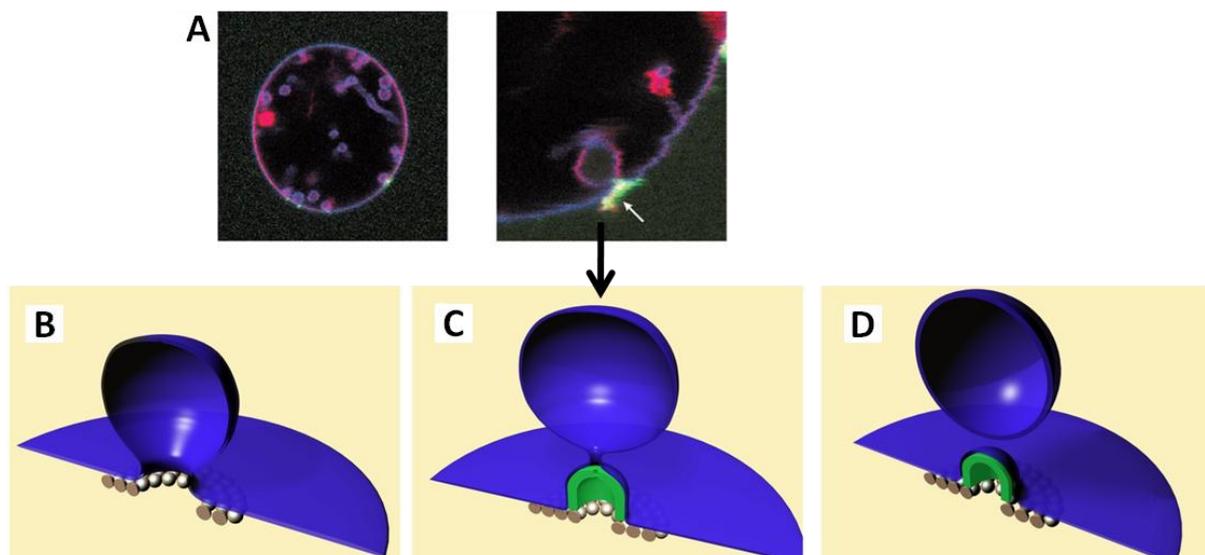
Ce modèle requiert plusieurs choses :

- Le « tube » de membrane que constitue le cou du bourgeon doit être formé avant l'assemblage du dôme à ce site. Comme nous l'avons vu précédemment ces remodelages membranaires pourraient être assurés par ESCRT-I et ESCRT-II pour les CMV, par la formation du corps intermédiaire pour la cytokinèse, et par GAG pour le VIH.

- La rigidité du dôme doit être largement supérieure à celle la membrane au risque que celui-ci s'effondre, et VPS4 pourrait participer à cette rigidité.

- Dans cette configuration, l'affinité entre la membrane et les structures ESCRTIII requise pour permettre la scission du cou dépend fortement de la surface de la vésicule. Plus la vésicule est petite, plus le coût énergétique de la courbure membranaire est élevé, et donc plus cette affinité doit être forte. Cette modélisation estime que dans ces structures les énergies d'interaction entre les monomères de CHMP2 et CHMP3 et la membrane (Lata et al., 2008b) sont sensiblement supérieures à celles requises pour le bourgeonnement de vésicules de 20nm (tailles de plus petites vésicules de CMV que nécessiteraient donc la plus forte affinité).

Ce modèle est donc énergétiquement plausible, et propose un mécanisme de scission membranaire qui explique l'absence d'ESCRT-III dans la vésicule.



**Figure 12: Bourgeoisement membranaire par ESCRT-I et ESCRT-II**

A: Reconstitution sur liposomes géants du bourgeoisement membranaire induit par ESCRT-I et ESCRT-II. La photo de gauche représente la membrane, la deuxième la localisation d'ESCRT-II au cou du bourgeois et son absence dans la vésicule. La troisième montre la présence du cargo ubiquitylé dans le bourgeois. La dernière, la superposition de ces trois images (Wollert and Hurley, 2010).

B: Organisation schématique d'ESCRT-I et ESCRT-II au cou du bourgeois (Fabrikant et al., 2009).

Dans ce système, l'énergie nécessaire à la fission serait donc fournie par l'établissement de fortes interactions des sous unités d'ESCRT-III entre elles et avec les membranes lors de la polymérisation du complexe. L'énergie stockée dans les monomères de CHMPs cytosoliques serait dépensée lors de la polymérisation et réintroduite dans le système pour un nouveau cycle lors du démantèlement du complexe, grâce à l'hydrolyse d'ATP par VPS4.

Il y a peu de données sur la composition et la polymérisation d'ESCRT-III chez les mammifères. La séquence d'assemblage est supposée être la même que sur les endosomes de levure, mais la multiplication des fonctions cellulaires impliquant ESCRT-III et la présence de plusieurs isoformes de CHMP1, CHMP2 et CHMP4 suggèrent l'existence de différents complexes qui peuvent varier dans leurs compositions, modalité d'assemblage, ou même dans leurs propriétés mécaniques.

Par exemple, la surexpression de protéines CHMPs fusionnée à un gros peptide comme la GFP en position N-terminal exerce la fonction de dominant négatif (REF) mais celles des différentes isoformes de CHMP4 ont des effets contrastés. En effet, la surexpression YFP-CHMP4C dans des cellules hela inhibe la cytokinèse beaucoup plus fortement que celles d'YFP-CHMP4A ou d'YFP-CHMP4B. Cette dernière quant à elle a le plus fort impact sur le bourgeoisement du VIH (Carlton et al., 2008). Les différentes isoformes de CHMP4 semblent donc avoir des implications diverses dans les différents processus cellulaires qui impliquent ESCRT-III. Il est possible que chacune soit spécialisée dans certains d'entre eux, ou qu'il y ait un assortiment de celles-ci qui varie selon la fonction cellulaire impliquée.

Le mode de recrutement et de nucléation d'ESCRT-III semble aussi varier. ESCRT-II et CHMP6 sont bien impliqués dans le trafic de récepteurs de surface vers le lysosome, mais

pas dans les autres processus cellulaires nécessitant la scission de membranes par ESCRT-III comme la cytokinèse, ou le bourgeonnement du VIH (Langelier et al., 2006; Morita et al., 2007b; Morita et al., 2010). Ces autres phénomènes impliquent la protéine Alix qui est comparable au complexe ESCRT-II/CHMP6 sur plusieurs points:

- Comme ESCRT-II/CHMP6, Alix se lie à la fois ESCRT-I, (via son interaction avec TSG-101) (Martin-Serrano et al., 2003; Strack et al., 2003) et avec ESCRT-III (via son interaction avec CHMP4) (McCullough et al., 2008). Alix pourrait donc faire le pont entre ESCRT-I et ESCRT-III.
- ESCRT-II se lie avec le cargo qui est destiné à la vésicule (Slagsvold et al., 2005; Hirano et al., 2006b), et Alix interagit directement avec GAG, protéine de structure du VIH (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007c; Zhai et al., 2008).
- Alix et CHMP4 sont nécessaires à la scission membranaire dans le cas de la cytokinèse et du bourgeonnement de certains virus comme le VIH (Irie et al.; Martin-Serrano et al., 2003; Strack et al., 2003; Chen et al., 2005; Fisher et al., 2007).
- Alix se dimérise. Comme ESCRT-II/CHMP6, un dimère d'Alix possède deux sites d'interaction à CHMP4 et peut alors lier deux filaments d'ESCRT-III (Pires et al., 2009).
- Dans la levure la dégradation du cargo dans les mutants d'ESCRT-I est restaurée par la surexpression d'ESCRT-II. L'extinction de TSG101 inhibe le bourgeonnement du HIV qui est aussi partiellement restaurée par la surexpression d'ALIX (Fisher et al., 2007). Cette restauration dépend de l'interaction entre ALIX et CHMP4 (Usami et al., 2007).

Alix est donc le candidat idéal pour se substituer à ESCRT-II pour recruter ESCRT-III aux sites de scission membranaire, et peut être l'activer. Mais aujourd'hui aucune donnée expérimentale ne démontre ces hypothèses directement.

#### **1.4.4. Désassemblage d'ESCRT-III**

ESCRT-III ne s'assemble que transitoirement aux sites de scission membranaire, il est sujet à un cycle de polymérisation-dépolymérisation contrôlé par d'autres facteurs. ESCRT-II et peut être Alix semblent en charge du déclenchement de la formation de ce complexe,

VPS4/VTA1 de son désassemblage et du recyclage des sous unités vers le cytosol (Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Lata et al., 2008b; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009a).

Bien que la délétion de Vps4 dans la levure augmente l'association d'ESCRT-I et ESCRT-II aux membranes, leur dissociation ne semble pas être le fait de Vps4 (Nickerson et al., 2010).

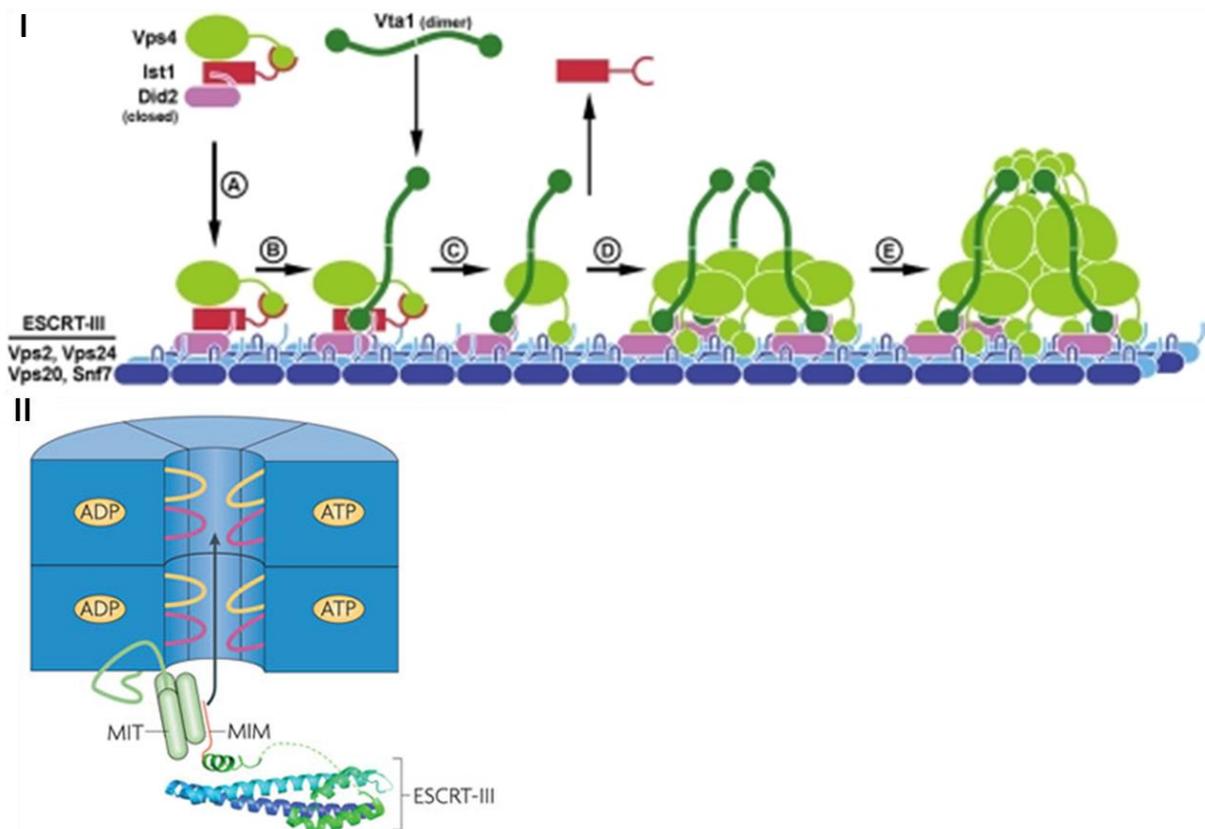
Contrairement à ESCRT-II et ALIX, le rôle de VPS4 est récurrent dans toutes les fonctions physiologiques impliquant ESCRT-III (genèse des CMV, autophagie, cytokinèse, bourgeonnement viral, division des archaebactéries...).

La liaison du complexe VPS4/VTA1 et ESCRT-III passe par les interactions entre le domaine MIT de l'ATPase et les motifs MIM des CHMPs. Ces motifs se divisent en deux sous-catégories (MIM1 et MIM2), qui se lient de manière non exclusive à deux différentes surfaces du domaine MIT de VPS4 (Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007; Kieffer et al., 2008). scCHMP2 est indispensable au désassemblage d'ESCRT-III et son domaine MIM2 présente la plus forte interaction avec Vps4 (Teis et al., 2008; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009a). Mais les autres domaines MIM notamment celui de scCHMP4 semblent aussi jouer un rôle non négligeable. Si ces motifs ont chacun une affinité faible pour VPS4, leur très forte concentration à la surface du complexe ESCRT-III les rends essentiels pour le recrutement, l'assemblage et l'activation du dodécamère VPS4 (Merrill and Hanson, 2010; Shestakova et al., 2010).

Le complexe VPS4 est présent sous forme de monomères dans le cytosol, et s'assemble en un dodécamère cylindrique sur le complexe ESCRT (Scott et al., 2005b; Azmi et al., 2008; Gonciarz et al., 2008). Un modèle de travail (fig) expliquant la séquence d'évènements qui aboutit à l'assemblage du complexe Vps4/Vta1 sur le complexe ESCRTIII aux endosomes de levure a été proposé au terme d'un élégant travail de l'équipe de Markus Babst (figure13). (Dimaano et al., 2008; Shestakova et al., 2010). Selon ce modèle, scCHMP1 et Ist1 interagiraient dans le cytoplasme. Ce complexe se lierait ensuite à Vps4 par l'intermédiaire de Ist1 qui interagit avec le domaine  $\beta$  de l'ATPase (via son domaine ELYC) et son domaine MIT (via ses domaines MIM1 et MIM2). Ce trimère serait alors recruté sur le complexe ESCRTIII via l'interaction entre scCHMP3, scCHMP2 et ScCHMP1. Un dimère de Vta1 serait ensuite recruté au site d'assemblage par interaction entre un de ses domaines

MIT et le domaine MIM de scCHMP1 (Azmi et al., 2008). Ist1 masquerait les sites de liaison de Vta1 et du cœur d'ESCRTIII avec Vps4. Un réarrangement de Vps4 devrait alors remplacer le facteur de recrutement Ist1 par celui d'assemblage Vta1 et le complexe ESCRTIII et ainsi permettre l'assemblage du dodécamère.

Les mécanismes par lesquels VPS4 dépolymérise le complexe ESCRT-III ne sont pas connus. Mais les résidus formant le pore du dodécamère, sont conservés à travers les espèces, et sont indispensables à l'activité de VSP4 (Scott et al., 2005b). Par analogie avec les autres AAA+ ATPases, il a donc été proposé que les sous-unités du polymère ESCRT-III sont tirées vers et à travers le pore pour être libérées sous forme soluble dans le cytosol (Scott et al., 2005b; Gonciarz et al., 2008; Yu et al., 2008).



**Figure 13: Assemblage et fonctionnement de VPS4.**

**I:** Modèle de travail de l'assemblage de VPS4 sur son substrat dans la levure. Le complexe IST1/scCHMP1 interagit avec VPS4 dans le cytosol et le recrute aux complexes ESCRT formés sur les membranes (A). Un dimère de VTA1 est recruté par CHMP1 et prend la place sur Vps4 d'IST1 qui est renvoyé dans le cytosol (B et C). Le dodécamère pourrait alors se former (D et E) (Shestakova et al., 2010).

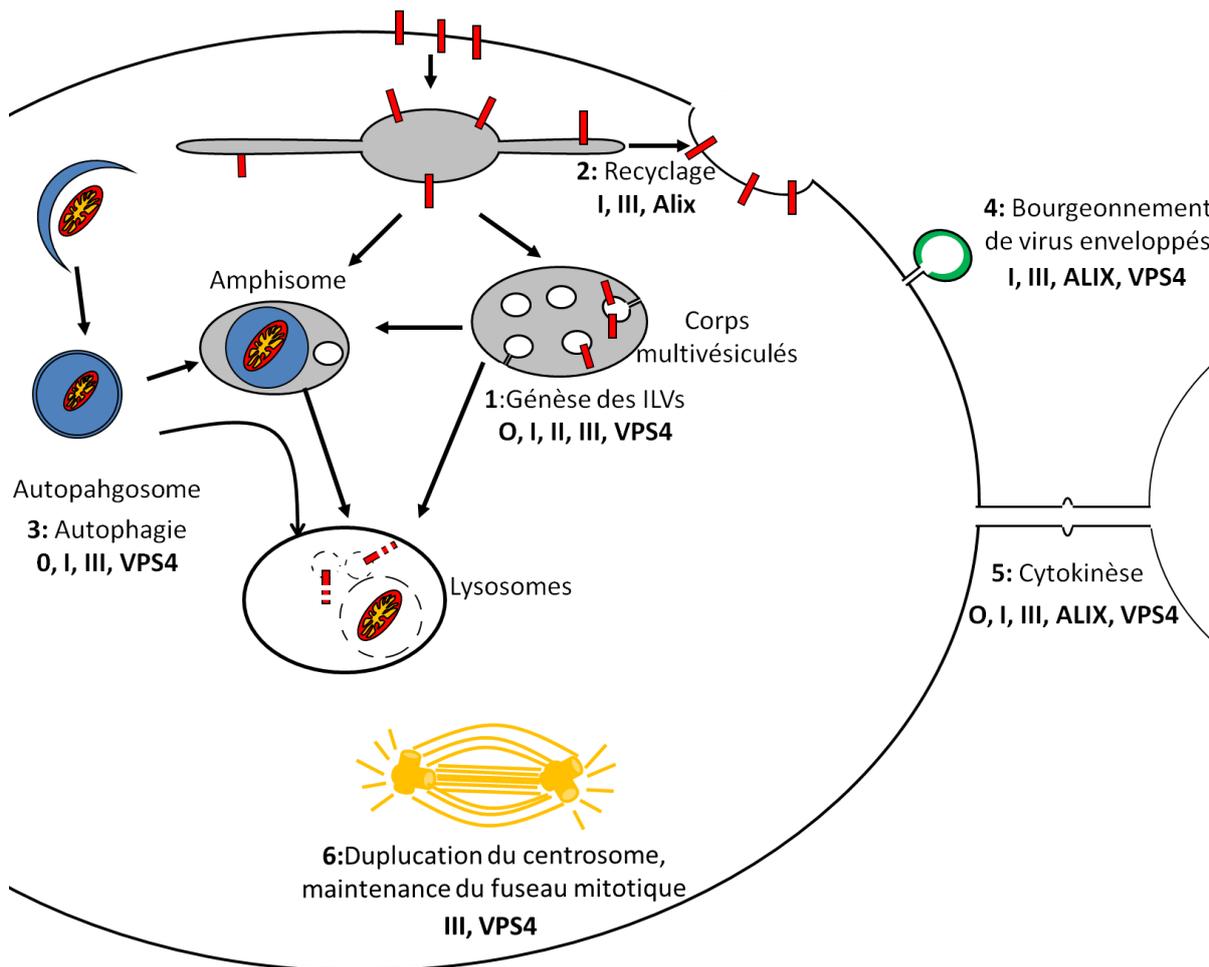
**II:** Schéma de travail du désassemblage du complexe ESCRT-III par VPS4: VPS4 recrute les sous-unités d'ESCRT-III par l'interaction entre le domaine MIM et MIT. Puis VPS4 transforme l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP

en mouvements des boucles à l'intérieur du pore qui provoquent alors un changement de conformation des composants d'ESCRT-III lors de leur passage dans ce tunnel, pour être libérés dans le cytoplasme sous forme soluble (Hurley and Hanson, 2010).

Il a été montré récemment que dans la levure, ces protéines régulatrices de Vps4 étaient capable de moduler le nombre (CHMP5 et Vta1) et la taille (CHMP1) des VIL (Nickerson et al., 2010). Or, toujours dans la levure, la surexpression de scCHMP4 qui génère des complexes ESCRT-III anormalement grands augmente la taille de VIL de manière semblable à la délétion de CHMP5 (Teis et al., 2010). Enfin Vps4 semble être requis pour contrôler la taille du filament ESCRT-III dans la levure (Teis et al., 2008). La régulation du complexe ESCRT-III, peut être par le complexe Vps4, pourrait donc être liée à la taille des VIL.

### **1.5. Rôles physiologiques**

La liste des fonctions cellulaires impliquant les ESCRTs s'est considérablement allongée depuis la découverte de leur rôle dans le transport de protéines vers la vacuole chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette machinerie a maintenant été caractérisée dans de nombreux processus cellulaires, comme le trafic endosomal, la cytokinèse, le bourgeonnement de virus enveloppés, l'autophagie, certaines maladies neurodégénératives...



**Figure 14 : Fonctions cellulaires impliquant ESCRT-III.**

1 : Les récepteurs de surface ubiquitinylés destinés à la dégradation lysosomale sont reconnus et regroupés par ESCRT-0 au niveau des endosomes précoces puis transférés à ESCRT-I et II. Ces derniers forment des bourgeons contenant les récepteurs avec la membrane limitante de l'endosome. ESCRT-III permet la fission au niveau du cou de ce bourgeon, et la libération des VIL dans le lumen. VPS4 permet de recycler les CHMP des endosomes vers le cytosol par hydrolyse de l'ATP.

2 : ESCRT-I, ESCRT-III ainsi qu'ALIX sont nécessaires au recyclage de récepteurs comme l'EGFR.

3 : L'autophagie d'organelles ou d'agrégats protéiques passe par la formation d'un autophagosome puis par la fusion de ce dernier avec le lysosome ou d'autres organelles plus précoces. La machinerie ESCRT est requise pour ce processus. ESCRT-III pourrait participer à la maturation de l'autophagosome. Alternativement, la machinerie ESCRT pourrait participer à la fusion de l'autophagosome avec les organelles de la voie endolysosomale.

4 : L'étape finale de séparation du bourgeon viral et de la cellule hôte est assurée par ESCRT-III pour de nombreux virus enveloppés comme le HIV. ESCRT-I, ALIX et l'ubiquitinylation de la protéine de la capsid GAG, sont employés à des degrés divers en fonction des virus.

5 : ESCRT-I, ALIX et ESCRT-III sont recrutés au corps intermédiaire pour accomplir la fission membranaire nécessaire à la séparation des cellules filles

6 : Tout comme ALIX et ESCRT-I, ESCRT-III et VPS4 sont recrutées au centrosome. Ces deux derniers sont nécessaires à la duplication du centrosome et au maintien de l'intégrité du fuseau mitotique.

### **1.5.1. ESCRT et trafic des protéines de surface.**

#### **1.5.1.1. Dégradation des protéines de surface.**

Comme évoqué précédemment dans ce manuscrit, c'est l'étude du trafic vésiculaire à travers et vers la voie endosomale (figure1) qui a permis la découverte des complexes ESCRT. Les protéines de surface destinées à la dégradation sont marquées par leur ubiquitinylation (Hicke, 2001). Excepté ESCRT-III, les complexes ESCRT possèdent tous des domaines de liaison à l'ubiquitine qui sont impliqués dans la reconnaissance de ce signal (Katzmann et al., 2001; Bilodeau et al., 2002; Shih et al., 2002; Mizuno et al., 2003; Urbe et al., 2003; Alam et al., 2004). Les critères exacts que doit remplir un cargo pour être pris en charge par ESCRT sont encore inconnus. De récents travaux suggèrent que la mono-ubiquitinylation du cargo serait un signal d'endocytose et sa poly-ubiquitination en K63 un signal d'envoi vers les CMV (Lauwers et al., 2009).

Chez la levure, les ESCRTs constituent l'unique machinerie connue de prise en charge de protéines de surface destinées à la dégradation et de formation des corps multivésiculés. Elle est conservée et joue le même rôle chez les mammifères, qui possèdent aussi d'autres systèmes de formation de CMV ou de structures similaires (Matsuo et al., 2004; Theos et al., 2006; Trajkovic et al., 2008; Woodman and Futter, 2008). Aussi, toutes les protéines de surface ne requièrent pas ESCRT pour leur dégradation. Par exemple, Melanosomal Protein 17 (Pmel17) est adressée aux VIL par un mécanisme qui n'implique ni son ubiquitinylation ni HRS (ESCRT-0).

Le récepteur à l'EGF, qui est le mieux étudié des cargos, est pris en charge par le complexe ESCRT, mais la liste ne cesse de grandir, et s'étend bien au-delà des Récepteurs à tyrosines kinases (RTK):

- Récepteurs à tyrosines kinases (RTK) :
- PDGF (Takata et al., 2000), Torso RTK.
- Canaux ioniques
  - Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (KCa3.1)(Balut et al.)

- Récepteurs couplés à des protéines G
- Cadhérines
- Protéines de jonction GAP
- Perméases
- Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (après ubiquitinylation induit par infection virale, (Hewitt et al., 2002).

Cette liste est loin d'être exhaustive et de nombreux autres substrats d'ESCRT restent à découvrir.

#### 1.5.1.2. ESCRT et recyclage .

Comme nous l'avons mentionné, le récepteur à l'EGF (EGFR) est l'archétype du récepteur qui est ciblé vers la dégradation par ESCRT-III après sa liaison avec l'EGF, alors que par exemple le récepteur à la transferrine est constitutivement recyclé après endocytose. Mais le devenir d'une protéine de surface endocytée ne dépend pas que de son identité.

Par exemple six ligands de l'EGFR sont connus à ce jour, de récentes données montrent que son trafic de l'EGFR dans la voie endocytaire dépend de la nature du ligand (Roepstorff et al., 2009). Par exemple, la bétacelluline et l'EGF envoient presque intégralement l'EGFR vers le lysosome, alors que l'amphiréguline induit son recyclage. De manière très surprenante, le recyclage de l'EGFR après stimulation par l'amphiréguline implique la machinerie ESCRT (Baldys and Raymond, 2009). De plus, contrairement à la dégradation de ce récepteur, et comme pour la cytokinèse et le bourgeonnement de virus enveloppés, le recyclage de l'EGFR requiert ESCRT-I et ESCRT-III mais pas d'ESCRT-0 ni d'ESCRT-II.

Chez les mammifères, les processus cellulaires connus pour employer la machinerie ESCRT requièrent soit ESCRT-II soit Alix. Or, Alix a aussi été impliquée dans le recyclage de récepteurs de surface (Shi et al., 2007). Chez *C. elegans*, l'orthologue d'ALIX (ALX) interagit avec RME1 où ils sont tous deux impliqués dans le fonctionnement des endosomes de recyclage (Grant et al., 2001). Dans les cellules HeLa, l'expression de la partie C-terminale d'Alix affecte le recyclage du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

Les résultats de ces travaux sont surprenants et les mécanismes par lesquels ESCRT pourrait participer au recyclage sont totalement inconnus. Il n'est pas encore établi qu'Alix

joue un rôle dans le recyclage de l'EGFR ni qu'ESCRT-I et ESCRT-III soit impliqués dans celui du CMH de classe I, mais il est possible qu'ensemble ils forment une machinerie impliquée dans la physiologie des endosomes de recyclage.

### **1.5.2. ESCRT et bourgeonnement des virus enveloppés**

Un virus est une entité biologique qui ne peut se répliquer seule mais doit utiliser le matériel d'une cellule hôte pour se reproduire. Ils sont composés d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) généralement associée à des nucléoprotéines basiques ; le tout enfermé dans une coque protéique protectrice appelée capsid. Certains virus sont en plus entourés d'une membrane lipidique provenant de la cellule hôte et qui enveloppe la capsid. Ils sont alors appelés virus enveloppés.

Une fois le matériel nécessaire synthétisé par la cellule hôte, ces virus enveloppés s'assemblent à la membrane (généralement la membrane plasmique) et s'entourent de cette dernière dans un bourgeon. Pour pouvoir s'individualiser, ils doivent se séparer de la membrane « nourricière » par clivage du cou du bourgeon. Par exemple, le virus de la grippe code pour M2, une protéine transmembranaire qui est recrutée au cou du bourgeon pour le sectionner (Rossman et al., 2010).

Contrairement au virus de la grippe, la plupart des virus enveloppés ne possèdent pas dans leur génome de gènes codant pour des protéines permettant cette scission membranaire. Ils contournent ce problème, en incluant dans les protéines de leur capsid un ou plusieurs domaines tardifs (late domain). Grâce à ces courtes séquences peptidiques, ils piratent la machinerie ESCRT de la cellule hôte afin qu'elle catalyse la séparation du virillon et de la membrane plasmique (Demirov and Freed, 2004; Morita and Sundquist, 2004; Bieniasz, 2009).

Contrairement à ESCRT-I, ESCRT-III, VPS4 et ALIX, ESCRT-0 et ESCRT-II ne sont pas impliqués dans le bourgeonnement du VIH (Langelier et al., 2006; Pincetic et al., 2008), mais ESCRT-II a récemment été impliqué dans le bourgeonnement de l'ASV (avian sarcoma virus) (Pincetic et al., 2008). Il est supposé que la formation du bourgeon n'est pas assurée par la machinerie ESCRT mais par des protéines virales. Par exemple dans le cas du VIH, l'expression de GAG permet la formation de bourgeons indépendamment d'ESCRT mais pas la scission (Carlson et al., 2008; Jouvenet et al., 2008; Ivanchenko et al., 2009). L'échec du

recrutement d'ESCRT-III aux sites de formation de ces virus ou son mauvais fonctionnement provoquent l'accumulation de virillons presque complets, avec leurs enveloppes encore reliées à la membrane plasmique par un fin tube de membrane (Strack et al., 2003; Carlson et al., 2008). Le recrutement d'ESCRT-III au cou du bourgeon semble donc essentiel pour permettre la scission des membranes qui permet la libération des particules virale dans le milieu. Ce recrutement est assuré par les late domains. Quatre domaines tardifs (P(S/T)AP, LYP<sub>n</sub>L, PPXY et FPIV) ont été identifiés à ce jour, qui représentent autant de modes de recrutement d'ESCRT-III (Fisher et al., 2007) :

#### -P(S/T)AP

Le motif P(S/T)AP, porté notamment par le domaine p6 de la protéine GAG du VIH, interagit avec TSG101 sur le même domaine qu'HRS (ESCRT-0) et ALIX (VerPlank et al., 2001; Pornillos et al., 2002; Pornillos et al., 2003; Morita and Sundquist, 2004). La perte de cette interaction est un puissant inhibiteur du bourgeonnement du VIH (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Demirov et al., 2002), mais comment ESCRT-I pourrait-il recruter ESCRT-III ? ALIX et ESCRT-II sont tous deux capables de faire le pont entre ESCRT-I et ESCRT-III, mais l'extinction d'ESCRT-II (EAP20) n'a aucun impact sur la production virale (Langelier et al., 2006), et celle d'ALIX n'a qu'un effet modéré sur celle-ci comparée à celle de TSG101. Cela ne signifie pourtant pas que ces deux candidats soient à exclure. Il pourrait en effet y avoir redondance entre les deux, ou même avec d'autres facteurs comme BROX (Popov et al., 2009). Une approche par double SiRNA et/ou mutagénèse simultanée de ces protéines pourrait lever ce voile.

Une autre possibilité serait qu'ESCRT-I interagisse directement avec ESCRT-III. CHMP6 et IST1 se lient à ESCRT-I via VPS28 et Vps37B (Pineda-Molina et al., 2006; Bajorek et al., 2009a). Ces deux facteurs ne sont cependant pas nécessaires au bourgeonnement du VIH (Langelier et al., 2006; Bajorek et al., 2009a). D'autres interactions directes entre ESCRT-I et ESCRT-III ou de nouveaux facteurs capables de relier ces deux complexes restent peut être à découvrir.

#### -LYP<sub>n</sub>L

Le motif LYP<sub>n</sub>L (<sub>n</sub>=1 ou 3) est notamment porté par les domaines p6 et p9 situés en C-terminal des protéines GAG du VIH et du EIAV (equine infectious anaemia) respectivement. Il interagit avec une poche hydrophobe située à l'intérieur du domaine en V

d'ALIX avec une affinité de  $5\mu\text{M}$  (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007c; Munshi et al., 2007). Cette interaction ainsi que la liaison de CHMP4 à ALIX sont indispensables au bourgeonnement du EIAV (Fisher et al., 2007). ALIX est donc supposée être la plateforme de recrutement et d'activation d'ESCRT-III au site d'assemblage de l'EIAV.

Si ALIX semble être le promoteur principal de la sortie de plusieurs lentivirus, son rôle en ce qui concerne la sortie du VIH est plus complexe. En effet, la suppression d'ALIX a un impact faible sur la sortie de ce virus dans la plupart des lignées de cellules T, mais plus fort dans d'autres lignées (Hela, JurkaT) (Fujii et al., 2009). De plus, la surexpression d'ALIX est capable de restaurer la production virale dans les conditions où le recrutement de TSG101 par GAG a été aboli. La capacité d'ALIX à interagir avec CHMP4 est essentielle pour cette restauration (Odorizzi, 2006; Fisher et al., 2007; Fujii et al., 2007; Usami et al., 2007). Il est donc supposé que la liaison entre ALIX et GAG ne soit qu'un système de secours de recrutement d'ESCRT-III pour ce virus. Les mutations des sites d'interaction d'ALIX avec TSG101, CIN85, CEP55, les endophilines et ALG2, toutes situées dans le domaine riche en proline d'ALIX, n'ont aucun effet sur cette restauration. Pourtant, la délétion de ce domaine abolit la restauration de la sortie du VIH. Il pourrait donc y avoir d'autres interacteurs d'ALIX impliqués dans ce phénomène.

Il est intéressant de noter que la protéine de fusion composée de la protéine GAG du HIV (sans les late domains) et de CHMP6, restaure la sortie du VIH (Pincetic et al., 2008), et que la sortie d'EIAV en l'absence de son late domaine (LYPx<sub>n</sub>L) peut aussi être restaurée par l'expression d'une fusion entre de la protéine GAG d'EIAV et Vps28 (ESCRTI), qui peut recruter directement CHMP6 (Pineda-Molina et al., 2006). Ces données confirment que le rôle de ces late domains est le recrutement d'ESCRT-III au site de bourgeonnement viral.

Enfin, ALIX interagit via son domaine BRO1 aussi avec le domaine NC (nucléocapside) de GAG du VIH, qui permet l'encapsidation de l'ARN viral situé juste en amont du domaine P6. D'autres protéines à domaine BRO1 (HD-PTP, COFILIN, BROX) interagissent avec ce domaine NC, et toutes favorisent la sortie du système minimal HIV-1 GAG (Popov et al., 2009). La capacité de BROX à permettre la sortie de GAG ne dépend pas de sa liaison à CHMP4 et semble donc être une caractéristique du domaine BRO1 seul. Ce domaine pourrait donc à lui seul posséder des propriétés de remodelage membranaire comme il l'a été suggéré pour ALIX (Matsuo et al., 2004).

- PPXY

Le motif PPXY promeut le bourgeonnement de ses virus en recrutant des ubiquitine-ligases de la famille NEDD4 via leurs domaines WW, riches en tryptophane (Martin-Serrano et al., 2005). Ce motif est impliqué dans le recrutement de la machinerie ESCRT pour favoriser la sortie de nombreux virus comme Ebola ou celui de la rage (Harty et al., 2000; Timmins et al., 2003). Aucune interaction directe entre les ubiquitine-ligases de la famille NEDD4 et la machinerie ESCRT n'a encore été trouvée, mais leur activité ubiquitine-ligase est nécessaire au bourgeonnement de ces virus (Martin-Serrano et al., 2005). Il est donc supposé qu'ESCRT-I soit recruté indirectement en se liant aux protéines ubiquitinylés via TSG101. Par exemple la sortie du virus de Mason-Pfizer de singe, qui ne contient que le late domain PPXY, dépend de TSG101, et la surexpression de l'isoforme NEDD4-2 permet la restauration de la sortie du VIH en l'absence de ses late domaines (Chung et al., 2008; Usami et al., 2008). Le VIH ne contenant pas de domaine PPXY, le mode de recrutement de NEDD4-2 pourrait être différent pour ce virus. La partie C-terminale de cette protéine contient un domaine C2 qui pourrait interagir avec GAG (Usami et al., 2008). ALIX semble aussi pouvoir recruter NEDD4-1 au site de formation du virus pour faciliter sa sortie (Sette et al., 2010).

Enfin NEDD4 peut ubiquitinyler MVB12B, composant d'ESCRT-I (Chung et al., 2008). Ces ubiquitine-ligases pourraient donc moduler l'activité de la machinerie ESCRT par des modifications post-traductionnelles.

La machinerie ESCRT est clairement impliquée dans la section du cou du bourgeon, mais pourrait aussi jouer un rôle dans l'assemblage tardif de la capsid (Carlson et al., 2008; Fujii et al., 2009). En effet des mutations dans les late domains de GAG du HIV provoquent l'apparition de virus avec une morphologie aberrante.

Tout un panel de rétrovirus et de virus à ADN emploient la machinerie ESCRT pour terminer leur assemblage et sortir de la cellule hôte (Tableau 2). Différents assortiments de complexes ESCRT et protéines associées semblent être utilisés en fonction des virus, mais ESCRT-III et VPS4 sont requis dans tous les cas répertoriés. Il existe des grandes variations entre virus, mais ces phénomènes semblent partager des mécanismes communs proposés par le modèle de travail suivant :

**Tableau 2 : Lates domaines Viraux et recrutement des ESCRT (d'après (Hurley, 2010)) .**

Virus et remarques	Références
<b>PTAP-TSG101 UEV</b>	
HIV-1	Demirov <i>et al.</i> , 2002; Garrus <i>et al.</i> , 2001; Martin-Serrano <i>et al.</i> , 2001; VerPlank <i>et al.</i> , 2001
Feline immunodeficiency virus	Luttge <i>et al.</i> , 2008
Mason-Pfizer monkey virus	Gottwein <i>et al.</i> , 2003
Moloney murine leukemia virus	Segura-Morales <i>et al.</i> , 2005
HTLV-1	Blot <i>et al.</i> , 2004; Bouamr <i>et al.</i> , 2003; Dorweiler <i>et al.</i> , 2006; Heidecker <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2004
Minor/cell-type dependent role.	
Prototypic foamy virus	Patton <i>et al.</i> , 2005
Vesicular stomatitis virus	Irie <i>et al.</i> , 2004
Ebola	Licata <i>et al.</i> , 2003; Martin-Serrano <i>et al.</i> , 2001; Timmins <i>et al.</i> , 2003
Japanese encephalitis virus	Chiou <i>et al.</i> , 2003
PTAP motif not identified but TSG101 role is confirmed.	
Lymphocytic choriomeningitis virus	(Perez <i>et al.</i> , 2003)
Lassa Bluetongue virus	(Wirblich <i>et al.</i> , 2006)
<b>YPXnL-ALIX-dependent</b>	
HIV-1	Strack <i>et al.</i> , 2003; von Schwedler <i>et al.</i> , 2003
Equine infectious anemia virus	Martin-Serrano <i>et al.</i> , 2003; Strack <i>et al.</i> , 2003
Prototypic foamy virus	Patton <i>et al.</i> , 2005; Stange <i>et al.</i> , 2005
Sendai virus	Gosselin-Grenet <i>et al.</i> , 2007; Irie <i>et al.</i> , 2007; Sakaguchi <i>et al.</i> , 2005
Consensus that ALIX interacts with viral YLDL sequence but Gosselin-Grenet <i>et al.</i> (2007) find no effect on budding of ALIX knockdown	
Vaccinia virus	Honeychurch <i>et al.</i> , 2007
Rous sarcoma virus	Dilley <i>et al.</i> , 2010
<b>PPXY-dependent</b>	
Marburg	Urata <i>et al.</i> , 2007
Unconventional interaction with TSG101 is PTAP-independent but PPXY dependent.	
Rous sarcoma virus	Kikonyogo <i>et al.</i> , 2001; Medina <i>et al.</i> , 2005
Mason-Pfizer monkey virus	Gottwein <i>et al.</i> , 2003
Moloney murine leukemia virus	Segura-Morales <i>et al.</i> , 2005
HTLV-1	Blot <i>et al.</i> , 2004; Bouamr <i>et al.</i> , 2003; Heidecker <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2004
Vesicular stomatitis virus	Harty <i>et al.</i> , 1999
Rabies virus	Harty <i>et al.</i> , 1999
Ebola virus	Harty <i>et al.</i> , 2000; Licata <i>et al.</i> , 2003; Timmins <i>et al.</i> , 2003
Lymphocytic choriomeningitis virus	Perez <i>et al.</i> , 2003
Lassa virus	Perez <i>et al.</i> , 2003; Urata <i>et al.</i> , 2006
Bluetongue virus	Wirblich <i>et al.</i> , 2006
<b>ESCRTs involved – recruitment mechanism other or unknown</b>	
Human cytomegalovirus	Tandon <i>et al.</i> , 2009
Note that Fraile-Ramos <i>et al.</i> (2007) find no effect of ESCRT knockdown.	
Hepatitis C	Corless <i>et al.</i> 2010
Hepatitis B	Lambert <i>et al.</i> , 2007)
Herpes simplex type 1	(Pawliczek and Crump, 2009)
Tomato bushy stunt virus	(Barajas <i>et al.</i> , 2009)
Ubiquitinated p33 protein binds to ESCRT-I and Alix	

Un bourgeon est formé par les protéines virales. Un ou plusieurs late domains recrutent ESCRT-III via ALIX et/ou TSG101, et/ou une ubiquitine ligase à domaine WW. Suite à une interaction à définir (peut-être directement avec ALIX), la polymérisation locale d'ESCRT-III est déclenchée et catalyse la scission membranaire au niveau du cou du bourgeon. Enfin VPS4 est recruté pour recycler les CHMPs dans le cytosol.

### **1.5.3. ESCRT et cycle cellulaire :**

La mitose est une étape du processus de division cellulaire où une cellule mère se divise en deux cellules filles au patrimoine génétique identique. Elle comporte quatre étapes successives : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La séparation finale des deux cellules filles est ensuite assurée après la mitose durant la cytokinèse.

- Prophase : c'est le début de la mitose, la cellule a déjà dupliqué ses chromosomes. La chromatine se compacte, et chaque chromosome est alors composé de deux chromatides sœurs reliées par leurs centromères. Le centrosome (centre organisateur des microtubules composé de deux centrioles) se duplique. Les quatre centrioles se séparent pour former deux centrosomes qui migrent chacun vers un pôle de la cellule. Les microtubules forment un fuseau mitotique bipolaire qui s'étend d'un centrosome à l'autre. L'enveloppe nucléaire se désagrège, et les centromères se transforment en kinétochores. Les microtubules se lient aux kinétochores de telle sorte que les deux chromatides d'un même chromosome sont reliées à un pôle opposé de la cellule.
- Métaphase : les chromosomes se rassemblent et s'alignent sur la plaque équatoriale de la cellule.
- Anaphase : Les chromatides se séparent. Elles sont tirées par les microtubules en direction du pôle auquel elles sont reliées.
- Télophase : Les microtubules kinétochoriens disparaissent, tandis que les non kinétochoriens persistent et s'allongent pour étirer la cellule et former les

microtubules inter-zonaux impliqués dans la cytokinèse. La chromatine se décondense, l'enveloppe nucléaire et les nucléoles se reforment.

- Cytokinèse : un anneau contractile constitué principalement d'Actine et de Myosine II se forme perpendiculairement au fuseau mitotique au niveau de l'ancienne plaque équatoriale. Cet anneau se contracte et fait apparaître un sillon de clivage au milieu de la cellule, pour séparer équitablement les organelles et le matériel génétique. Ce sillon se resserre et la membrane plasmique entoure le faisceau de microtubule, ce qui forme un pont cytoplasmique entre les deux cellules filles. Une structure protéique extrêmement dense appelée corps intermédiaire se forme pour organiser l'abscission (la séparation des deux cellules filles).

#### 1.5.3.1. ESCRT et mitose :

Il est maintenant clair que plusieurs complexes de la machinerie ESCRT sont requis dans cette dernière étape de la division cellulaire (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007b; McDonald and Martin-Serrano, 2009; Hurley and Hanson, 2010; Roxrud et al., 2010). Mais de récents travaux montrent qu'ESCRT-III, VPS4A et VPS4B sont aussi impliqués bien plus tôt dans le cycle cellulaire, au moment de la mitose.

L'équipe de Wes Sundquist a montré que les sous-unités de ces complexes étaient requises pour l'intégrité du centrosome et du fuseau mitotique, et donc pour la mitose (Morita et al., 2010). En effet suppression de différentes des sous-unités d'ESCRT-III ou de chacune des deux VPS4 par Si RNA affecte le nombre de centrosomes et la polarité du fuseau mitotique. La plupart de ces suppressions provoquent l'apparition de plus de deux centrosomes, et donc d'un fuseau multipolaire, alors que pour les délétions de CHMP2A et CHMP5, les cellules gardent un seul centrosome, qui crée un fuseau unipolaire.

L'extinction de VPS4B, qui augmente le nombre de centrosomes, provoque aussi une diminution de leur volume. Celle de CHMP2A, qui empêche l'apparition du deuxième centrosome, est aussi accompagnée d'une augmentation du volume. Il est donc possible que le phénotype de centrosome unique provienne d'une altération de sa fragmentation et /ou

de son agglomération. D'autant plus que chez la drosophile, CHMP5 a été identifiée dans un criblage cherchant des protéines qui agglomèrent le centrosome (Kwon et al., 2008), et que chez la levure, ESCRT-II contrôlerait l'amplification des pôles de fuseaux méiotiques qui sont l'équivalent des centrosomes (Jin et al., 2005).

VPS4, comme CHMP2B, se concentre aux pôles du fuseau pendant la mitose, et se relocalise au corps intermédiaire par la suite. Ce phénomène suggère une action directe de ces complexes sur le centrosome. Toute une batterie de protéines faisant partie de, ou liées à la machinerie ESCRT, présentent la même localisation (ALIX, TSG101, IST1) (Shen et al., 2004; Langelier et al., 2006; Morita et al., 2007b; Bajorek et al., 2009b). Il est donc possible que tous ces complexes ESCRTs soient impliqués dans le maintien des centrosomes.

Via la sous-unité CHMP1B, ESCRT-III peut remodeler des assemblages microtubulaires en recrutant la Spastine, protéine dont la fonction est de sectionner les microtubules (Yang et al., 2008). Mais comment les complexes ESCRT-III et VPS4 affectent-ils les centrosomes et le fuseau mitotique? On peut faire l'hypothèse que par les importantes structures tubulaires qu'ils peuvent former, ils pourraient servir de plateforme de structuration mécanique et de recrutement. Leur capacité de fission pourrait servir à la ségrégation des centrioles, ou des centrosomes pendant de la mitose., VPS4 pourrait fournir un travail mécanique en utilisant l'hydrolyse de l'ATP...

Ces altérations des centrosomes ont pour conséquences directes une mauvaise ségrégation des chromosomes et une morphologie nucléaire anormale. Or, comme son nom l'indique, TSG101 est un gène suppresseur de tumeurs puisque la diminution de son expression est accompagnée d'aneuploïdie (Xie et al., 1998). Enfin, CHMP3 et CHMP4B sont recrutés au kinétochore (Hutchins et al.), et un crible en double hybride a identifié la protéine du kinétochore CENPF (Centromer Protein F) comme interacteur direct de CHMP2B (Tsang et al., 2006). Les complexes ESCRT pourraient donc être mis à contribution tout au long de la division cellulaire, en commençant par leur action sur les centrosomes, puis les kinétochores, pour terminer par l'abscission au *midbody* pendant la cytokinèse.

#### 1.5.3.2. ESCRT et cytokinèse :

Comme nous venons de le voir, ESCRT-I, ESCRT-III, VPS4 et ALIX sont recrutés au centrosome, comme au corps intermédiaire (Morita et al., 2007b; Carlton et al., 2008; Bajorek et al., 2009b; Morita et al., 2010). CEP55 (centrosome protein 55kDa) interagit avec ALIX et TSG101 et les recrute à ces deux sites (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007b; Suzuki et al., 2008). Il est un composant crucial de ces deux structures (Doxsey, 2005; Fabbro et al., 2005; Martinez-Garay et al., 2006; Zhao et al., 2006), et la perte de cette interaction impacte fortement l'abscission alors qu'elle n'est pas requise pour le bourgeonnement du VIH (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007b). CEP55 se lie au domaine riche en proline d'ALIX et au domaine UEV de TSG101. Ces interactions sont exclusives, une molécule de CEP55 ne peut donc pas lier à la fois ALIX et TSG101 (Lee et al., 2008; Wollert et al., 2009b). Il a donc été proposé que ce soient des dimères de CEP55 qui prennent en charge ces deux protéines.

TSG101 interagit aussi avec d'autres protéines de la cytokinèse (CD2AP, ROCK1, et IQGAP) (Morita et al., 2007b), mais les rôles physiologiques de ces partenariats sont encore indéterminés.

Toutes les sous-unités d'ESCRTIII, les deux isoformes de VPS4 ainsi qu'IST1, sont nécessaires à la cytokinèse (Dukes et al., 2008; Bajorek et al., 2009b; Morita et al., 2010), et CHMP2A, CHMP4A, CHMP5, IST1, et VPS4B se retrouvent au corps intermédiaire (Dukes et al., 2008; Agromayor et al., 2009). L'interaction entre ALIX et ESCRT-III via CHMP4 est nécessaire pour l'abscission (Carlton et al., 2008). Il est possible qu'ALIX recrute ESCRT-III dans cette région via CEP-55 mais cela n'a pas été montré. La région centrale du corps intermédiaire, appelée le corps de Flemming, est une structure si dense en protéines que les épitopes qu'il contient ne sont pas accessibles aux anticorps. Par exemple, les microtubules traversent de manière continue le corps intermédiaire mais ne sont pas visibles en immunofluorescence dans cette structure. Ils sont rendus accessibles par l'expression des mutants d'interaction entre ALIX et ESCRT. De plus, ALIX sauvage fusionné à une protéine fluorescente se localise dans cette région. Ces résultats indiquent qu'ALIX et ESCRT-III sont des composants essentiels du corps intermédiaire et qu'ils pourraient être des éléments structurants requis pour l'intégrité de cette zone très dense.

Les mécanismes par lesquels le système ESCRT participe à l'abscission sont encore obscurs. Un précédent modèle proposait que la scission de la membrane plasmique se fasse

par des processus de fusion membranaire. Le corps intermédiaire est en effet le siège d'un intense trafic vésiculaire, notamment l'apport de membrane par les endosomes de recyclage et des vésicules de sécrétion (Montagnac and Chavrier, 2008; Ai and Skop, 2009). De nombreuses protéines impliquées dans ce trafic, (Rab35, Rab11, Rab8), mais aussi dans l'arrimage (Complexe Exocyst) et la fusion de vésicules (VAMP8, Syntaxin-2), y sont recrutées et requises pour l'accomplissement de la cytokinèse (Gromley et al., 2003; Gromley et al., 2005). Des fusions de ces vésicules entre elles et avec la membrane plasmique pourraient expliquer l'abscission, mais aucun travail ne démontre ce phénomène.

Il est en fait plus probable que ce soit ESCRT-III qui catalyse la scission de la membrane plasmique. En effet, son implication dans la séparation de cellules filles semble être un mécanisme vieux de plus de deux milliards d'années, bien avant l'apparition des membranes internes. Des homologues d'ESCRT-III et de VPS4 ont été identifiés chez certaines archéobactéries (Obita et al., 2007; Hobel et al., 2008; Makarova et al., 2010). Leurs niveaux d'expression varient pendant le cycle cellulaire, et ils se concentrent au centre de la cellule pendant la division ; en outre, l'expression d'un mutant inactif de l'homologue de Vps4 ou de Vps4 lui-même interfère avec la division cellulaire (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008). ESCRT-III pourrait donc être un système ancestral de scission membranaire, impliqué dans la séparation des cellules filles, et qui se serait diversifié au cours de l'évolution pour permettre d'autres processus comme la formation des VIL.

La topologie de la scission et la forme du corps intermédiaire se prêtent à une action directe d'ESCRT-III sur la membrane plasmique, mais il se pose un problème de taille. En effet, le cou des bourgeons d'ILV naissantes ou des virus est estimé entre 50 et 100nm alors que de diamètre du corps intermédiaire se situe entre 1,5 et 2 $\mu$ m (Gromley et al., 2005). Plusieurs mécanismes « d'étranglement » de ce dernier ont donc été proposés.

- Des vésiculations de la membrane plasmique au niveau du corps intermédiaire ont été observées (Dubreuil et al., 2007). ESCRT-III pourrait être à l'origine de ce phénomène qui permettrait d'expulser du matériel de cette région et provoquer ainsi son rétrécissement.

- La fusion successive de vésicules de sécrétion ou d'endosomes avec la membrane plasmique provoquerait la formation d'un sillon à l'intérieur du corps intermédiaire.

Quelque soit le modèle, la séparation des deux cellules filles nécessite le clivage du faisceau de microtubule qui traverse le corps intermédiaire. ESCRT-III est aussi impliqué dans ce processus, puisque le domaine CHMP1B interagit avec l'isoforme de 60kDa de la Spastine et la recrute au site d'abscission (Reid et al., 2005; Yang et al., 2008). Cette protéine est une AAA ATPase qui interagit avec ESCRT-III via son domaine MIT. Elle ressemble à Vps4 sous bien des aspects mais son activité n'est pas de dépolymériser ESCRT-III mais de sectionner les microtubules. Cette protéine, ainsi que son interaction avec CHMP1B, sont nécessaires pour la séparation des cellules filles (Connell et al., 2009). ESCRT-III pourrait donc aussi participer au clivage des microtubules au site d'abscission en formant une matrice de CHMP1B et Ist1, qui recruterait la Spastine (Bajorek et al., 2009b; McDonald and Martin-Serrano, 2009).

Enfin CHMP4B se lie directement à TTC19 (tetratricopeptide repeat protein), qui se lie à FYVE-CENT qui est relié aux microtubules via le moteur moléculaire KIF13A. Ce complexe se localise au centrosome. Il est ensuite transporté le long des microtubules par KIF13A jusqu'au corps intermédiaire (Sagona et al., 2010). Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) se concentre au corps intermédiaire et est nécessaire à l'accomplissement de la cytokinèse (Sagona et al., 2010). Ce lipide se lie à la protéine FYVE-CENT via son domaine FYVE. Cette interaction est indispensable à la séparation des cellules filles, et au recrutement de TTC19 au corps intermédiaire. Aux vues de ces résultats, il a été proposé que le complexe FYVE-CENT/TTC19 soit transporté par KIF13A au corps intermédiaire, où FYVE-CENT l'ancre aux domaines riches en PI3P. TTC19 pourrait alors se lier à CHMP4B et contrôler sa polymérisation (Nezis et al., 2010; Sagona et al., 2010). Hormis leur interaction, aucun élément ne permet de savoir si TTC19 pourrait influencer l'oligomérisation de CHMP4. La récente découverte de la présence et de l'implication d'ESCRT au centrosome suggère que ce complexe pourrait aussi participer au transport de sous-unités d'ESCRT-III depuis cette structure jusqu'au corps intermédiaire. Cette fonction est attribuée à ALIX, mais il n'a pas été montré que l'abolition de son interaction avec CHMP4 interférait sur le recrutement d'ESCRT-III au corps intermédiaire. Enfin ce complexe crée le seul lien physique connu entre ESCRT-III, les membranes et les microtubules.

ESCRT-III semble donc jouer un rôle central dans la cytokinèse comme dans la mitose. Il est au carrefour de plusieurs processus cruciaux et pourrait être une véritable plateforme

d'organisation de ce phénomène en liant et coordonnant la scission membranaire et le clivage des microtubules.

#### **1.5.4. ESCRT et autophagie**

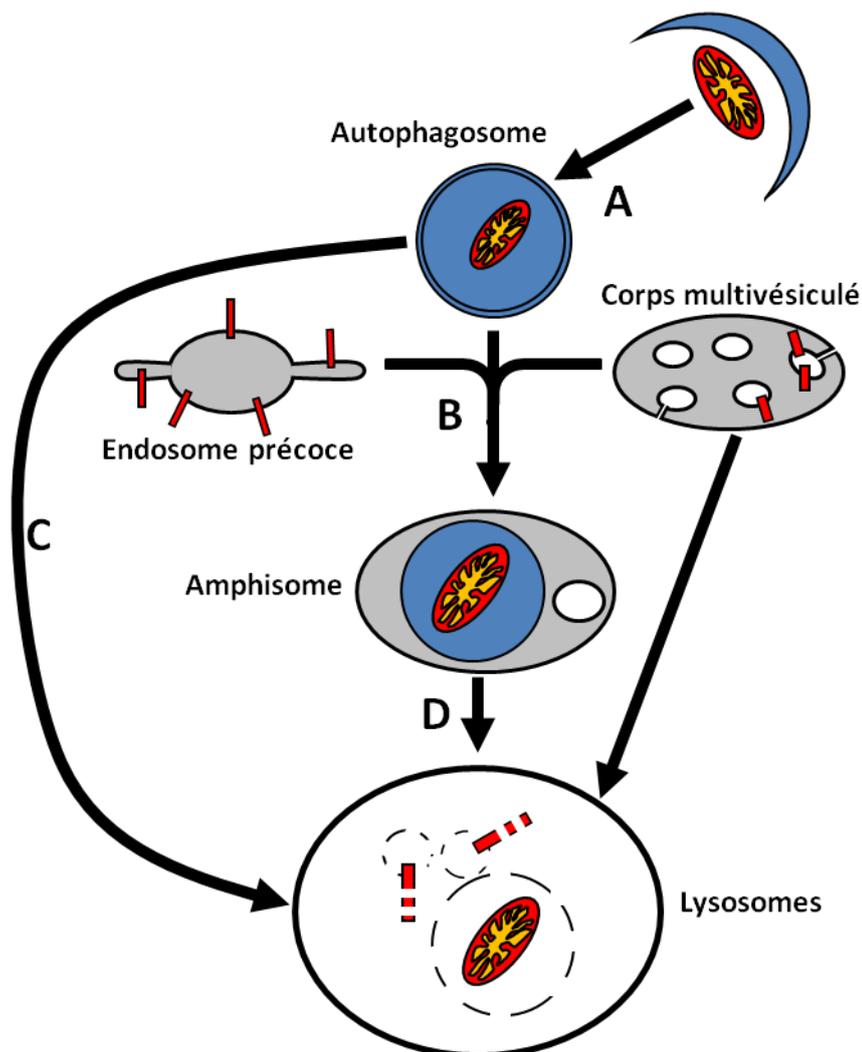
L'autophagie est un mécanisme d'autolyse par lequel la cellule dégrade des composants de son cytoplasme par ses lysosomes. Elle est impliquée dans des processus physiologiques comme dans la croissance cellulaire, l'inflammation, le développement et l'homéostasie, en participant à l'équilibre entre synthèse et dégradation. Ce mécanisme est donc finement régulé. Par exemple, si la cellule se trouve en manque de nutriments, l'autophagie est déclenchée pour « recycler » le matériel cytoplasmique.

Elle joue aussi un rôle important pour protéger la cellule contre différentes agressions internes, en dégradant des mitochondries endommagées, ou les inclusions d'agrégats protéiques. La compréhension des mécanismes autophagiques a donc un intérêt premier dans la lutte contre les cancers, le vieillissement, les infections, les maladies neurodégénératives (Todde et al., 2009)...

Il existe plusieurs processus autophagiques (macro-autophagie, micro-autophagie, macro-pexophagie, micro-pexophagie, autophagie par chaperons, autophagie Cvt) qui ont tous en commun l'implication du lysosome dans la dégradation de matériel cytosolique (Todde et al., 2009). La macro-autophagie est la principale voie de dégradation des protéines « à longue vie », et la seule connue pour les organelles. Elle est couramment appelée autophagie puisqu'elle en est la forme principale. Elle implique la formation d'une organelle à double membrane, l'autophagosome, qui séquestre les composants à dégrader, et qui fusionne ensuite avec le lysosome pour y relarguer son contenu (figure15). L'origine de la membrane formant l'autophagosome est encore controversée. Elle pourrait provenir de différentes sources comme la membrane plasmique ou les mitochondries (Hailey et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

La machinerie ESCRT semble être impliquée plus ou moins directement dans ce type d'autophagie. En effet, la perturbation de la machinerie ESCRT provoque une forte accumulation d'autophagosomes. L'expression de dominants négatifs ou l'extinction de

membres des quatre complexes ESCRT ou de VPS4 induisent tous cette accumulation (Doyotte et al., 2005; Filimonenko et al., 2007b; Lee et al., 2007b; Rusten et al., 2007a; Tamai et al., 2007; Petiot et al., 2008; Tamai et al., 2008). Seule Alix ne semble pas impliquée (Petiot et al., 2008). Il est difficile de déterminer si cette accumulation est due à une plus forte production d'autophagosomes en réponse au stress induit par la perturbation du système ESCRT, ou à un problème de fusion entre autophagosomes et lysosomes. Mais les auto-lysosomes sont rares dans ces cellules, ce qui plaide en faveur de la deuxième hypothèse (Lee et al., 2007b; Rusten et al., 2007b).



**Figure 15: Macro-autophagie et voie endosomale.**

La macro-autophagie est initiée par la formation d'une vacuole qui s'allonge et séquestre des composants du cytosol pour former une organelle à double membrane : l'autophagosome (A). Deux voies pourront ensuite aboutir à la libération de son contenu dans le lysosome où il sera dégradé (D). La première passe par la fusion directe de l'autophagosome avec le lysosome (C) ; la deuxième par la formation d'un

amphisome, qui résulte de l'union de l'autophagosome avec un endosome précoce ou tardif (corps multivésiculés). L'amphisome pourra alors fusionner avec le lysosome.

Quelles pourraient être les implications de la machinerie ESCRT dans la maturation de l'autophagosome et sa fusion avec le lysosome pouvant expliquer cette accumulation?

- ESCRT participe à la fusion entre l'autophagosome et le lysosome

L'amarrage de ces deux entités est assuré par RAB7 et la machinerie HOPS, tandis que leur fusion est certainement provoquée par des complexes SNARES. L'expression d'un mutant pathogène de CHMP2B inhibe le recrutement de RAB7 au CMV et sa fusion avec le lysosome (Urwin et al., 2010a). Néanmoins aucune donnée ne suggère une implication directe de la machinerie ESCRT dans la fusion entre l'autophagosome et le lysosome.

- Les mutants d'ESCRT interfèrent avec la formation de l'amphisome ou sa fusion au lysosome.

Les autophagosomes peuvent aussi fusionner avec des endosomes précoces ou tardifs pour former des amphisomes qui fusionneront à leur tour avec les lysosomes (Liou et al., 1997; Lucocq and Walker, 1997; Berg et al., 1998; Eskelinen, 2005). Les perturbations de la voie endosomale induites par les manipulations de la machinerie ESCRT-III pourraient donc interférer dans la maturation de l'amphisome, ou sa fusion avec le lysosome. La déplétion de TSG101 ou de CHMP3 dans la lignée cellulaire Hela provoque une accumulation d'amphisomes (Filimonenko et al., 2007b). Or, comme nous l'avons évoqué précédemment, l'expression d'un mutant de CHMP2B affecte la fusion entre le CMV et le lysosome (Urwin et al., 2010a). Il pourrait donc en être de même pour la fusion entre l'amphisome et le lysosome suite à des perturbations de la machinerie ESCRT.

- ESCRT participe à la maturation de l'autophagosome.

L'autophagosome est semblable à un corps multivésiculé, avec une seule vésicule intraluminaire, et la fermeture de l'autophagosome est topologiquement identique à celle des VIL. Il a donc été proposé que la machinerie ESCRT soit impliquée dans cette scission membranaire (Raiborg and Stenmark, 2009; Hurley and Hanson, 2010). Si tel est le cas, il y aurait un seul cou extrêmement éphémère par autophagosome, ce qui rend ce phénomène difficile à démontrer expérimentalement.

- ESCRT participe à la maturation du lysosome.

Chez la levure, l'acheminement des hydrolases lysosomales impliquent la machinerie ESCRT. Chez les mammifères, ESCRT-I est requis pour l'adressage de la protéase lysosomale Cathepsin D au lysosome (Babst et al., 2000). Il est donc possible qu'un mauvais adressage de ces hydrolases puisse perturber la biogénèse des lysosomes. Cependant, les altérations d'ESCRT ne semblent pas modifier le nombre de lysosomes dans les cellules (Doyotte et al., 2005; Filimonenko et al., 2007; Futter and White, 2007; Rusten et al., 2007b).

### **1.6. Implication de la machinerie ESCRT dans les maladies neurodégénératives.**

Le terme de neurodégénérescence regroupe les maladies qui sont accompagnées d'une perte progressive de constituants de tissus nerveux, dont les neurones. Plusieurs protéines de la machinerie ESCRT ou auxiliaires, ont été reliées à ces pathologies (tableau X).

**Tableau 3 : Maladies neurodégénératives impliquant directement ou indirectement des sous-unités des complexes ESCRT. Tableau adapté et actualisé à partir de la revue sur les liens entre ESCRT et pathologies (Stuffers et al., 2009).**

Complex	Subunit	Disease	Material	Refs
ESCRT-III	CHMP2B	Frontotemporal Dementia (FTLD-U) and ALS Alzheimer's deases	Human cells Human brain	(Skibinski et al., 2005a; Parkinson et al., 2006; Cox et al., 2010; Yamazaki et al., 2010)
ESCRT-I/III	TSG101 / CHMP3 / CHMP2B	Neurodegeneration (FTLD-U, ALS, Huntington's disease)	Human cells, mouse cells	(Filimonenko et al., 2007a)
ESCRT-I/II/III	Vps28 / Vps25 / Snf7 / Vps4	Neurodegeneration (Huntington's disease)	Drosophila	(Rusten et al. 2007)
ESCRT-III	CHMP4B / CHMP2B	Neurodegeneration (FTLD-U, ALS)	Drosophila, mice	(Lee et al., 2007a)
ESCRT-I associated	TSG101	Spongiform neurodegeneration (hallmark of prion disease)	Human cells, rat tissue	(Kim et al., 2007)
ESCRT-I associated	TSG101	Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1C)	Human cells, HEK cells	(Shirk et al., 2005)
ESCRT-III associated	CHMP1B CEP55 SPASTIN	Hereditary spastic paraplegia	Monkey cells	(Hazan et al., 1999; Hughes et al., 2001; Reid et al., 2005; Sagona et al., 2010)

### 1.6.1. Des sous unités de complexes ESCRT reliées aux maladies neurodégénératives (MND).

La machinerie ESCRT a été indirectement reliée à plusieurs MND, suite à l'implication dans ces pathologies de protéines qui lui sont associées (tableau3):

Les encéphalopathies spongiformes forment une famille de neurodégénérescences caractérisées par un aspect spongieux du parenchyme cérébral. La plus connue d'entre elle étant la maladie de Creutzfeldt–Jakob, induite par la protéine prion. Chez la souris, une mutation dans le gène codant l'ubiquitine ligase Mahogunin provoque l'apparition d'une dégénérescence de ce type (He et al., 2003). Or, TSG101 est un substrat de cette ubiquitine ligase, à laquelle il se lie via son motif PSAP. La Mahogunin semble aussi nécessaire à la dégradation de l'EGFR.

TSG101 est aussi indirectement lié à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1), qui atteint le système nerveux périphérique, provoquant la démyélinisation des axones. Or TSG101 interagit avec SIMPLE (small integral membrane protein of the lysosome/late endosome), qui serait muté dans un à deux pourcent des de CMT1 (Shirk et al., 2005). La fonction de SIMPLE et l'importance de son interaction avec TSG101 dans la pathologie sont encore inconnues.

Enfin trois gènes différents à l'origine de paraplégies spastiques familiales - SPG4, SPG15, et SP20 - codent des protéines qui ont des interactions fonctionnelles avec ESCRT-III ; ces protéines partenaires sont respectivement la Spastine (Yang et al., 2008; Connell et al., 2009), FYVE-CENT (Sagona et al., 2010) et Spartin (Renvoise et al., 2010). Les patients atteints de ces paraplégies présentent une faiblesse musculaire très progressive atteignant les membres inférieurs et s'accompagnant d'une hypertonie musculaire des membres inférieurs. Les mécanismes moléculaires qui relient les trois protéines à cette pathologie ne sont pas clairs. Néanmoins elles sont toutes deux impliqués dans la cytokinèse au côté d'ESCRT-III, ce qui suggère un rôle développemental. Elles partagent aussi la caractéristique de faire le lien entre ESCRT-III et les microtubules. Sachant qu'ESCRT joue un rôle important dans le maintien de structures micro-tubulaires comme le centrosome et de fuseau mitotique (Morita et al., 2010), elles pourraient aussi jouer un rôle dans la croissance neuritique, notamment dans le développement de l'axone.

### 1.6.2. Des mutations dans le gène codants pour CHMP2B sont la cause de MND.

#### 1.6.2.1. Démences fronto-temporales.

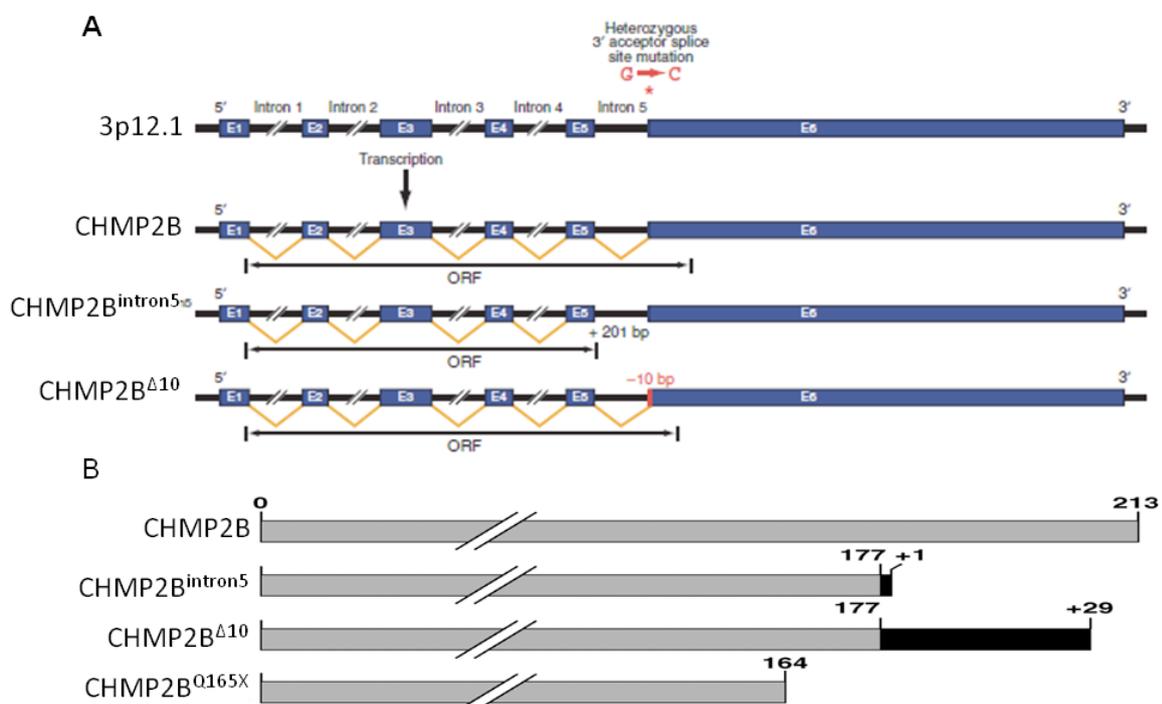
La preuve la plus directe d'un lien entre neurodégénérescence et machinerie ESCRT provient de la découverte chez une famille danoise que des mutations dans le gène CHMP2B provoquent l'apparition d'une forme de démence fronto-temporale (DFT) (Skibinski et al., 2005b; Parkinson et al., 2006). Ce gène étant localisé sur le chromosome 3, cette forme de DFT porte le nom de DFT3.

Les DFT surviennent un peu avant l'âge de 60 ans et sont caractérisées du point de vue histopathologique par une atrophie importante des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral (Rohrer et al., 2009), et par la présence anormale d'agrégats protéiques intracytoplasmiques, sans augmentation notable des dépôts d'amyloïde (Neumann et al., 2009). Dans le cas des DFT3 l'atrophie concerne une large portion du cortex et est déjà détectable par IRM au stade présymptomatique. Cliniquement, la pathologie se traduit progressivement par des changements sévères de la personnalité et du comportement (apathie, isolement, irritabilité, émotivité excessive, troubles de l'attention), des altérations du langage (perte de la parole, écholalie) , sans que la mémoire épisodique ne soit trop affectée (McKhann et al., 2001). Ces perturbations cognitives et affectives sont souvent associées à des mouvements désordonnés (syndrome parkinsonien) et des maladies des motoneurones (Ringholz and Greene, 2006).

Collectivement, les DFT sont les plus répandues des démences pré-séniles après la maladie d'Alzheimer, et 30 à 50 % des cas sont des formes familiales. Les principaux gènes reliés à cette maladie sont ceux codant la protéine TAU, associée aux microtubules, et la Progranuline ; les mutations de ces deux gènes comptent chacune pour 10% des cas de DFT (Hutton et al., 1998; Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006; Gass et al., 2006). Le rôle des mutations de CHMP2B n'a lui été démontré que dans une minorité de cas, les données les plus extensives provenant de l'important groupe familial danois.

La mutation de CHMP2B à l'origine de l'apparition de DFT identifiée chez la famille danoise concerne le site accepteur d'épissage de l'exon 6 (figure16A). Cette mutation conduit à un épissage aberrant de l'ARN pré-messager qui peut alors aboutir à la formation de deux ARN messagers mutants (figure16B). En effet soit il n'y a pas d'épissage du tout, un intron (n°5) est retenu dans l'ARNm mature, et cet intron introduit un codon stop en phase

avec l'exon 4 (Skibinski et al., 2005b). Ce transcrit code le mutant nommé CHMP2B<sup>intron5</sup>, qui est formé des 177 premiers acides aminés de CHMP2B suivis d'une Valine. Soit l'épissage a bien lieu mais en utilisant un site cryptique situé dans l'exon 6. Cet ARNm code lui le mutant CHMP2B<sup>Δ10</sup> formé des 177 premiers acides aminés de CHMP2B suivis de 28 autres aberrants. Les patients examinés étant hétérozygotes, chaque cellule de patient contient trois versions de la protéine : CHMP2B sauvage, CHMP2B<sup>intron5</sup> et CHMP2B<sup>Δ10</sup>. Le gène pathologique étant dominant, et vu l'effet biochimique des mutations, il est probable que la maladie résulte d'un effet dominant des protéines CHMP2B<sup>intron5</sup> et/ou CHMP2B<sup>Δ10</sup>; on ne peut toutefois exclure qu'il y ait également insuffisance de dose de la protéine normale (haplo-insuffisance).



**Figure 16 : Mutants de CHMP2B impliqués liés à la démence fronto-temporale**

**A :** Épissage de l'ARNm pré-messager de CHMP2B et de ses mutants. L'étoile rouge indique la position de la mutation. Le transcrit CHMP2B<sup>intron5</sup> conserve l'intron 5. Le transcrit CHMP2B<sup>Δ10</sup> utilise un site cryptique dans l'exon 6. E : exon, ORF : Open Reading Frame (Skibinski et al., 2005a).

**B :** Structure primaire des protéines CHMP2B de type sauvage (wt) et mutantes. **+1** : valine qui remplace la partie C-terminale normale dans CHMP2B<sup>intron5</sup>. Le rectangle noir dans CHMP2B<sup>Δ10</sup> indique la partie C-terminale aberrante portée par ce mutant (Urwin et al., 2010a).

Une autre mutation du gène de CHMP2B conduisant à une forme tronquée a été détectée chez un patient belge. Cette mutation non-sens se situe dans l'exon 5 du gène codant pour CHMP2B et conduit à la production d'un mutant plus court que CHMP2B<sup>intron5</sup>

uniquement formé des 165 premiers acides aminés de CHMP2B : CHMP2B<sup>Q165X</sup> (van der Zee et al., 2008).

#### **1.6.2.2. Une cause endosomale de la DFT?**

L'expression des mutants CHMP2B<sup>intron5</sup> ou CHMP2B<sup>Δ10</sup> dans une lignée neuronale (PC12), ou de CHMP2B<sup>Q165X</sup> dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (SK-N-SH) provoque la formation d'endosomes tardifs aberrants (Skibinski et al., 2005a; van der Zee et al., 2008). L'équipe d'Adrian Isaacs a confirmé l'existence de ces structures dans les cerveaux des patients danois, et dans leurs fibroblastes mis en culture à partir de tissu biopsié (Urwin et al., 2010a). L'étude de ces fibroblastes a révélé un fort ralentissement de la dégradation du récepteur à l'EGF. Ce phénomène ne serait pas dû à une interférence dans la genèse des ILV, mais à un problème de fusion entre les endosomes et les lysosomes. Ces mutants ont perdu l'hélice α6 de CHMP2B qui comporte le domaine MIM de liaison à VPS4 (Stuchell-Brereton et al., 2007) et pourrait jouer un rôle dans l'auto-inhibition de cette protéine (Zamborlini et al., 2006). Les auteurs proposent donc que les mutants de CHMP2B agissent par défaut de recyclage dans le cytosol. Ils s'accumuleraient alors à la membrane de l'endosome et empêcheraient le recrutement de facteurs de fusion comme RAB7.

Ces découvertes sont les premières à montrer directement un rôle de CHMP2B dans la voie endolysosomale. Or cette voie joue un rôle crucial dans la physiologie neuronale, en assurant la régulation, le trafic et la signalisation de protéines de surfaces neuronales comme les récepteurs aux neurotransmetteurs ou aux facteurs neurotrophiques (Bronfman et al., 2007; Hanley, 2010).

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, les mutations touchant le gène codant pour la Progranuline (PGRN) sont à l'origine de 10% des DFT. Or PGRN joue le rôle de facteur de croissance ; elle favorise la survie et la pousse neuritique de motoneurons et de neurones corticaux de rats (Van Damme et al., 2008). Par leur impact sur le trafic endolysosomal, les mutants de CHMP2B pourraient altérer la perception par les neurones des signaux trophiques comme ceux portés par PGRN, ce qui pourrait altérer leur survie. Cette possibilité n'a toutefois pas été testée à ce jour.

#### **1.6.2.3. Des dysfonctionnements de l'autophagie à l'origine de DFT ?**

Les effets des mutants de CHMP2B sur l'autophagie pourraient contribuer à la pathogenèse de la DFT3. En effet l'expression de CHMP2B<sup>intron5</sup> dans des neurones corticaux

en culture provoque l'accumulation d'autophagosomes et la mort de ces cellules en quelques jours (Lee et al., 2007b). L'inhibition de l'autophagie par des composés chimiques ou l'extinction de protéines nécessaires à l'autophagie (ATG9 ou ATG7) ralentit la mort de ces neurones, sans toutefois l'empêcher (Lee and Gao, 2009). Cette observation étaye l'idée que l'accumulation d'autophagosomes constitue un stress délétère, mais montre aussi que par elle-même cette accumulation ne suffit pas à expliquer la mort neuronale. .

Comme nous l'avons déjà mentionné, le rôle de la machinerie ESCRT dans l'autophagie n'est pas encore clairement compris, mais des altérations de la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes décrites par l'équipe d'Adrian Isaacs pourraient aussi provoquer cette accumulation toxique d'autophagosomes.

D'autre part, l'autophagie joue un rôle crucial dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson et de Creutzfeldt–Jakob en prenant en charge la dégradation d'agrégats protéiques toxiques (Rubinsztein, 2006; Levine and Kroemer, 2008; Yue et al., 2009). Dans les DFT comme les ALS, ces accumulations sont principalement constituées de P62, d'ubiquitine, de tau, FUS (fused in sarcoma), et de TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006; Urwin et al., 2010b). Dans des cellules hétérologues (HeLa), l'expression de CHMP2B<sup>intron5</sup> ou CHMP2B<sup>Δ10</sup> suffit pour déclencher l'agrégation de P62 s'accumule sur des structures membranaires . L'extinction par SiRNA de TSG101 ou de CHMP3 provoque également l'accumulation de TDP-43 dans des structures riches en ubiquitine, et celle de CHMP3 inhibe la dégradation de Huntingtin polyQ, protéine responsable de la maladie de Huntington. ESCRT semble donc requis pour prévenir l'accumulation de protéines anormales qui pourrait aboutir à la dégénérescence de neurones (Filimonenko et al., 2007b).

Le blocage de l'autophagie par les mutants de CHMP2B pourrait ainsi avoir une double conséquence délétère. L'accumulation d'autophagosomes, est un stress pour les cellules en soi (Lee and Gao, 2009), et la perte d'efficacité dans la dégradation d'inclusions induit l'accumulation de protéines toxiques pour les neurones (Filimonenko et al., 2007b).

Cependant, si les expériences énumérées ci-dessus mettent en évidence les effets toxiques d'une expression (à taux relativement élevé) de CHMP2B mutée, elles ne permettent pas de conclure que ces effets expliquent la pathogenèse de la DFT3. De plus,

leur caractère rapide et massif (mort de neurones après quelques jours d'expression de CHMP2B<sup>intron5</sup>) est difficile à concilier avec la durée présymptomatique de la maladie, qui se compte en décennies. On peut donc soupçonner qu'en dehors de perturbations toxiques de l'autophagie, les mutations de CHMP2B pourraient avoir des conséquences encore inexplorées pour la physiologie neuronale (voir chapitre suivant).

#### 1.6.2.4. Sclérose latérale amyotrophique

Des mutations dans le gène codant CHMP2B ont été aussi identifiées chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (ALS), ou maladie de Charcot (Parkinson et al., 2006; Cox et al., 2010). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs du cortex cérébral et de la moelle épinière. Les symptômes se manifestent avant tout au niveau musculaires : hyper-réflexie, spasticité, fasciculations, crampes, perte de force musculaire, fonte musculaire ; qui évoluent vers une paralysie progressive accompagnée d'amyotrophie puis vers la mort. Sa vitesse d'évolution peut varier beaucoup comme le montre le cas célèbre du physicien Stephen Hawking diagnostiqué en 1963 et encore vivant à ce jour, et a contrario celui de l'historien Tony Judt, mort en 2010 quelques mois après le diagnostic. La maladie survient en général entre 55 et 70 ans, sa prévalence est de 5 à 7 pour 100 000 (McDermott and Shaw, 2008), 5 % des cas sont des formes familiales, la plupart étant à transmission autosomique dominante. Des études faite chez une cohorte de 433 patients en Nouvelle-Angleterre montrent que les mutations sur le gène CHMP2B pourraient être à l'origine de 1% des ALS ; soit la moitié (2%) de la fréquence de mutation du gène SOD qui est la première cause familiale de cette maladie (Cox et al., 2010)

Contrairement aux mutations identifiées dans les DFT, celles présentes chez les patients atteint de SLA sont des substitutions. La première (CHMP2B<sup>I29V</sup>) est le remplacement d'une isoleucine par une valine dans l'hélice  $\alpha$ 1, qui a été retrouvée chez trois patients. La deuxième (CHMP2B<sup>T104N</sup>) concerne une thréonine remplacée par une asparagine dans l'hélice  $\alpha$ 3. La dernière (CHMP2B<sup>Q206H</sup>), une glutamine remplacée par une histidine dans l'hélice  $\alpha$ 6. Cette dernière mutation touche le domaine MIM de CHMP2B. D'après la co-cristallisation de ce domaine MIM avec le domaine MIT de VPS4, cette glutamine 206 serait impliquée dans l'interaction avec l'ATPase VPS4 (par une liaison hydrogène avec le Glutamate 70 du domaine MIT)(Stuchell-Brereton et al., 2007). Cette mutation pourrait donc interférer avec l'interaction entre CHMP2B et VPS4, ce qui reste à

prouver expérimentalement. L'expression de ces formes mutées de CHMP2B dans les cellules Hela provoque l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme, et une élévation de la quantité du marqueur d'autophagie LC3, ce qui suggère une accumulation d'autophagosomes (Cox et al., 2010). Même si ces données ne sont pas suffisantes pour conclure aux mécanismes de la SLA induite par les mutants de CHMP2B, il est troublant de ces observations concordent avec les phénotypes des mutants impliqués dans les DFT. Quelle différence fondamentale entre ces deux groupes de mutations pourrait expliquer les différents loci de perte neuronale qui provoque deux pathologies distinctes? La question est ouverte.

La machinerie ESCRT est donc reliée plus ou moins directement à tout un panel de MND. Son implication dans l'endocytose ou l'autophagie pourrait être à l'origine de certaines de ces pathologies. Mais la découverte récente de l'implication de cette machinerie dans le modelage des microtubules suggère que d'autres processus pourraient aussi être en jeu.

### **1.7. Conclusion générale ESCRT**

Le complexe ESCRT-III possède donc la capacité originale de pouvoir provoquer la scission d'une membrane « par l'intérieur ». Ce potentiel est utilisé par différents processus cellulaires (genèse des CMV, autophagie, dynamique du centrosome...), ainsi que par certains pathogènes comme un grand nombre de virus enveloppés.

L'intense travail de recherche autour de la machinerie ESCRT, principalement chez la levure, a permis de préciser les rôles respectifs des différents complexes ESCRT et associés. ESCRT-0 amène et concentre le cargo ubiquitinylé et recrute ESCRT-I dans des microdomaines des endosomes de tri. ESCRT-I et ESCRT-II semblent former un super complexe de déformation membranaire responsable de la formation de bourgeons à la membrane de l'endosome, qui donneront naissance aux ILV. Ce super complexe permet aussi d'adresser le cargo dans les vésicules, et de recruter et d'activer ESCRT-III au niveau du cou du bourgeon pour permettre la fission. Mais ESCRT-I peut aussi fonctionner indépendamment d'ESCRT-II dans les cas où les cous de bourgeon sont préalablement formés par d'autres acteurs (cytokinèse, bourgeonnement viral). Dans ce cas, Alix pourrait remplacer ESCRT-II dans son rôle de lien entre ESCRT-I à ESCRT-III.

ESCRT-III et le complexe VPS4/VTA1 sont au cœur de toute la machinerie ESCRT, des archéobactéries aux eucaryotes supérieurs. Ils forment la machinerie minimale de fission membranaire et sont pourtant les moins bien définis en termes de composition et de structure. Toutefois, si nombre de présentations supposent (souvent implicitement) que les fonctions respectives des sous-unités d'ESCRT-III, leur assortiment et leur séquence d'assemblage sont largement similaires chez les mammifères à ceux décrits chez la levure, peu de données expérimentales confirment cette extrapolation. Certaines vont même à l'encontre de cette idée. Par exemple, chez la levure VPS24/CHMP3 et Vps2/CHMP2 ne semblent pas participer au remodelage membranaire qui accompagne la polymérisation d'ESCRTIII. Pourtant leurs homologues humains CHMP3 et CHMP2A s'associent *in vitro* pour former des structures tubulaires terminées par des dômes qui comportent les caractéristiques suffisantes pour provoquer directement une fission de la membrane au cou d'un bourgeon.

Enfin, des mutations dans le gène codant CHMP2B, un composant d'ESCRT-III provoquent l'apparition de maladies neurodégénératives (démence frontotemporale et Sclérose latérale amyotrophique). La surexpression de certains mutants de CHMP2B résultant de ces mutations provoque la mort des neurones en quelques jours. Ces expériences suggèrent une toxicité aiguë de ces mutants, qui n'explique pourtant pas l'apparition tardive des symptômes dans ces pathologies. Il est donc probable que des modifications plus subtiles de la physiologie neuronale soient aussi impliquées dans l'apparition de ces maladies. Quoi qu'il en soit, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces phénomènes sont encore obscurs puisque jusqu'à maintenant aucune étude ne traite de la place de CHMP2B au sein du complexe ESCRT-III.

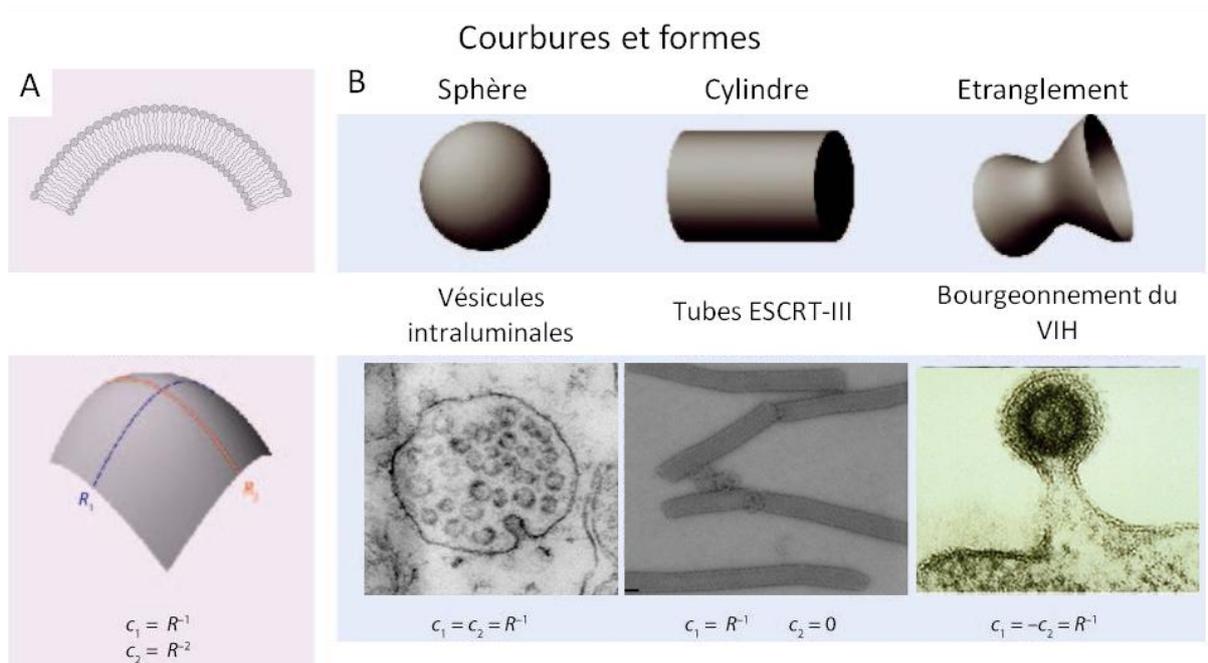
## **2. Mécanismes de remodelage membranaire**

### **2.1. Principes généraux :**

Les eucaryotes ont au cours de l'évolution compartimentalisé des processus cellulaires fondamentaux dans des structures délimitées par des membranes lipidiques: les organelles.

A l'état isolé, les bicouches lipidiques tendent à rester planes (sphérique pour les vésicules). Pourtant si certaines organelles comme les lysosomes ou les péroxisomes sont sphériques, la plupart adoptent des morphologies plus complexes. Les mitochondries par exemple, forment un réseau tubulaire, l'appareil de Golgi des feuilletts superposé interconnectés par de courts tubes, les filipodes de long tubes qui s'étendent dans le milieu extracellulaire... Leurs formes sont essentielles au fonctionnement de ces organelles. Elles doivent donc être stables, mais aussi dynamiques puisqu'elles sont modifiées en fonction des besoins et de l'état de la cellule (mitose, migration cellulaire.....). Enfin la plupart des organelles communiquent entre elles ou avec la membrane plasmique via un trafic vésiculaire intense mettant en jeu des processus de fusion et de fission membranaires. Tout ceci implique un modelage intense des membranes par modification de leurs courbures (McMahon and Gallop, 2005; Zimmerberg and Kozlov, 2006).

La forme de la membrane en un point donné peut être caractérisée par les deux courbures principales, paramètres géométriques dont les valeurs sont les inverses des rayons de deux arcs perpendiculaires en ce point, et dont le signe dépend de la convexité locale (figure17).



**Figure 17: Courbures et formes membranaires :**

A : La forme d'une membrane à un point donné peut être caractérisée par les courbures de deux arcs ( $C_1=1/R_1$  et  $C_2=1/R_2$ ) perpendiculaires en ce point.

B : Exemple de trois formes de base couramment adoptées par les membranes biologiques, illustrées par des exemples observés en microscopie électronique. Pour la sphère (vésicules intraluminales...), les rayons sont identiques ( $C_1=C_2$ ). Pour un tube comme ceux formés par ESCRT-III,  $C_1$  est l'inverse du rayon du tube, mais  $C_2$  est nulle. Enfin au niveau du cou d'une vésicule ou d'un virus enveloppé,  $C_1$  et  $C_2$  sont de signes opposés. (Shibata et al., 2009).

La courbure de bicouches lipidiques est un processus énergivore, puisqu'il demande de s'écarter de la courbure dite de repos. Ce coût énergétique, estimé par des modèles de déformation élastique se situe dans des ordres de grandeur compatibles avec les activités métaboliques (une dizaine de molécules d'ATP suffisent à former un tube de 60nm X 60nm par exemple) (Helfrich, 1973; Helfrich and Jakobsson, 1990). Ces déformations sont assurées selon cinq types de processus.

## **2.2. Courbure membranaire par des lipides.**

*In vitro*, des inhomogénéités dans la distribution de certains lipides de part et d'autre de la bicouche (distribution asymétrique) ou latéralement (domaines lipidiques ou « lipid rafts ») peuvent suffire à provoquer des courbures de la membrane, déformer des liposomes en tubes, ou y induire des bourgeonnements (figure18A) (Stowell et al., 1999; Baumgart et al., 2003; Bacia et al., 2005). Mais la génération de fortes courbures membranaires (plusieurs dizaines de nanomètres) requiert une forte asymétrie qui ne se forme probablement pas

spontanément dans la cellule (Zimmerberg and Kozlov, 2006; van Meer et al., 2008). Certaines protéines pourraient ainsi induire localement ces fortes asymétries lipidiques responsables de courbures membranaires.

### **2.2.1. Action des Flipases :**

Les Flipases sont des enzymes qui peuvent transférer des phospholipides d'un feuillet de la membrane à l'autre. Ce faisant, elles peuvent provoquer une différence de quantité de molécules entre les monocouches, qui auront donc des aires différentes. Ce mécanisme ne fonctionne que si les flipases agissent autour d'un petit compartiment membranaire (Daleke, 2007), car l'asymétrie qu'elles génèrent sera diluée si l'aire du compartiment est trop grande.

### **2.2.2. Enzymes de modification des lipides :**

La nature des lipides conditionne leur positionnement côte à côte dans la monocouche lipidique, et influence ainsi sa forme. Certains lipides (la lysophosphatidylcholine (LPC), la phosphatidylcholine (PC), le diacylglycerol (DAG)...) ont donc une tendance intrinsèque à courber les membranes (Chernomordik and Kozlov, 2003; Zimmerberg and Kozlov, 2006). Or la courbure spontanée d'une monocouche est à peu près égale à la moyenne des courbures spontanées des lipides la constituant. De plus, la courbure spontanée d'une bicouche correspond à la différence entre les courbures spontanées des deux monocouches qui la constituent. Donc la modification asymétrique de la composition lipidique d'une monocouche par une enzyme peut induire une courbure de la membrane (figure18A).

#### **Lysophospholipid acyltransferases (LPAT) et phospholipase A (PLA) :**

Les PLA (PLA<sub>1</sub> ou PLA<sub>2</sub>) clivent les phospholipides pour les transformer en lysophospholipides qui ont une courbure de membrane spontanée positive. Les LPAT catalysent la réaction inverse. Ces enzymes participent à la formation de tubules membranaires au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes (Brown et al., 2003).

### **2.2.3. Les sphingomyélinases :**

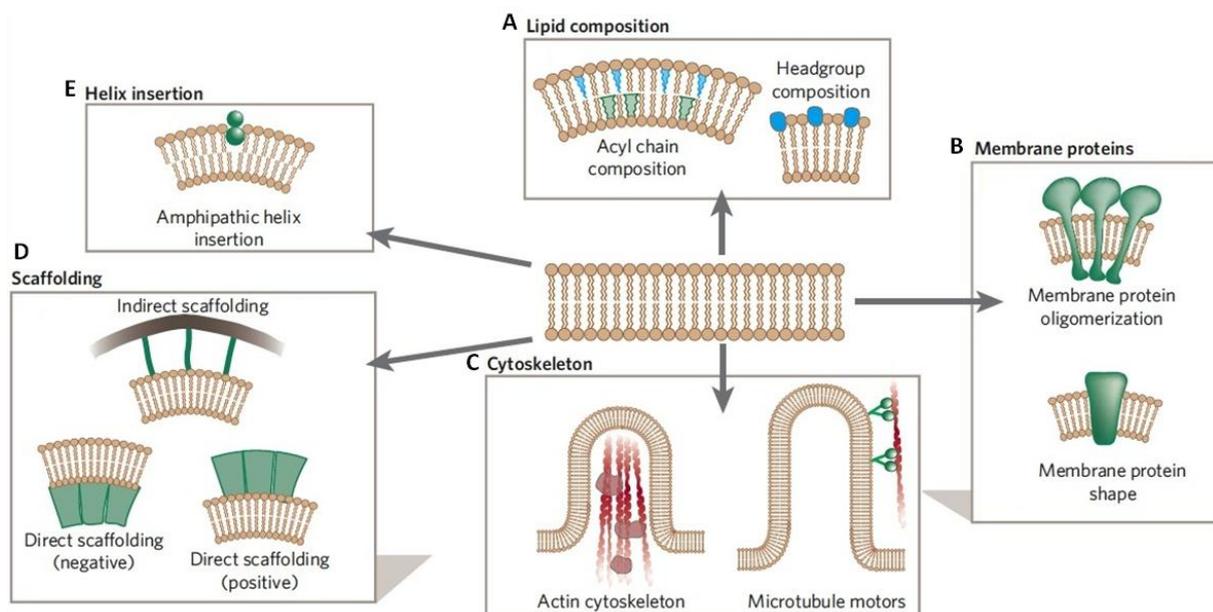
La sphingomyéline n'a pas de courbure spontanée, mais le clivage de la tête de phosphocholine par la sphingomyélinase la transforme en céramide, qui a une courbure

spontanée négative. Ce processus serait utilisé par la cellule pour permettre la formation d'exosomes (Trajkovic et al., 2008).

Différentes enzymes peuvent donc changer la courbure des membranes en modifiant les lipides, tant au niveau de leurs têtes hydrophiles que de leurs queues hydrophobes.

### 2.3. Courbure membranaire par les protéines.

Certaines protéines peuvent donc modeler les membranes en modifiant la composition chimique des monocouches. D'autres agissent directement sur les membranes en leur imposant des contraintes mécaniques. Trois principaux mécanismes sont à disposition des protéines pour leur permettre de générer directement de fortes courbures membranaires (figure 18 B et E, C, D) (McMahon and Gallop, 2005; Zimmerberg and Kozlov, 2006; Shibata et al., 2009).



**Figure 18: Mécanismes de déformation membranaire.**

Les bicouches lipidiques peuvent être déformées par courbure (positive ou négative). Cinq types de mécanismes peuvent conduire à ces déformations (McMahon and Gallop, 2005).

A: Changement dans la composition lipidique de la bicouche.

B: Influence de protéines transmembranaires qui ont une courbure intrinsèque ou qui en acquièrent une lors de leur polymérisation.

C: Déformation issue de la force exercée par le cytosquelette lors de sa polymérisation ou sous l'action de moteurs moléculaires.

D: Un échafaudage protéique impose sa courbure à la membrane.

E: Insertion d'un domaine protéique à l'intérieur d'un feuillet de la bicouche.

Le premier mécanisme (figure 18C) requiert l'utilisation d'une force mécanique pour tirer sur la membrane et ainsi former des tubes. Cette force est généralement produite par des moteurs moléculaires qui voyagent le long des microtubules ou par des filaments d'actine qui se polymérisent. Le travail peut aussi être fourni à l'intérieur du tube, en poussant sur la membrane comme le fait l'actine dans le cas de filopodes, ou la tubuline pour le cil primaire.

Le deuxième mécanisme implique la formation d'une matrice protéique (protéines d'échafaudage) à forte courbure, qu'elle impose à la membrane par d'importantes interactions électrostatiques avec les lipides anioniques. La rigidité de cette matrice doit être largement supérieure à celle de la membrane, et l'énergie libérée par son interaction avec les lipides doit être supérieure à celle nécessaire à la courbure. La figure 18D schématise cette déformation positive (« par l'extérieur ») dans le cas de matrices concaves (Clathrine, Caveoles...), et négatives (« par l'intérieur ») pour les matrices convexes comme les protéines à domaines I-BAR ou le complexe ESCRT-III (Hanson et al., 2008; Ahmed et al., 2010)

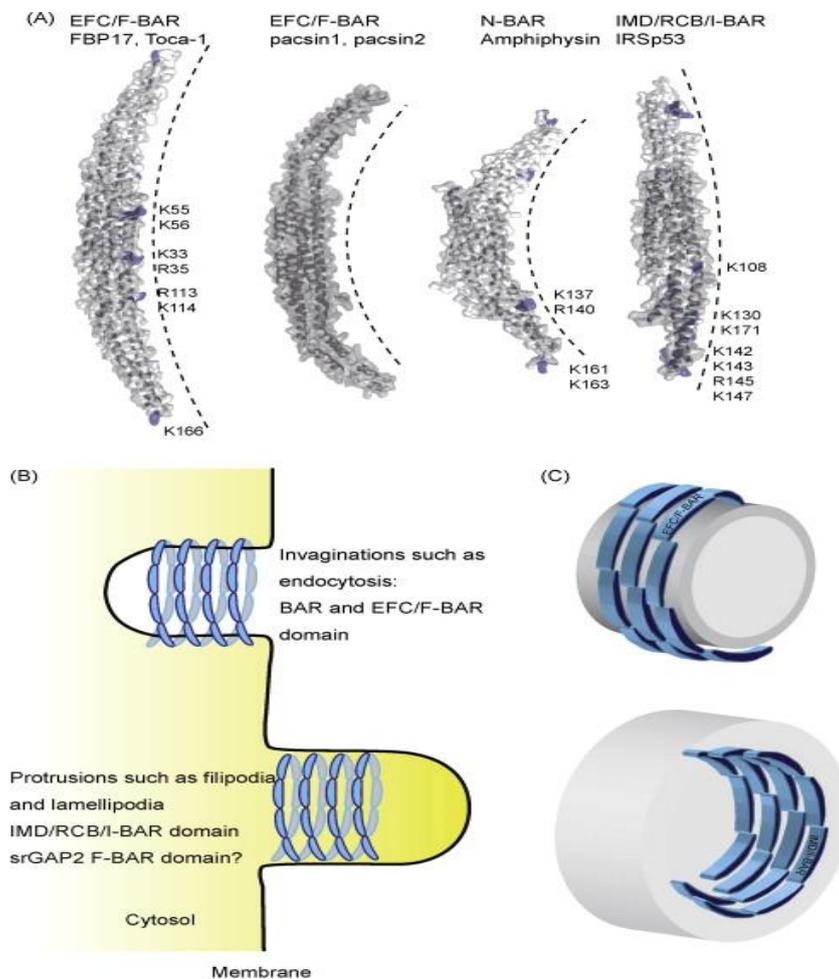
### **2.3.1. Protéines d'échafaudage : Exemple des protéines à domaines BAR :**

Les protéines à domaines BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) forment une superfamille regroupant les protéines à EFC/N-BAR, F-BAR et I-BAR. Ces domaines ont une forme caractéristique de banane et se lient aux membranes par une interface basique fortement chargée (Peter et al., 2004; Gallop and McMahon, 2005). Certains de ces domaines comme celui de l'endophilin-A1 présentent aussi sur ces interfaces des motifs aliphatiques qui s'insèrent dans la membrane et participent à la déformation (Masuda et al., 2006).

Ils imposent et détectent donc des courbures membranaires qui sont propres à chaque type de domaine BAR, comme l'illustre la figure 19. Grâce à cette variété de formes, ils sont impliqués dans la courbure de nombreuses structures membranaires comme les puits de Clathrine ou les filopodes (Suetsugu et al., 2010).

Il est intéressant de noter que contrairement aux autres domaines de cette superfamille, la surface d'interaction aux lipides des domaines I-BAR (inverse BAR) est

convexe, ce qui lui permet de former des tubes depuis l'intérieur comme pour IRSp53, qui participe à la formation des filopodes (Ahmed et al.; Mattila et al., 2007).



**Figure 19 : Structures des domaines BAR:**

A: Structures de domaines BAR de FBP17, pacsin2, l'amphiphysin de drosophile, et d'IRSp53. Les acides aminés responsables de la liaison aux lipides sont colorés en bleu. Les pointillés indiquent la courbure de la membrane (Suetsugu et al., 2010).

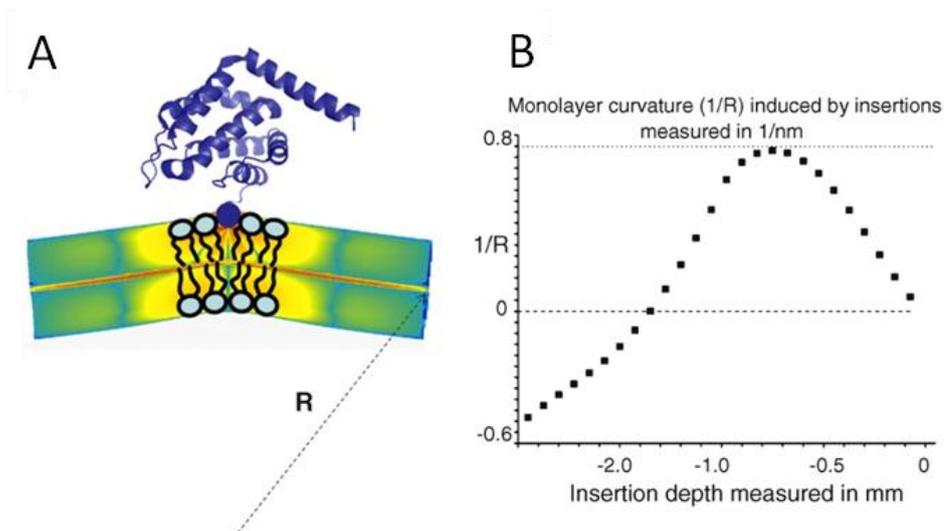
B: Modèles de déformation membranaire par certaines protéines à domaines BAR. Ces protéines s'assemblent bout à bout pour former des spirales qui provoquent la formation de tubes membranaires.

Le troisième mécanisme de déformation directe des membranes par les protéines implique l'insertion d'une partie de la protéine dans la bicouche lipidique. Elles peuvent être insérées de manière transitoire ou permanente dans les membranes, ce qui parfois influence fortement leur courbure. Ces protéines peuvent être séparées en deux catégories, celles

dont un domaine pénètre une seule couche de lipides, et les transmembranaires, qui traversent la bicouche.

### 2.3.2. Insertion hydrophobe dans une monocouche.

L'insertion dans le feuillet provoque une asymétrie dans la bicouche qui peut induire sa courbure de deux façons: en générant une courbure locale, ou en augmentant la surface d'une des monocouches (figure20A). L'importance respective de ces deux phénomènes dépend de la profondeur de l'insertion dans la monocouche. Si l'hélice rentre peu, elle écarte les têtes hydrophiles sans perturber les queues hydrophobes. Elle génère donc principalement une courbure spontanée locale alors que si elle traverse entièrement la monocouche, elle écarte les phospholipides dans leur longueur et agit donc principalement sur l'aire (figure20B).



**Figure 20: Déformation membranaire par insertion d'un segment peptidique hydrophobe.**

A : Déformation membranaire locale par insertion d'une hélice amphipathique, exemple du domaine ENTH de l'EPSIN2. La déformation de la membrane a été modélisée par ordinateur, et les stress élastiques sont représentés par les codes couleurs (Campelo et al., 2008).

B : Courbure de la membrane modélisée en fonction de la profondeur de l'insertion de l'hélice.

Différents domaines sont capables de procéder à cette insertion parmi lesquels:

- Les domaines N-Bar des endophilines ou de l'Amphiphysine et les domaines ENTH des Epsines (McMahon and Gallop, 2005).

- Les hélices N-terminales des petites GTPases SAR1 et ARF1, qui s'insèrent dans la monocouche et déforment les membranes quand elles sont associées au GTP (Antonny et al., 1997; Lee et al., 2005; Krauss et al., 2008).
- Le domaine C<sub>2</sub> de la synaptotagmine, qui s'insère dans la monocouche après liaison au calcium (Martens et al., 2007; Martens, 2010)

Tous ces mécanismes ne sont pas exclusifs, ils opèrent de concert pour générer la variété de formes que les membranes adoptent dans la cellule.

## **2.4. Fission et fusion membranaire.**

### **2.4.1. Principes généraux :**

La fusion et la fission membranaires sont deux mécanismes intimement liés, et reliés à la courbure (Chernomordik and Kozlov, 2008; Kozlov et al., 2010). (Chernomordik et al., 2006).

Dans le cadre de la fusion, les deux membranes doivent être suffisamment rapprochées les unes des autres pour permettre l'hémifusion, c'est-à-dire la fusion de leurs monocouches externes respectives, ce qui forme une structure intermédiaire, la « tige de fusion » (fusion stalk) (figure 21 A et B). S'ensuit la fusion des monocouches internes, qui termine la fusion des membranes, et provoque l'apparition d'un pore de fusion qui s'élargira plus ou moins suivant les fonctions biologiques impliquées (Chernomordik and Kozlov, 2005).

La fission membranaire suit le même principe de base que la fusion. Les feuillettes internes (de la vésicule) d'une même membrane vont être rapprochés au niveau d'un cou qui pourrait s'assimiler à un pore de fusion qui, cette fois-ci, se resserre plutôt que de s'étendre (figure 21B et C). Les deux monocouches internes (de la vésicule) fusionnent dans le même processus d'hémifusion pour former une « tige de fission ». S'en suit la fusion des feuillettes externes qui marque la séparation des membranes.

L'évènement central et commun à ces deux processus est la formation de la « tige » (figure 21B), qui requiert la déstabilisation des membranes. Deux modèles proposent des explications pour la formation de cette structure. Le premier implique dans le cadre de la fusion la formation de pointes au niveau des feuillettes proximaux (Efrat et al., 2007). Le

deuxième évoque un « grand écart » d'une molécule de lipide, dont les deux chaînes carbonées seraient insérées dans les membranes adjacentes (Holopainen et al., 1999; Smirnova et al., 2010).

Ces processus de remodelage membranaire ne sont possibles que s'ils répondent à deux exigences physiques. L'évènement doit être thermodynamiquement favorable (l'énergie libre du système doit être plus faible après remodelage qu'au départ), et les structures intermédiaires formées doivent être suffisamment instables pour n'être que transitoires dans ces conditions (Kozlov et al., 2010).

Certaines protéines peuvent courber les membranes pour les mettre dans un état favorable à ces remodelages. Ces déformations membranaires provoquent l'accumulation de stress élastiques aux sites de fusion ou de fission. Le relâchement de ces stress, qui accompagne ces remodelages, fournit l'énergie nécessaire à ces processus et garantit la rapidité de la réaction (Kozlov, 2001; McMahon et al., 2010).

Les différents types de mécanismes de courbures membranaires décrits dans le chapitre précédent (insertion hydrophobe, échafaudages protéiques, modification des lipides...) peuvent être employés dans ces processus de fission et de fusion membranaires.

#### **2.4.2. *Machinerie de fusion membranaire : Les SNAREs.***

Les SNAREs (SNAP (Soluble NSF attachment protein) Receptor) sont caractérisées par la présence d'un motif SNARE (Jahn and Scheller, 2006) de 60 à 70 acides aminés. Elles peuvent être divisées en deux sous catégories, les V-SNAREs (vesicle SNAREs) comme la synaptobrevine, qui sont incorporées dans les membranes des vésicules de transport pendant le bourgeonnement, et les T-SNARE (target SNAREs) comme la Syntaxine ou SNAP25 présentes sur la membrane du compartiment cible. Chaque type de fusion membranaire met en jeu un assortiment spécifique des membres de chaque catégorie.

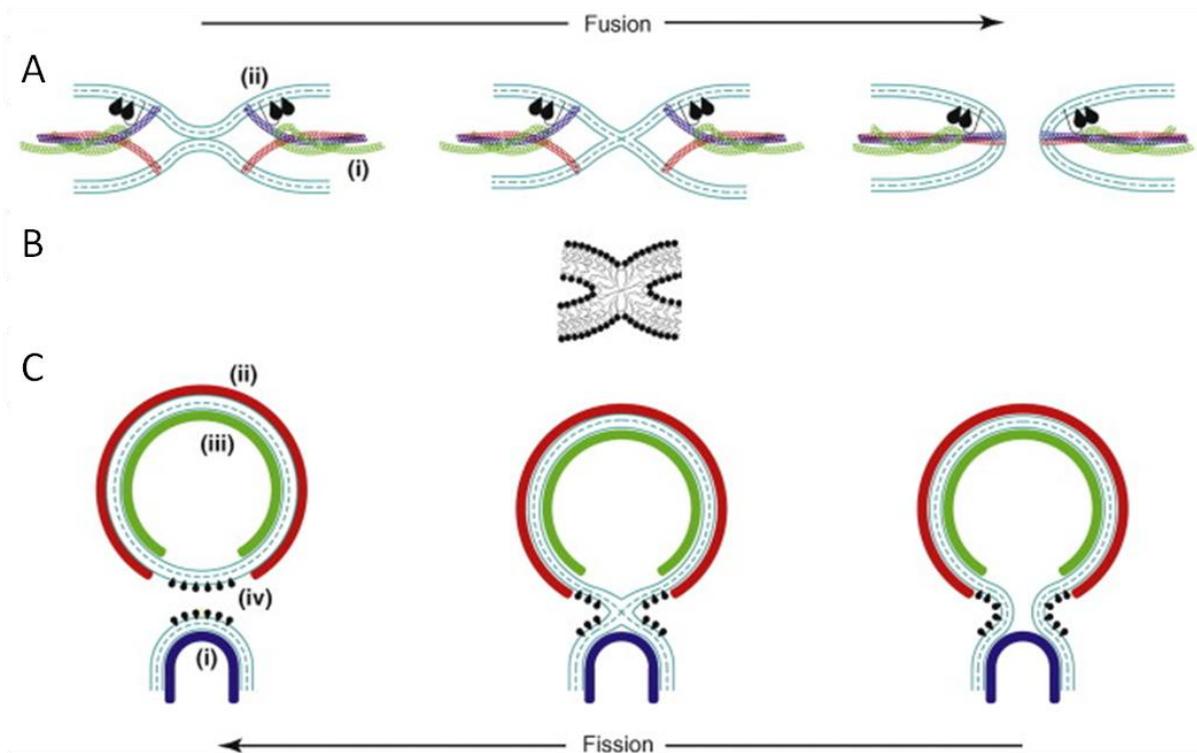
Le plus étudié de ces complexes est celui qui est impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques. Il est composé de trois principales protéines : la syntaxine (t-SNARE) et la synaptobrevine (v-SNARE), dont les domaines SNARE sont reliés par une portion flexible

(linker) à une hélice transmembranaire C-terminale, sont insérées dans des membranes opposées ; et SNAP25, qui est ancré dans la membrane plasmique par plusieurs palmitoylations (figure21A).

Juste avant la fusion, ces trois protéines SNAREs s'associent et forment un complexe en conformation dite « trans » puisque les protéines sont ancrées dans des membranes différentes (Mattila et al., 2007). Cet assemblage commencerait aux extrémités N-terminales et se fermerait progressivement à la manière d'une fermeture éclair en direction des hélices transmembranaires, rapprochant ainsi les deux membranes (Stein et al., 2009). Cette fermeture dépasserait le domaine SNARE de la syntaxine et de la synaptobrevine pour se propager à travers le linker, et aboutir à la formation d'une seule hélice par molécule. Le complexe SNARE formerait alors une tige rigide perpendiculaire à la membrane issue de la fusion (figure21A). Selon ce scénario, la fusion se déroulerait de la manière suivante : la formation du complexe au niveau des domaines SNAREs les aligne et courbe donc les deux linkers. La propagation des hélices dans les linkers les rigidifie, et les redresse en les alignant avec les domaines SNAREs, ce qui a pour conséquence de courber fortement les deux membranes l'une vers l'autre et de générer la fusion (Graham and Kozlov, 2010; McMahon et al., 2010).

Les forces de courbure membranaire nécessaires à la fusion sont donc fournies par la formation de ce complexe. Cette énergie est apportée par l'AAA ATPase NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) qui utilise l'hydrolyse de l'ATP pour démanteler ce complexe.

La synaptotagmine favorise cette fusion. Elle possède un domaine C2 qui se lie au calcium, et s'insère alors dans les membranes pour y induire une forte courbure positive au site de fusion (Martens et al., 2007; McMahon et al., 2010).



**Figure 21: Remodelage membranaire par des complexes protéiques.**

A: Fusion membranaire par le complexe SNARE. La fusion résulte de courbures membranaires générées par le complexe SNARE lors de son passage de sa forme en Y à une tige rigide (i). La synaptotagmin semble participer à cette courbure par l'insertion de son domaine C2 dans la membrane (ii).

La fusion consiste donc en un rapprochement intime des membranes par leur courbure, qui déclenche l'hémifusion et la formation d'une « tige de fusion », puis d'un pore de fusion qui va s'étendre.

B: La tige membranaire: structure éphémère commune aux processus de fusion et de fission.

C: Fission membranaire. La fission résulte des fortes courbures générées au niveau du cou du bourgeon. Ces courbures peuvent provenir par exemple de l'adhésion de la membrane aux structures en forme de dôme d'ESCRT-III (i en bleu). (Kozlov et al., 2010).

### **2.4.3. Fission membranaire.**

L'étape primordiale de la fission est le rétrécissement d'un cou d'une membrane, sous l'action de protéines.

#### **2.4.3.1. Protéines de déformation membranaire et fission.**

Comme nous l'avons déjà largement évoqué, ESCRT-III est un exemple de fission membranaire induite par des protéines d'échafaudage. Il se polymériserait au niveau de la monocouche interne du cou et provoquerait son rétrécissement et l'accumulation de stress élastiques par l'adhésion de la membrane d'un dôme formé par CHMP2 et CHMP3. ESCRT-III

est à l'heure actuelle la seule machinerie cellulaire connue à pouvoir induire ce clivage par l'intérieur.

Les autres mécanismes de fission impliquent l'action de protéines par l'extérieur du cou, comme dans le cas de la dynamine. Cette GTPase est recrutée et se polymérise à l'extérieur des cous membranaires sous forme de structures hélicoïdales qui les stabilisent (Roux et al., 2010). Les premiers modèles proposent que la fission résulterait ensuite d'un rétrécissement et/ou d'un étirement de ce polymère par hydrolyse du GTP (Kozlov and Chernomordik, 2002; Roux et al., 2006) accompagnés de tensions membranaires. De récents résultats suggèrent que les insertions de motifs hydrophiles des domaines PH de la dynamine sont aussi indispensables à la fission (Ramachandran et al., 2009).

Enfin, le cytosquelette de la cellule, et plus précisément l'actine, pourrait déclencher la fission de membranes (Romer et al., 2010). En effet, la formation d'une coque d'actine corticale est suffisante pour induire la scission de tubes formés par la Shiga Toxine.

### **3. Rôle de la morphologie des épines dendritiques dans l'activité neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives**

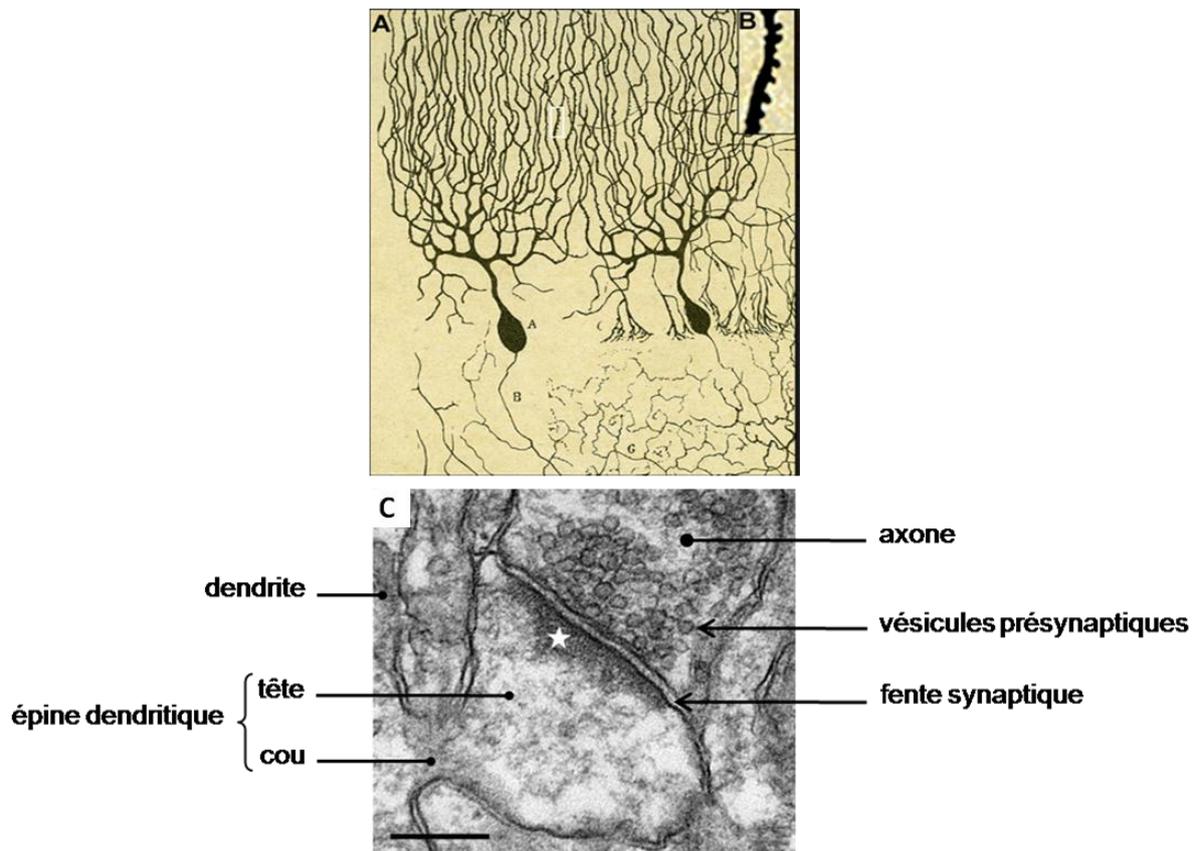
#### **3.1. Structure et fonction des épines dendritiques**

##### **3.1.1. Présentation générale**

En 1888, l'espagnol Ramo'n y Cajal fut le premier à décrire de petites protubérances au niveau des dendrites des cellules de Purkinje de poule, qu'il nomma « espinas » : épines (Cajal., 1888) (figure 22A). Mais ce n'est qu'à la fin des années 1950, que la microscopie électronique révéla la structure des épines dendritiques et lia les synapses aux épines (Gray, 1959).

L'épine dendritique, comme son nom l'indique, est une protubérance émise par la dendrite. Elle constitue la partie postsynaptique formée d'une tête, d'un cou, et d'une base en forme de V qui la relie au tronc dendritique (figure 22C). Elle contient entre autres les récepteurs aux neurotransmetteurs, et une structure protéique dense aux électrons, la densité post synaptique (PSD). La partie présynaptique axonale contient les vésicules chargées de neurotransmetteurs. Ces deux structures sont séparées par une fente synaptique de 10 à 20 nm de large. L'ensemble constitue la synapse axospineuse qui a une fonction excitatrice.

Dans le système nerveux central adulte, la majorité des synapses excitatrices sont portées par les épines dendritiques, et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. L'arrivée de potentiels d'action dans la terminaison axonale y provoque l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage. L'élévation de la concentration de calcium entraîne la fusion des vésicules présynaptiques avec la membrane, libérant ainsi du glutamate dans la fente synaptique qui se fixe sur ses récepteurs ancrés dans la membrane postsynaptique. Plusieurs types de récepteurs au glutamate coexistent : les récepteurs ionotropiques, différenciés par leurs ligands pharmacologiques (AMPA ( $\alpha$ -amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-acide isoxazolepropionique), NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou kaïnate), et les récepteurs métabotropiques (mGluR, metabotropic glutamate receptors).



**Figure 22: L'épine dendritique.**

A. Dessin de Ramón y Cajal montrant les épines dendritiques d'une cellule Purkinje de poule, colorée par la méthode de Golgi (Cajal., 1888);

B. Dendrite et épines dendritiques. D'après (Garcia-Lopez et al., 2007).

C. Morphologie d'une synapse sur une épine d'une dendrite du stratum radiatum (hippocampe de rat). Noter la densité postsynaptique compacte (étoile). Échelle 200 nm. D'après (Rostaing et al., 2006).

La densité post-synaptique (PSD, post-synaptic density) est une structure sous-membranaire présente au bout des épines dendritiques, et formant une sorte de plateforme d'amarrage moléculaire. Elle ancre les récepteurs glutamatergiques de manière directe ou indirecte, contient de nombreuses protéines de signalisation comme la Calmoduline kinase dépendante du calcium (CamKII), et les Protéines Kinase A et C. Elle participe au maintien de la synapse (Kim et al., 2006a), notamment par son interaction avec des protéines d'adhérence trans-synaptique comme les neuroligines (ligand des neurexines) et les NGLs (netrines G ligands) via la protéine PSD95. La PSD est ancrée aux filaments d'actine qui sont particulièrement enrichis dans les épines dendritiques (Blomberg et al., 1977; Matus et al.,

1982). Ces derniers forment un réseau complexe qui confère à l'épine sa stabilité structurale et sa dynamique morphologique (Fifkova and Delay, 1982; Fischer et al., 1998).

Les épines dendritiques possèdent aussi des organelles comme le réticulum endoplasmique lisse (SER, smooth endoplasmic reticulum) qui est en continuité avec celui de la dendrite et assure le stockage du calcium (figure 23) (Spacek and Harris, 1997).

Des endosomes de recyclage (RE, recycling endosomes) permettent le retour de récepteurs internalisés à la surface (Cooney et al., 2002).

Des polyribosomes (PR) qui sont des complexes d'ARN messagers et de ribosomes, présents à la base des épines (Steward and Levy, 1982), assurent une synthèse protéique locale.

Enfin, les mitochondries, abondantes dans les troncs dendritiques, sont présentes dans les grosses épines dendritiques de l'aire CA3 de l'hippocampe (Chicurel and Harris, 1992) et peuvent entrer dans l'épine dendritique suite à une activité synaptique (Li et al., 2004b). Elles assurent l'apport d'ATP nécessaire à la transduction du signal dans l'épine, et peuvent aussi participer à la modulation du signal en tamponnant le calcium intracellulaire.

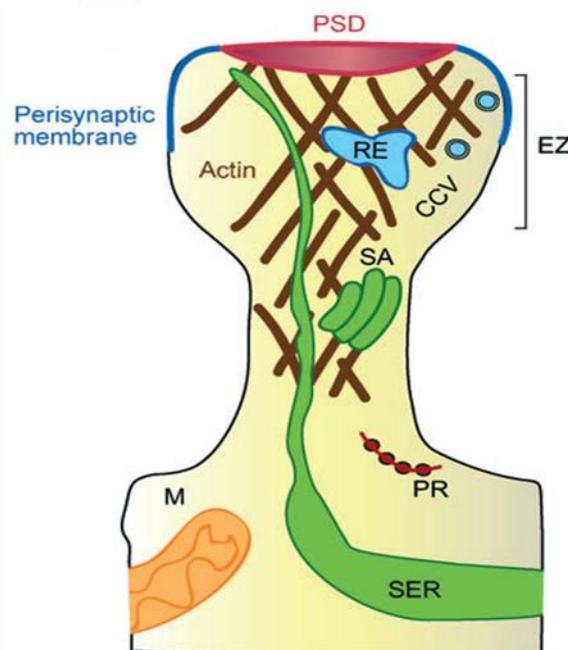


Figure 23: Représentation schématique d'une épine dendritique mature de type champignon et de différentes structures présentes à l'intérieur (Sheng and Hoogenraad, 2007)..

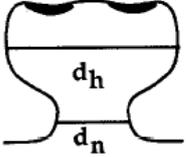
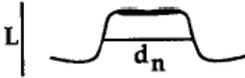
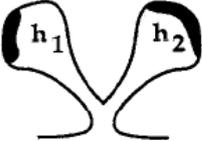
Abréviations : SER : smooth endoplasmic reticulum, SA : spine apparatus, RE : recycling endosomes, PR : polyribosomes, M : mitochondria, lignes brunes: cytosquelette d'actine, EZ : endocytic zone, CCV : clathrin-coated vesicles.

Il y a une corrélation étroite entre la taille de la tête de l'épine et la taille de la PSD ; ainsi qu'entre la taille de la PSD, le nombre de récepteurs postsynaptiques et celui des vésicules présynaptiques (Harris and Stevens, 1989; Nusser et al., 1998; Schikorski and Stevens, 1999). Les paramètres morphologiques et fonctionnels sont donc intimement liés. Par ailleurs, le diamètre du cou joue un rôle primordial dans la diffusion des signaux biochimiques et électriques entre la tête de l'épine et le tronc dendritique. Par exemple, la compartimentalisation du calcium dans la tête de l'épine dépend des dimensions du cou. Les épines dont le cou est étroit et long séquestrent plus de calcium dans leur tête que celles dont le cou est évasé et court (Noguchi et al., 2005).

Les épines dendritiques modèlent donc la transmission électrique du message nerveux. Elles sont actuellement considérées comme de petits compartiments semi-isolés électriquement et biochimiquement. Elles peuvent ainsi permettre la transmission fidèle de nombreux signaux excitateurs simultanés, tout en restreignant les changements biochimiques spécifiquement à certaines synapses.

Les épines d'un même neurone varient dans leurs tailles et dans leurs formes et peuvent être classées en fonction de leur morphologie :

- Les épines fines (Thin spines) ont une toute petite tête et un cou allongé. La longueur de l'épine est donc largement supérieure au diamètre du cou.
- Les épines en forme de champignon (mushroom spines) ont une tête large dont le diamètre est largement supérieur à celui du cou.
- Les épines dites « trapues » (stubby spines) ont le diamètre de leur tête approximativement égal à la longueur de l'épine.
- Enfin les épines possédant plusieurs têtes sont dites branchées : « branched spines » (Harris et al., 1992) (Figure 24).

Category	Shape	Criteria
Thin		$d_n \lll L$ $d_n \leq d_h$
Mushroom		$d_n \lll d_h$
Stubby		$d_n \cong L$
Branched		> 1 head

**Figure 24: Classification morphologique des différents types d'épines dendritiques.**

$L$ , longueur de l'épine;  $d_n$ , diamètre du cou de l'épine;  $d_h$ , diamètre de la tête de l'épine;  $h$  = tête. D'après (Harris et al., 1992).

Cette classification arbitraire des épines dendritiques s'applique en fait à un continuum, et sous-estime l'hétérogénéité de ces morphologies. De plus, les épines dendritiques sont des structures remarquablement dynamiques qui peuvent changer leurs tailles et leurs propriétés électriques (Parnass et al., 2000).

### 3.1.2. Plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme.

Le terme de « plasticité synaptique » désigne la capacité de nombreuses synapses (en particulier excitatrices) à modifier leur efficacité de transmission, notamment en fonction de leur propre activité. Selon les formes de plasticité, l'état modifié peut durer quelques secondes ou beaucoup plus longtemps (jusqu'à des semaines au moins). On considère aujourd'hui que les modifications à long terme de l'efficacité synaptique constituent un mécanisme fondamental de la physiologie (mémoire) et de la pathophysiologie (addictions, etc), et c'est à ces modifications persistantes que nous nous intéresserons ici.

En 1973, Bliss et Lømo découvrirent qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe pouvait augmenter la force de transmission synaptique du gyrus denté vers la région CA3, et que cette modification pouvait durer plusieurs heures. Ils nommèrent ce phénomène : potentialisation à long terme ou LTP (Long Term Potentiation). A contrario, des stimulations à basses fréquences induisent un affaiblissement de l'efficacité de la transmission synaptique, nommé dépression à long terme (LTD) (Dudek and Bear, 1992).

Au niveau moléculaire, la LTP comme la LTD requiert l'activation des récepteurs NMDA (Dudek and Bear, 1992). Cette dernière provoque une cascade d'événements multiples qui aboutissent entre autres à une modification de l'efficacité de libération du glutamate dans la fente synaptique (Burgoyne and Barclay, 2002), de la quantité de récepteurs présents à la surface de la partie postsynaptique (Hanley, 2010), et au changement de leur propriété de transduction du signal.

La plasticité synaptique module donc l'efficacité de la transmission des synapses en fonction des signaux qu'elles ont traités. Elle constitue par conséquent un substrat pour l'établissement et le stockage de l'information en fonction de l'expérience. Elle est aujourd'hui considérée comme une base moléculaire de l'apprentissage et de la mémoire (Whitlock et al., 2006).

### ***3.1.3. LTP/LTD et morphologie des épines dendritiques***

Ces modifications fonctionnelles sont aussi accompagnées de changements morphologiques. La LTP est corrélée à l'élargissement des épines dendritiques, l'apparition de nouvelles épines et l'augmentation de leur motilité (Dunaevsky et al., 1999; Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Toni et al., 1999). La LTD pour sa part induit le rétrécissement des épines, une diminution de leur motilité et finalement leur disparition (Dunaevsky et al., 1999; Nagerl et al., 2004; Wallace and Bear, 2004; Zhou et al., 2004).

L'élargissement des grosses épines est transitoire alors qu'il est stable pour les petites (Matsuzaki et al., 2004), qui seraient le site préférentiel d'induction de la LTP. Les grosses épines représenteraient donc la trace physique d'une mémoire à long terme (Kasai et al., 2003; Bourne and Harris, 2007).

### **3.1.4. Formation et maintien des épines dendritiques : Filopodes précurseurs développementaux des épines dendritiques**

Les épines dendritiques apparaissent très tôt pendant le développement, peu après l'extension des dendrites. Des contacts synaptiques sont rapidement établis entre les épines et les axones présynaptiques, suggérant que les processus de la spinogénèse sont intimement liés aux processus de mise en place des contacts entre neurones et l'établissement des circuits neuronaux.

En 1996, Ziv et Smith émettent l'hypothèse que les filopodes seraient les précurseurs développementaux des épines dendritiques (Ziv and Smith, 1996). A la différence des épines, les filopodes qui sont des structures longues ( $> 3\mu\text{m}$ ), fines ( $0,1-0,3\ \mu\text{m}$ ), composées principalement d'actine filamenteuse, n'ont pas de tête ni de PSD. Ils explorent l'environnement afin d'initier des contacts entre les neurones. Les filopodes sont au moins aussi nombreux que les épines formées sur les dendrites, et leur disparition coïncide avec l'apparition des épines dendritiques. Enfin, ils permettent la mise en place de synapses axo-dendritiques fonctionnelles.

Cependant, les filopodes sont émis par les neurones épineux comme par les neurones non-épineux, suggérant un rôle fondamental dans le développement qui ne se restreint pas à la mise en place des épines dendritiques. Il existe en réalité deux types de filopodes. L'un émergeant à l'extrémité terminale de la dendrite en croissance, au niveau du cône de croissance, qui laisse ensuite place à une branche dendritique stable. L'autre type pousse latéralement à la dendrite en croissance et se transforme en épine dendritique (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Portera-Cailliau et al., 2003). La drebrine est un partenaire de l'actine qui recrute PSD-95 dans les filopodes, ce qui initie leur évolution en synapses matures (Takahashi et al., 2003). En effet, les rassemblements locaux de PSD-95 du côté postsynaptique et de la synaptophysine (protéine des vésicules synaptiques) du côté présynaptique, sont corrélés spatialement et temporellement avec la morphogénèse des épines (Okabe et al., 2001; Prange and Murphy, 2001).

Les filopodes sont des structures extrêmement dynamiques, en particulier au cours du développement où des milliers de connexions synaptiques doivent être établies

rapidement (Dailey and Smith, 1996; Zuo et al., 2005a; Zuo et al., 2005b). Les filopodes s'allongent et se rétractent en utilisant les mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine (Hotulainen et al., 2009). Mais tous les contacts formés par les filopodes ne sont pas transformés en synapses. Des études d'imagerie *in vivo* de la jeune souris ou de tranches d'hippocampe, suggèrent que seulement 10 à 20 % des filopodes seront transformés en épines et parmi ces épines un grand nombre disparaîtra dans les jours suivants (Zuo et al., 2005a; De Roo et al., 2008).

La formation et le maintien des épines dendritiques sont intimement liées à l'expérience, c'est-à-dire aux stimulations sensori-motrices. Par exemple chez le rat, la privation sensorielle depuis la naissance et jusqu'à l'adolescence réduit le nombre de synapses, alors qu'un environnement riche pendant la même période induit une augmentation de la complexité dendritique et du nombre de synapses dans différentes régions du cerveau (Valverde, 1967, 1971; Greenough et al., 1973; Fiala et al., 1978; Knott et al., 2002).

### **3.2. Bases moléculaires de la morphologie des épines dendritiques.**

#### **3.2.1. L'actine.**

L'actine est particulièrement enrichie dans les épines dendritiques sous sa forme filamenteuse (Matus et al., 1982) (figure 25A). Elle joue un rôle primordial pour les épines, dans leur génèse et leur plasticité morphologique au niveau de leur forme, leur nombre, et leur motilité (Halpain, 2000; Matus et al., 2000). En outre, l'Actine stabilise les protéines postsynaptiques... (Fischer et al., 1998; Kuriu et al., 2006; Renner et al., 2009).

L'actine est présente partout dans l'épine avec une organisation différente en fonction des compartiments. Au niveau du cou elle se présente en longs filaments branchés et assez libres (Figure 25B) (Korobova and Svitkina, 2010) ; alors que dans tête, elle forme un réseau dense de filaments court connectés entre eux et avec la PSD.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les filopodes sont les précurseurs développementaux des épines dendritiques (Ziv and Smith, 1996). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation de ces structures sur les dendrites sont encore inconnus. Néanmoins, ces filopodes émergent la plupart du temps à partir de « patches »

d'actine branchée présents sur le tronc dendritique ou de petits lamellipodes (Andersen et al., 2005; Korobova and Svitkina, 2010). Le modèle actuel propose que cette initiation puisse se faire aussi bien au hasard que de manière contrôlée. Par exemple, elle est influencée par la libération de glutamate par des éléments présynaptiques (Tashiro and Yuste, 2003; Andersen et al., 2005). L'initiation et l'élongation de ces filopodes sont des mécanismes complexes impliquant toute une batterie de protéines influençant la polymérisation de l'actine et la structure de son réseau (EnaVASP, Arp2/3, mDia2, MyosinX, Septin7, IRSp53....).

Une fois le contact établi entre l'axone et le filopode, la motilité de ce dernier diminue, et l'épine est stabilisée (Arikkath and Reichardt, 2008; Yoshihara et al., 2009). Le complexe Arp2/3 est au centre des processus qui régulent ensuite la croissance de la tête de l'épine (Soderling et al., 2007; Wegner et al., 2008; Hotulainen et al., 2009).

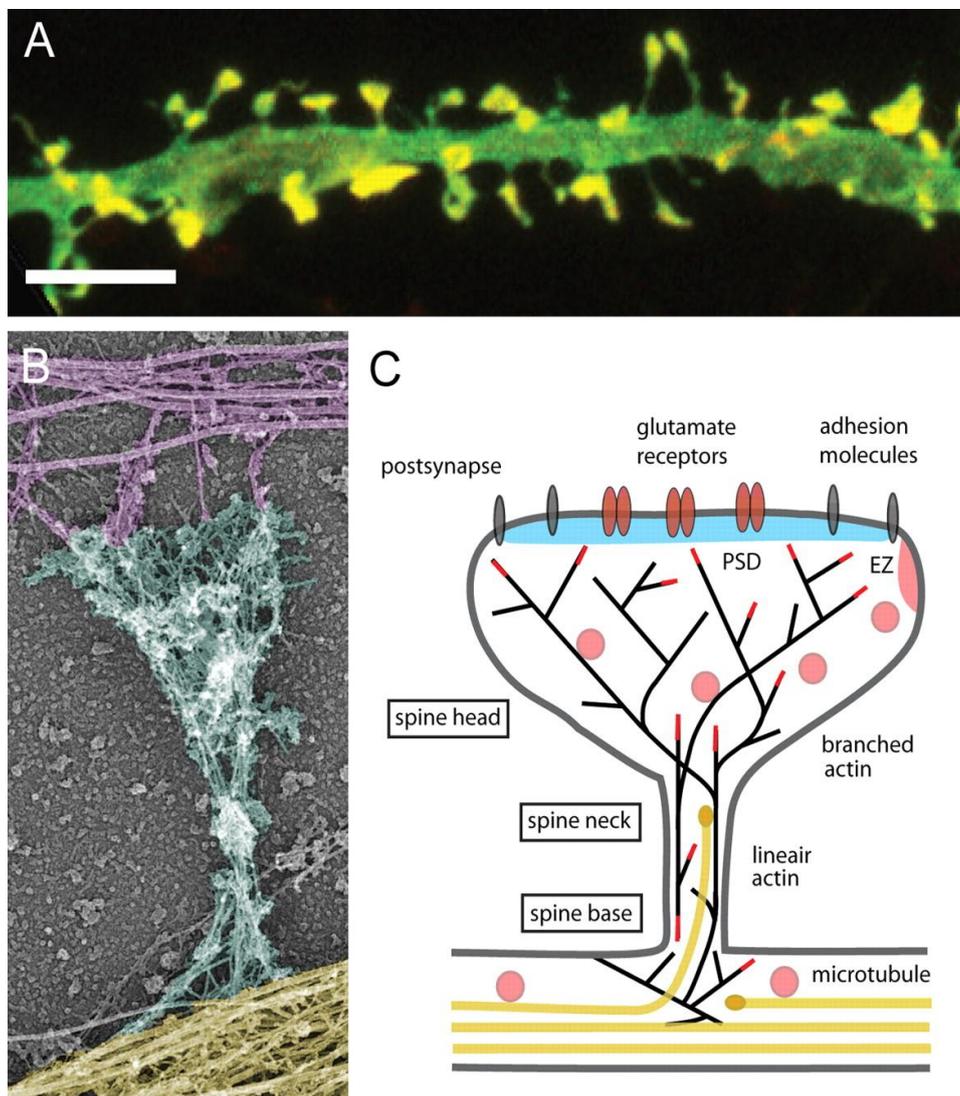


Figure 25 : L'actine dans les épines dendritiques.

A : Concentration de l'actine filamenteuse dans les épines dendritiques de neurones d'hippocampe en culture. La GFP remplit la dendrite et ses épines, l'actine filamenteuse à été marquée en rouge, le jaune matérialise la superposition de ces deux couleurs.

B : Organisation de l'actine et des microtubules dans une épine de type *mushroom* de neurones d'hippocampe en culture visualisés par microscopie électronique. Le cytosquelette axonal est coloré en violet, celui de l'épine en bleu, et celui du tronc dendritique en jaune. La tête contient un réseau dense de courts filaments d'actine alors que ceux de l'épine sont plus longs connectés de manière plus lâche, arrangés longitudinalement et parfois branchés. La base de l'épine contient aussi des filaments branchés qui semblent directement connectés aux microtubules du tronc dendritique (Korobova and Svitkina, 2010).

C : Schéma de l'organisation du cytosquelette dans une épine dendritique de type *mushroom*. La densité postsynaptique (PSD en bleu) ancre les molécules d'adhésion (gris) et les récepteurs au glutamate au bout de l'épine. Elle est assise sur un réseau dense d'actine (noir) qui se prolonge tout au long de l'épine. Il est large à la base de l'épine, puis se resserre dans le cou, puis présente une arborisation intense au niveau de la tête. Le tronc dendritique contient un réseau microtubulaire stable, mais une petite proportion de microtubules est très dynamique et peut parfois pénétrer dans les épines matures. Les endosomes (rose) peuvent être formés dans l'épine au niveau de la zone d'endocytose (EZ) au bord de la PSD. Les endosomes de recyclage, résidant dans le tronc dendritique, constituent un pool de réserve d'éléments de la surface membranaire (protéines, lipides), pouvant être délivrés directement au niveau de l'épine.

### **3.2.2. Les endosomes.**

Les endosomes présents dans les épines dendritiques, peuvent fusionner avec la membrane plasmique pour y délivrer localement des protéines de surface nécessaires à leur fonction. Par exemple, suite à l'induction d'une LTP, les endosomes de recyclage résidant dans le tronc dendritique fusionnent avec la membrane plasmique au niveau de ce tronc et/ou sont recrutés dans l'épine afin de délivrer les récepteurs AMPA à la surface (Brown et al., 2007; Wang et al., 2008; Opazo and Choquet, 2010). Ce mécanisme est nécessaire à l'établissement de la LTP (Wang et al., 2008). Ces endosomes constituent donc un pool de réserve local de protéines de surface rapidement mobilisable (Park et al., 2004).

La fusion des endosomes fournit aussi de la membrane nécessaire à la formation et l'élargissement des épines dendritiques (Park et al., 2006).

### **3.2.3. Les protéines de la densité postsynaptique.**

La protéine majoritaire de la PSD, PSD95, en est l'élément structurant de base. Elle sert aussi de point d'ancrage pour le recrutement de récepteurs et de complexes de

signalisation. PSD-95 est directement impliquée dans la plasticité synaptique (Migaud et al., 1998), elle permet l'insertion, la séquestration des récepteurs AMPA dans les synapses (Ehrlich and Malinow, 2004; Bats et al., 2007) et l'élargissement des épines suite à une LTP (Ehrlich et al., 2007). De plus, la surexpression de PSD-95 provoque l'augmentation de la taille et du nombre d'épines dendritiques (El-Husseini et al., 2000). PSD-95 intervient aussi dans la maturation et la stabilisation des synapses (De Roo et al., 2008).

La protéine Shank, via sa capacité à recruter Homer (protéine qui interagit avec les récepteurs métabotropiques du glutamate) à la PSD, favorise la maturation des épines dendritiques et l'élargissement des têtes des épines (Sala et al., 2001). L'activité synaptique induit l'expression d'un variant d'épissage plus court de Homer (Homer1a) qui semble inhiber l'action des variants longs (Homerb et c) en interférant avec la liaison de ce dernier à SHANK (Sala et al., 2003). L'expression de Homer1a impacte fortement la morphologie et le fonctionnement des épines dendritique. La liaison entre les variants longs d'Homer et SHANK paraît donc indispensable au maintien de la structure des épines et au fonctionnement synaptique.

#### **3.2.4. Molécules d'adhérence.**

Le maintien des épines nouvellement formées et de leurs synapses nécessite de conserver la liaison des structures présynaptiques et postsynaptiques, qui est assurée par les molécules d'adhérence. Par exemple, la N-cadhérine via son interaction avec elle-même (Bozdagi et al., 2000) et avec la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA (Saglietti et al., 2007). La molécule d'adhérence nétrine-G permet aussi le maintien des synapses via son interaction avec PSD95 (Kim et al., 2006a).

#### **3.2.5. Récepteurs aux neurotransmetteurs**

La présence de récepteurs aux neurotransmetteurs à la surface de la membrane postsynaptique est nécessaire au maintien des épines dendritiques. En effet, le blocage pharmacologique du récepteur NMDA augmente la motilité des épines ; l'inhibition de l'expression de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA, par la technique de l'ARN interférant, augmente la motilité des épines et induit leur disparition (Alvarez et al., 2007). Des tranches d'hippocampe de souris invalidées pour le gène de NR1 présentent une diminution du

nombre d'épines (Ultanir et al., 2007) qui ont une taille moyenne plus grande, suggérant un mécanisme compensatoire.

La surexpression de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA dans des neurones d'hippocampe en culture, induit une augmentation de la taille et du nombre d'épines; et induit même la formation d'épines dans des interneurons GABAergiques de l'hippocampe d'ordinaire non-épineux (Passafaro et al., 2003).

### **3.2.6. Lipides.**

La composition lipidique de la membrane est importante pour le maintien des synapses et la morphologie des épines dendritiques. Les dendrites sont riches en radeaux lipidiques ; il s'agit de microdomaines de cholestérol et de sphingolipides. Dans les cellules, les radeaux lipidiques sont impliqués dans le trafic membranaire, la formation de complexes protéiques de signalisation et la régulation du cytosquelette d'actine. L'équipe d'Hering a montré que la déplétion chimique du cholestérol et des sphingolipides dans des cultures de neurones d'hippocampe de rat, provoque la diminution du nombre d'épines dendritiques et l'augmentation de la taille des épines restantes (Hering et al., 2003). Une déplétion sévère de cholestérol et de sphingolipides conduit même à la mort neuronale. L'équipe a également observé une augmentation concomitante de l'internalisation des récepteurs AMPA. Les radeaux lipidiques assurent la stabilité à la surface membranaire des récepteurs AMPA et ainsi le maintien des épines dendritiques.

### **3.2.7. Rôle des mitochondries**

De par leur taille, leur forme et leur activité électrique, les neurones sont de gros consommateurs d'énergie, dont la production est assurée par les mitochondries. Elles ne sont toutefois pas uniquement des centrales de production d'ATP, mais jouent également un rôle important dans l'homéostasie calcique et sont des composants centraux de la voie intrinsèque de l'apoptose. Elles sont présentes dans les cellules sous forme de tubes plus ou moins longs qui forment un réseau. Les mitochondries sont des organelles extrêmement dynamiques qui sont en permanence remodelées par des processus de fission et de fusion. Cette dynamique n'est pas un épiphénomène. Elle joue un rôle primordial dans l'élimination de mitochondries endommagées et l'induction de l'apoptose (Karbowski, 2010; Montessuit

et al., 2010) ; son altération perturbe le métabolisme énergétique (Bo et al., 2010), favorise la production de radicaux libres et l'altération de l'ADN mitochondrial (Liesa et al., 2009).

Chez les mammifères, la protéine centrale de la fission mitochondriale est une GTPase de la famille de la Dynamine appelée DRP1 (Dynamin related protein 1). Elle s'assemble en un multimère circulaire (ou en forme de spirale) qui s'enroule autour de la mitochondrie et « l'étrangle » jusqu'à la séparation (Ingerman et al., 2005; Heymann and Hinshaw, 2009; Montessuit et al., 2010). La mitochondrie est une organelle à deux membranes. Les mécanismes qui assurent le maintien de l'indépendance des deux membranes pendant la fission ne sont pas encore connus.

La fusion des membranes externes des mitochondries est assurée par deux GTPases, les mitofusines (MFN1 et MFN2), qui sont ancrées dans ces membranes. La fusion des membranes internes est assurée par une autre GTPase proche de la dynamine, OPA1 (Optic atrophy 1).

Dans les neurones, cette dynamique mitochondriale est influencée par l'activité synaptique. Son altération provoque la perte des épines dendritiques et des synapses (Li et al., 2004a). De plus, des perturbations de cet équilibre semblent être impliquées dans la plupart des maladies neurodégénératives (Su et al.; Li et al., 2004a; Chen and Chan, 2009). Des mutations dans MFN2 et OPA1 provoquent des neuropathies comme la maladie de Charcot. L'amyloïde  $\beta$  ou des mutants de la Huntingtine provoquent une fragmentation des mitochondries qui précède la mort des neurones. PINK1 et PARKIN, deux protéines impliquées dans la maladie de Parkinson, régulent la morphologie des mitochondries.

### ***3.3. Pathologies des épines dendritiques.***

La morphologie et le nombre des épines dendritiques étant intimement liés à la fonction neuronale, une altération de la structure de l'épine ou le dérèglement des mécanismes de formation, d'élimination ou de plasticité des épines, peuvent affecter les circuits neuronaux et induire toutes sortes de déficits cognitifs. En effet, de nombreuses maladies neurologiques sont associées à des altérations de la morphologie ou de la densité des épines. Des analyses post-mortem en microscopie électronique de cerveaux de patients

atteints de différentes maladies neurodégénératives, montrent une perte et une modification de la taille des épines dendritiques dans différentes régions du cerveau (tableau 4).

Certaines de ces maladies telles que le syndrome de Down et le syndrome lié au X fragile, apparaissent durant le développement, lors de la pousse neuritique et de la mise en place massive des épines (Comery et al., 1997; Rachidi and Lopes, 2008).

Les autres comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou les Démences Frontales, apparaissent à l'âge adulte bien après ces périodes critiques. Dans la maladie d'Alzheimer (MA), des études immunocytochimiques post mortem ont permis d'associer les dysfonctionnements cognitifs à la perte des synapses plutôt qu'à la mort neuronale (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Une des caractéristiques anatomopathologiques de la MA, est la présence de plaques formées par l'agrégation fibrillaire de peptide amyloïde bêta (A $\beta$ ). Ce peptide sous forme soluble provoque chez des neurones d'hippocampe de rat, la perte des épines dendritiques et une augmentation de la longueur des épines restantes (Lacor et al., 2007).

**Tableau 4: Changements pathologiques des épines dendritiques dans le système nerveux chez l'homme (liste non exhaustive).**

Maladies	Changements de l'épine	Région du cerveau touchée	Références
Syndrome du X fragile	épines sont plus longues et plus tortueuses	néocortex	(Hinton et al., 1991)
	augmentation de la densité	néocortex	(Irwin et al., 2001)
Syndrome de Down	diminution de la densité	hippocampe	(Ferrer and Gullotta, 1990)
		néocortex occipital	(Takashima et al., 1981)
Niemman-Pick	diminution de la densité	néocortex temporal et frontal	(Masliah et al., 1989)
Maladie des Motoneurones	diminution de la densité	néocortex frontal	(Ferrer et al., 1991)
Huntington	augmentation de la densité et de la taille	striatum	(Ferrante et al., 1991)

Alzheimer	diminution de la densité	néocortex	(Gertz et al., 1987)
		hippocampe	(Scheibel, 1979; De Ruiter and Uylings, 1987; El Hachimi and Foncin, 1990; Ferrer and Gullotta, 1990; Einstein et al., 1994)
	augmentation de la taille	néocortex	(Baloyannis et al., 1992)
	diminution de la taille	néocortex	(Scheff et al., 1990; Scheff and Price, 1993)
		hippocampe	(Einstein et al., 1994)
Démence Frontale	diminution de la densité	néocortex frontal	(Catala et al., 1988; Ferrer et al., 1991; Baloyannis et al., 2001)
Parkinson	diminution de la densité	locus coeruleus	(Patt and Gerhard, 1993)
		substance noire	(Patt et al., 1991)
Creutzfeldt-Jacob	augmentation de la taille	néocortex temporal	(Baloyannis et al., 1995)

La structure et la dynamique des épines dendritiques tiennent donc une place centrale dans la physiologie neuronale. Leurs altérations semblent être une étape commune à de nombreuses maladies neurodégénératives.





# Matériel et Méthodes

Concernant les expériences des articles 1 et 2, merci de vous référer aux paragraphes Matériel et Méthodes des articles.

## 1. Plasmides et anticorps

Mito-CFP, et HA-FIS nous ont été cordialement donnés par le laboratoire de Jean Claude Martinou.

### 1.1. Anticorps

-Anticorps primaires

Nom	Types	Fabricant et référence
HA	Monoclonal	Cell Signaling 2367
HA	Polyclonal	Sigma H6908
CHMP2B	Polyclonal	AbCam ab33174
CHMP2B	Polyclonal	Covalab /
OPA1	Monoclonal	Bd transduction (612606)
RAB7	Polyclonal	Santa Cruz (H-50)
CytochromeC	Polyclonal	Santa Cruz (H-104)

-Anticorps secondaires.

Nom	Types	Fabricant
Mouse-HRP	Polyclonal	Jackson Immunoresearch 115-035-166
Rabbit-HRP	Polyclonal	Jackson Immunoresearch 111-035-044

## 2. Biologie moléculaire

### 2.1. Mise en évidence des ARNm issus de l'épissage alternatif des ARNm de CHMP3 et CHMP2B

Les ARN totaux d'un cerveau de rat adulte sont extraits en utilisant Tri Reagent (Euromedex). Deux microgrammes d'ARN totaux sont rétro-transcrits par la M-MLV reverse transcriptase et des hexamères aléatoires. L'épissage alternatif des ARNs de CHMP2B et CHMP3 sont mis en évidence par la révélation de la présence de la jonction EXON1-EXON3 par PCR au moyen de la polymérase Econotaq (Lucigen Corp).

Nom des amorces	Séquence des amorces (orientation 5'-3')
Pr-CHMP3-Iso2	CCCAAAGAAGACTGGATATCCCAAAG
CHMP3 exon4 anti-sens	TGCATTGCCTTCATCACTTC
RAT-CHMP2B Exon1 sens	TCCCTCTCAAGAAGAAGAC
RAT-CHMP2B Exon3 anti-sens	GTTTGTAGTGTCTTCTGTGG

### 2.2. Clonages.

Les clonages ont été réalisés au moyen du système Gateway (Invitrogen), les fragments d'ADNc désirés sont amplifiés par PCR à partir d'ADNc de hsCHMP2B ou HsCHMP3 ; les amorces utilisées contiennent les cassettes de recombinaison Attb1 et Attb2. Ces fragments sont insérés par recombinaison dans le plasmide pDONR221 puis fusionnés encore par recombinaison à l'ADNc codant pour la mcherry, par leur transfert dans le plasmide pBSI30mcherry. CHMP2B $\beta$ MM sans fusion est cloné de la même manière en utilisant une amorce anti-sens qui conserve le codon stop qui termine la séquence codant pour CHMP2B

Construction des ADNc codant pour One-Strep-CHMP2B, One-Strep-CHMP2B<sup>intron5</sup>, One-Strep-CHMP2B<sup>CT177</sup> dans un vecteur bactérien.

Pour pouvoir facilement cloner plusieurs constructions dans le plasmide prIBA-102 qui contient le peptide One-Strep, une cassette Gateway a été clonée en aval de la séquence codant pour le peptide de manière à respecter le cadre de lecture (prIBA-102GW). pDONR221-CHMP2B, pDONR221-CHMP2B<sup>intron5</sup> et pDONR221 CHMP2B<sup>CT177</sup> (les acides aminé 177 à 213 de CHMP2B) sont générés comme décrit précédemment. Les différentes constructions de CHMP2B sont alors transférées dans prIBA-102GW par recombinaison.

Nom des amorces	Séquence des amorces (orientation 5'-3')
AttB1- CHMP2B $\beta$ MM sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCAAGATTGGTAATAAG
AttB1- CHMP2B $\beta$ HS sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAATTAGAAATTAAGAAAATG
CHMP2B-AttB2 reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTg ATC TAC TCCT AAAGCCTTGA G

### 3. Microscopie électronique

Une souris a été fixée par perfusion avec 50 ml de PFA 2% et glutaraldéhyde 0.2% dans un tampon phosphate 0.1 M pH7.2. L'hippocampe est prélevé délicatement et la région CA1 de l'hippocampe médian est disséquée et fixée pendant 1 nuit dans 2% de PFA dans un tampon phosphate 0.1 M. L'échantillon est ensuite infusé dans du sucrose pendant 2 heures avant d'être congelé dans l'azote liquide. Des sections ultrafines sont réalisées à l'aide d'un ultra-cryo-microtome et les coupes prélevées dans une goutte de méthylcellulose/sucrose. Pour l'immuno-marquage, les grilles contenant les coupes sont déposées sur des gouttes de PBS/Glycine 50mM puis sur des gouttes de PBS / 10 % BSA afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées l'anticorps primaire dirigé contre CHMP2B (AbCam) pendant 1 heure puis, après plusieurs lavages en PBS / 1 % BSA, mis en présence de protéine A-Gold 15 nm (Utrecht University, The Nederland) pendant 1 heure. Les étapes de saturation et d'incubation avec les anticorps sont répétées une seconde fois avec notre anticorps anti-CHMP2B et une protéine A-Gold 10 nm. Les coupes sont ensuite enrobées dans du méthylcellulose 2% / Acétate d'Uranyle 5% dans la proportion 8/2. L'échantillon est

finaleme nt observé au microscope électronique à transmission (JEOL 1200EX) et l'acquisition des images se fait par l'intermédiaire de plans films photographiques (Kodak 4489).

## **4. Culture cellulaire**

### **4.1. Lignés**

Les cellules HeLa sont ensemencées dans du milieu DMEM low glucose (Gibco), supplémenté par 2 mM de L-glutamine (Gibco), 10% de sérum de veau foetal (Gibco) et 10 U.mL<sup>-1</sup> Pénicilline/Streptomycine (Gibco). Les cellules Hek sont cultivées dans du milieu DMEM high Glucose, et complémenté de la même façon.

### **4.2. Culture primaire de neurones d'hippocampe de rat**

#### Préparation

Pour que la poly-D-lysine adhère sur les lamelles de verre (Marienfeld, n°0111540, diamètre 14 mm), celles-ci doivent tout d'abord subir un traitement de 72 heures à l'acide nitrique 70 % (Sigma, n°438073) pour devenir hydrophiles. Elles sont abondamment rincées et conservées dans de l'eau distillée stérile. Les lamelles sont incubées une nuit à 37°C avec de la poly-D-lysine 50 µg/mL (Sigma, n°P7280) dissoute dans du tampon borate (50 mM acide borique, 13 mM borax, pH 8,5). Le lendemain, les lamelles sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile et placées dans le milieu d'ensemencement, constitué de DMEM (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco).

#### Mise en culture

Les neurones d'hippocampe sont prélevés sur des embryons de rat OFA au 19ème jour de vie embryonnaire, conformément à la Directive n°86/609 du Conseil de la Communauté Européenne.

La femelle gestante est anesthésiée à l'isoflurane avant la décapitation. L'utérus contenant les embryons est prélevé par laparotomie, puis placé dans une boîte contenant du HBSS chaud (5 mM glucose, 10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 440 µM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 270 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 U.mL<sup>-1</sup> Pénicilline/Streptomycine, pH 7,4). Les embryons sont

transférés dans une nouvelle boîte avec du HBSS chaud, où ils sont décapités. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes. Par observation sous loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges soigneusement enlevées ; les hippocampes peuvent alors être prélevés. Ils sont placés au fur et à mesure dans du HBSS chaud. Après trois rinçages à l'HBSS chaud, les hippocampes sont traités avec 0,25% trypsine-EDTA (Gibco) supplémenté avec 15 mM HÉPÈS et 33 mM glucose pendant 15 min à 37°C. Ils sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud. Pendant 2 minutes à 37°C, la trypsine est ensuite stopper avec 2 mg/mL d'inhibiteur de trypsine (Sigma, n°T9003), auquel est ajouté 150 U/mL de DNase (10 µg/L ou, Sigma, n°D5025) afin de digérer l'ADN des cellules lysées pendant la dissection, et faciliter la dissociation mécanique. Les hippocampes sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud et triturés dans 1 mL de HBSS chaud, avec une pipette 1000 µL et un cône avec un filtre. Les neurones sont comptés sur lame de Malassez et semés à la densité de 12000 cellules par centimètre carré, sur les lamelles préalablement préparées. Le milieu d'ensemencement est constitué de DMEM (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco). Deux heures plus tard ce milieu est remplacé par le milieu de culture, constitué de Neurobasal (Gibco) supplémenté avec du B27 (Gibco) concentré 1 fois, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium, et 10 U/mL Pénicilline/Streptomycine. Quatre jours après la mise en culture, un antagoniste pyrimidique, la cytosine-bêta-D-arabinoose (AraC, Sigma, n°C6645) est ajouté au milieu (5µM) afin de stopper la division des cellules gliales présentes dans la culture de neurones. Tous les quatre jours, un quart de milieu de culture supplémenté d'AraC, est ajouté à la culture afin de fournir de nouveaux nutriments aux neurones en développement.

## **5. Transfection**

### **5.1. Transfection d'ADN dans les cellules Hela ou Hek**

La transfection est réalisée au moyen d'un polymère cationique, le JetPEI (Polyplus transfection), directement dans le milieu de culture.

Pour une boîte de 35mm contenant quatre lamelles sur lesquelles les cellules sont à moins de 40 % de confluence :

Dans un tube Eppendorf, 1µg d'ADN sont ajoutés à 100 µL de NaCl 150 mM. Dans un second tube Eppendorf 6 µL de JetPEI sont ajoutés à 100 µL de NaCl 150 mM. Les deux tubes sont

agités au vortex et incubés 5 minutes à température ambiante. Puis le mélange JetPEI / NaCl est ajouté au mélange ADN / NaCl. Le tube est agité au vortex et incubé 25 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu de culture, sur les cellules.

## **5.2. Transfection des neurones**

Le milieu de transfection est préparé à partir de MEM 10X (Gibco), supplémenté avec 15 mM HÉPÈS, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium. Le pH du milieu est ajusté à 7,35 avec de la soude.

Pour une boîte de 35mm contenant quatre lamelles sur lesquelles les neurones ont 10 jours de vie en culture (jour *in vitro*, JIV) :

Dans un tube Eppendorf, les ADN sont pré-mélangés puis ajoutés à 250 µL de milieu de transfection ; le tube est agité doucement et incubé 5 minutes à température ambiante. 1,5 µL de PlusReagent sont ajoutés au fond du tube contenant l'ADN ; le tube est agité doucement et incubé 5 minutes à température ambiante. 4 µL de lipofectamine LTX (Invitrogen, n°15338-100) sont ajoutés au fond du tube contenant l'ADN ; le tube est agité doucement et incubé 25 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu de culture des neurones est remplacé par 2 mL de milieu de transfection, et les neurones sont placés à 37°C sans CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture des neurones est conservé à 37°C.

Le mélange est ensuite ajouté directement sur les neurones en plongeant le cône dans le milieu de transfection ; les 250 µL sont répartis de manière équivalente sur les quatre lamelles. Après 1 heure à 37°C, le milieu de transfection est remplacé milieu de culture d'origine des neurones.

## **5.3. Transfection des ARN interférants.**

Les cellules Hela sont semées dans une plaque 6 puits (5.10<sup>4</sup> cellules par puits de 35mm) contenant deux lamelles par puits. Vingt-quatre heures plus tard, elles sont transfectées par 100nM de siRNA au moyen d'oligofectamine (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Les lamelles sont prélevées 72h après la transfection, fixées, puis traitées pour l'immunofluorescence. Les cellules restant au fond des puits sont lysées dans

du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Ce lysat est ensuite analysé par Western Blot pour vérifier l'extinction.

## **6. Immunocytofluorescence**

Les cellules sont fixées avec une solution fraîchement préparée contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA), (4 % de sucrose dans le cas des neurones) et du PBS à pH 7,4, pendant 20 minutes à température ambiante. La perméabilisation des cellules est réalisée avec une solution à 0,3 % Triton-X100 dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Les sites antigéniques sont saturés avec 5 % de sérum de chèvre pré-immun (Goat Pré Immun, GPI) dans du PBS, pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires sont incubés 1 heure à température ambiante dans le milieu de saturation. Après chaque incubation avec les anticorps, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS pendant 5 minutes, et une fois à l'eau avant d'être montées sur lames avec du Mowiol (Calbiochem).

## **7. Western blot et immunodetection**

Les cellules sont lysées dans un tampon lyse contenant RIPA et des inhibiteurs de protéases et phosphatases puis centrifugées 10 minutes à 13000g pour retirer les noyaux.

La concentration protéique de chaque échantillon est mesurée en triplicat avec un réactif de Bradford ou BCA afin de déposer sur gel la même quantité de chaque échantillon à analyser. Les protéines des lysats sont bouillies 5 minutes dans du tampon Laemmli (2% SDS, 140 mM  $\beta$ -Mercaptoéthanol) avant d'être séparées sur gel de polyacrylamide 8 % en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à 55 mA pendant 3h.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (polyvinyl-difluoridene) par électrotransfert en conditions semi-sèches. Un papier whatman est placé sur l'anode, imbibé d'un tampon contenant 30% d'éthanol et 30g/L de Tris. La membrane de PVDF est posée sur ce papier whatman et mouillée d'un tampon contenant 30% d'éthanol et 3g/L de Tris. Le gel est placé sur la membrane. Un second papier wattman, imbibé d'un tampon contenant 0,004% de SDS, 5,29 g/L d'acide caproïque et 3g/L de Tris, est posé sur le gel et est alors en contact avec la cathode. Le transfert dure 1h30 à 0,8 mA par  $\text{cm}^2$  de membrane.

Après le transfert, la membrane est rincée à l'eau distillée et incubée pendant 1 heure dans du TBS (Tris 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5) 0,05 % de Tween 20 et 5 % de lait (TBSTL). L'immunodétection est réalisée avec un anticorps primaire dans du TBSTL; puis par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du radis noir ou HRP (Horseradish Peroxydase, Jackson Immunoresearch) dans du TBSTL. La révélation est effectuée avec le kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

## **8. Fractionnements subcellulaires et approches biochimiques**

### **8.1. Purification de mitochondries de cerveaux de rat**

Les mitochondries de rats adultes ont été purifiées selon la méthode A décrite par Sims et Anderson (Sims and Anderson, 2008). Brièvement : un cerveau de rat Wistar adulte dont le cervelet et le tronc cérébral ont été préalablement retirés est lysé mécaniquement à 4°C au moyen d'un potter de (8 retours) dans un tampon d'isolation de mitochondries (MIB : 320mM sucrose, 1mM EDTA, tris 10mM pH 7,4, cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science); 10 ml par gramme de tissus) ; puis centrifugé 3 minutes à 1300 g. Le surnageant ainsi obtenu est le lysat de départ qui est ensuite centrifugé à 21000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot qui contient les mitochondries est resuspendu (10ml/gr) au moyen d'un potter dans du tampon MIB froid contenant 15% de Percoll (GE Healthcare). Le tout est déposé au sommet d'un gradient discontinu de Percoll (23%, 40%) et centrifugé à 30 700g pendant 5 minutes (Rotor Beckmann SW41 tubes 12ml). Les mitochondries sont récupérées à l'interface 23%- 40% au moyen d'une pipette 1ml. Elles sont reprises dans du MIB (au moins 4 fois le volume prélevé) et centrifugées à 16,700g pendant 10 min pour se débarrasser du percoll. Enfin elles sont à nouveau reprises dans 3ml de MIB et centrifugées à 6900g pendant 10 minutes et reprises dans 100 à 200µl de MIB. Cette dernière constitue la fraction mitochondriale. La quantité de protéines mitochondriales ainsi obtenues est estimée en utilisant le réactif de Bradford.

### **8.2. Séparation de la fraction mitochondriale sur gradient de sucrose.**

Un gradient continu de sucrose 1M-2M de 10 ml est coulé dans un tube Beckman SW41. La fraction mitochondriale est déposée en surface. Le gradient est centrifugé 1h à

100 000g des fractions de 1ml sont prélevées et diluées dans 8ml de MIB. Chaque fraction ainsi diluée est centrifugée à 100 000g 1 heure. Le culot ainsi obtenu est repris dans 40µl de tampon Laemmli et analysé en Western Blot.

### **8.3. Alourdissement des mitochondries par iodotétrazolium (INT)**

La fraction mitochondriale est reprise dans un tampon « d'alourdissement » (MIB + 60mM succinate, 0,1% BSA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). La préparation est séparée en deux, 1mM final de iodotétrazolium (INT) est rajouté à une moitié. Les deux fractions sont ensuite incubées 20 minutes à 37°C, puis chargées sur un gradient continu de sucrose 1M-2M.

### **8.4. Digestion des mitochondries par la protéinase K**

Vingt µg de protéines de différentes fractions sont incubées en présence de 50µg.ml<sup>-1</sup> de protéinase K seule ou avec 0,2% de Triton X100 détergent pendant 30 minutes à 4°C. L'activité de la protéinase K est bloquée par ajout de 5mM de phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) avec d'être repris dans du tampon Laemmli et analysé en Western Blot.

### **8.5. Perméabilisations de mitochondries purifiées par BAX et tBid recombinants**

Dix µg de protéines d'une fraction mitochondriale de cerveau de rat sont reprises dans du Mitochondrial (MIB) ou dans un tampon hypotonique (100mM KCl : K100). Elles sont incubées seules ou en présence de tBid (20mM) et BAX (100mM) recombinant pendant 20 minutes à 30°C puis centrifugés à 13000g 10 minutes.

Une autre fraction est perméabilisée par ajout de 0,2% de tritonX100. Les surnageants (S) et culots (C) sont repris dans du tampon Laemmli et analysé en Western Blot.

## **9. Mesure de la longueur des mitochondries**

Les neurones d'hippocampe de rats ont été triplement transfectés par : (1) le plasmide pSuper vide ou portant un ARN interférent dirigé contre CHMP2B (ShCHMP2B), (2) le plasmide pcDna3.1 vide ou portant une séquence codant pour un ARNm de CHMP2B

résistant à l'ARN interférant (CHMP2B ShR) et (3) Mito-CFP. Une série de plan en Z sont acquis au microscope à épifluorescence. Ces images sont traitées au moyen du logiciel Metamorph (Molecular Imaging). Ne sont gardés que les plans nets. Les intensités maximales de chaque pile sont projetées sur un plan. L'image obtenue est soumise à la transformation numérique dite du chapeau haut de forme (top hat) pour éliminer les variations lentes du signal et augmenter les contrastes afin de mieux isoler les mitochondries. Les objets sont ensuite identifiés par seuillage des intensités. Seuls les paramètres morphologiques des objets dont la longueur est supérieure à 0,8µm sont pris en considération.

## **10. Purification des interacteurs de CHMP2B**

### **10.1. Production de protéines recombinantes et production des colonnes Streptactines les contenant**

Des bactéries BL21(DE3)pLysS sont transformées par choc thermique avec pRBA-102GW-CHMP2B, pRBA-102GW-CHMP2B<sup>intron5</sup> ou pRBA-102GW-CHMP2B<sup>CT177</sup>. Les trois protéines recombinantes sont préparées en parallèle suivant la même procédure : une préculture de 5ml est lancée sur la nuit. Elle est versée le lendemain dans de LB ampicilline/ Chloramphénicol. Quand la culture atteint 0,6 Unités d'absorbance à 600nm, l'IPTG y est rajouté (Sigma, 1mM final). La culture est incubée 2 heures à température ambiante. Les bactéries sont alors culottées par une centrifugation à 15 000g pendant 15 minutes. Les bactéries sont reprises dans un tampon de lyse (TRIS 20mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM) puis lysées par un cycle de congélation décongélation et sonication. Les lysats de bactéries sont alors centrifugés 30 minutes à 15000g. Le surnageant (l'équivalent de 50 ml de culture) est chargé sur une colonne contenant 200µl de billes couplées à la Strep Tactin (IBA BioTAGnology) qui sont ensuite lavées 6 fois par 200µl de tampon W (IBA BioTAGnology).

### **10.2. Préparation de fraction cytosolique de lysats de cerveaux de rats**

Trois cerveaux de rats Wistar adultes sont repris dans 12,5 ml de tampon de lyse (Hepes 4mM, Sucrose 320mM). Ils sont lysés au moyen d'un potter puis centrifugés à 800g 15 minutes. Le surnageant est centrifugé à 13 000g 30 minutes. Ce surnageant est alors centrifugé à 100 000 g pendant 1 heure. On obtient ainsi une fraction cytosolique.

### **10.3. Purification**

Cette fraction cytosolique est divisée en trois fractions égales qui sont passées à travers les colonnes. Ces dernières sont ensuite lavées six fois par 1ml de tampon W. Le dernier de chacun de ces lavages est conservé. Les constructions CHMP2b ainsi que les interacteurs sont élués par compétition par ajout de 6 fois 100µl de tampon E (IBA BioTAGnology). Les 6 fractions ainsi obtenues sont alors analysées sur Gel SDS Page révélés au nitrate d'argent. Des bandes présentes dans les éluats et absentes des derniers lavages sont alors excisées. Elles sont analysées en spectrométrie de masse par Mathilde Louwagie au laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes au CEA de Grenoble.





# Résultats



## **1. Article 1 : CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines.**

Agnès Belly, Gilles Bodon, Béatrice Blot, Alexandre Bouron, Rémy Sadoul, Yves Goldberg.  
Journal of Cell Science; 2010.

### Contexte de l'étude

ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) est un complexe de remodelage membranaire utilisé dans divers processus physiologiques et pathologiques (genèse des corps multivésiculés, cytokinèse, bourgeonnement de virus enveloppés...). En 2005, Skibinski et ses collaborateurs ont identifié une mutation dans le gène de la protéine CHMP2B (ESCRT-III), chez une famille de patients atteints de démence frontotemporale (Skibinski et al., 2005a). Pour la toute première fois une protéine de ce complexe est impliquée directement dans une maladie neurodégénérative. La mutation ponctuelle dans le gène de CHMP2B conduit à un épissage aberrant de l'ARN et à la production de deux protéines, l'une tronquée en partie C-terminale : CHMP2B<sup>intron5</sup>, et l'autre, CHMP2B<sup>Δ10</sup> dont la partie C-terminale est aberrante (cf. figure 16. Introduction).

Lee et collaborateurs (Lee et al., 2007b) ont montré qu'une forte surexpression de CHMP2B<sup>intron5</sup> induit une mort massive des neurones en quelques jours ; en partie provoquée par un dysfonctionnement de l'autophagie. Une telle toxicité aiguë est toutefois difficilement conciliable avec l'apparition tardive de la maladie (généralement autour de 60 ans).

Notre hypothèse de travail est que comme il l'a été décrit dans le cadre d'autres neurodégénérescences (cf introduction tableau 3), ces mutations d'ESCRT-III ont pour premier effet de perturber les synapses, via le dérèglement du trafic endosomal de récepteurs synaptiques, de l'autophagie, ou plus directement en agissant sur la membrane plasmique du neurone.

### Résultats :

L'expression modérée de mutants reliés à la démence fronto-temporale (CHMP2B<sup>intron5</sup> et CHMP2B<sup>Δ10</sup>) ne provoque pas de mort précoce et massive des neurones d'hippocampe en culture.

Les morphologies des épines dendritiques de ces neurones ont été analysées par reconstruction tridimensionnelle de piles d'images acquises au microscope confocal. Les expressions de ces mutants modifièrent le nombre des épines et la structure. Ces mutants induisirent une chute de la proportion des épines larges en forme de champignons. En accord avec ces résultats, CHMP2B<sup>Δ10</sup> provoqua une altération de la transmission synaptique traduite par une baisse de l'amplitude des potentiels post synaptiques excitateurs spontanés due à une perte des courants les plus forts. L'extinction de CHMP2B par ANR interférant, produisit les mêmes effets morphologiques.

### Conclusion :

Ces résultats indiquent que la quantité de CHMP2B est un facteur limitant pour la formation d'épines à têtes larges. Les mutants de CHMP2B agiraient donc comme des

dominants négatifs en égard à la fonction de CHMP2B dans la spinogénèse, ce qui pourrait participer à l'émergence progressive des symptômes de la FTD.

# CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines

Agnès Belly<sup>1,2</sup>, Gilles Bodon<sup>1,2</sup>, Béatrice Blot<sup>1,2</sup>, Alexandre Bouron<sup>3,4,5</sup>, Rémy Sadoul<sup>1,2</sup> and Yves Goldberg<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Research Centre U836 and <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neurosciences, Campus Santé, F-38042 Grenoble, France

<sup>3</sup>CEA, DSV, IRTSV, <sup>4</sup>CNRS, UMR 5249 and <sup>5</sup>Université Joseph Fourier, UMR 5249, F-38054 Grenoble, France

\*Author for correspondence (yves.goldberg@ujf-grenoble.fr)

Accepted 27 May 2010

Journal of Cell Science 123, 2943–2954

© 2010. Published by The Company of Biologists Ltd

doi:10.1242/jcs.068817

## Summary

The highly conserved ESCRT-III complex is responsible for deformation and cleavage of membranes during endosomal trafficking and other cellular activities. In humans, dominant mutations in the ESCRT-III subunit CHMP2B cause frontotemporal dementia (FTD). The decade-long process leading to this cortical degeneration is not well understood. One possibility is that, akin to other neurodegenerative diseases, the pathogenic protein affects the integrity of dendritic spines and synapses before any neuronal death. Using confocal microscopy and 3D reconstruction, we examined whether expressing the FTD-linked mutants CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup> in cultured hippocampal neurons modified the number or structure of spines. Both mutants induced a significant decrease in the proportion of large spines with mushroom morphology, without overt degeneration. Furthermore, CHMP2B<sup>Δ10</sup> induced a drop in frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents, suggesting that the more potent synapses were lost. These effects seemed unrelated to changes in autophagy. Depletion of endogenous CHMP2B by RNAi resulted in morphological changes similar to those induced by mutant CHMP2B, consistent with dominant-negative activity of pathogenic mutants. Thus, CHMP2B is required for spine growth. Taken together, these results demonstrate that a mutant ESCRT-III subunit linked to a human neurodegenerative disease can disrupt the normal pattern of spine development.

**Key words:** ESCRT, FTLD, Neurodegeneration, Synapse, Spine head, NeuronStudio

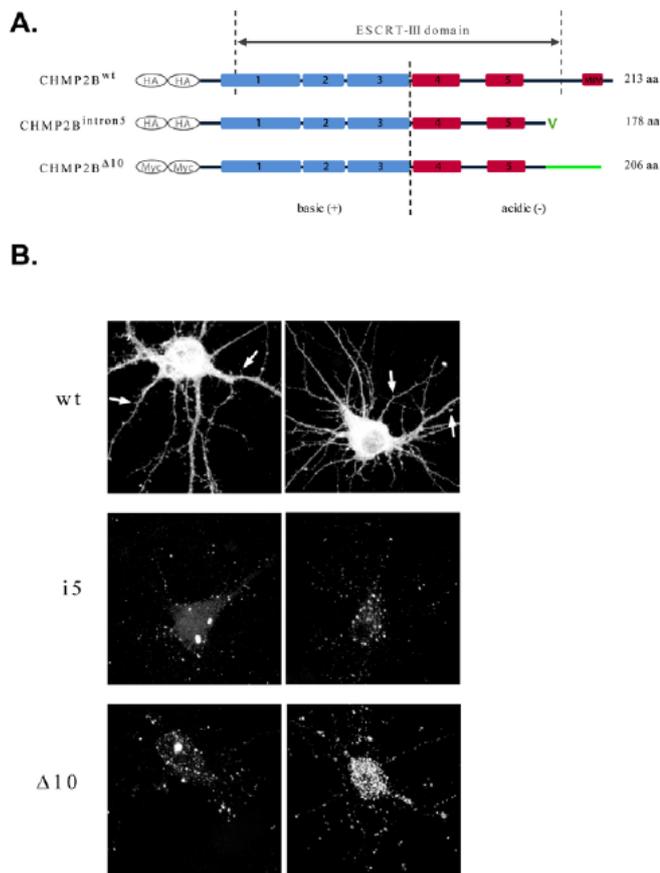
## Introduction

The endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) are a set of four cytoplasmic protein complexes (ESCRT-0 to ESCRT-III), conserved from yeast to human. ESCRTs are central to a growing range of cellular activities, including the delivery of downregulated surface proteins to the lumen of late endosomes (Hurley and Emr, 2006; Slagsvold et al., 2006), the release of viruses at the plasma membrane (von Schwedler et al., 2003), cytokinesis of dividing cells (Carlton and Martin-Serrano, 2007) and autophagy of protein aggregates (Filimonenko et al., 2007). All of these diverse processes involve the budding and fission of cellular membranes, the latter of which seems to be directly catalysed by ESCRTs. Recent results show that ESCRTs are sequentially recruited to the cytosolic side of endosomal or plasma membrane microdomains, until ESCRT-III subunits locally polymerise into filaments. Transient assembly of ESCRT-III filaments on the membrane is a physical agent of membrane deformation and vesiculation (Fabrikant et al., 2009; Hanson et al., 2008; Lata et al., 2008; Muziol et al., 2006; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009; Wollert and Hurley, 2010). Hence, ESCRT-III polymers are pivotal effectors of cellular membrane restructuring.

In keeping with its potent effects, the polymerisation of ESCRT-III is normally under tight regulation. The core subunits of ESCRT-III form a family of highly related proteins, the charged multivesicular body proteins (CHMP) 1–7, all of which contain a conserved oligomerisation and lipid-binding interface (the ESCRT-III or SNF-7 domain), linked to a C-terminal regulatory region (see Fig. 1). The latter mediates both intramolecular inhibition of the

ESCRT-III domain and intermolecular interaction with subunit-specific factors that regulate filament dynamics (Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006; Stuchell-Brereton et al., 2007; Zamborlini et al., 2006). Deletion of the regulatory region converts ESCRT-III subunits into dominant-negative mutants that are able to block ESCRT-dependent processes such as the release of HIV-1 virions from infected cells (Zamborlini et al., 2006).

Among the ESCRT-III subunits, CHMP2B has received particular attention following the discovery that mutations in the *CHMP2B* gene underlie a dominantly heritable form of frontotemporal dementia (called FTD-3), a presenile brain disease caused by selective degeneration of cortical neurons (Skibinski et al., 2005). In a thoroughly studied Danish kindred, the FTD phenotype was tightly linked to a single point mutation at the splice acceptor site of *CHMP2B* exon 6. The mutation generates two distinct aberrant transcripts, *CHMP2B*<sup>intron5</sup> and *CHMP2B*<sup>Δ10</sup>, both of which encode proteins with a defective C terminus (Skibinski et al., 2005) (see Fig. 1). Neurodegeneration has been hypothesised to result from perturbation of neuronal autophagy by these mutant subunits (Rusten and Simonsen, 2008). Consistent with the loss of the regulatory domain, in heterologous cells, both *CHMP2B*<sup>intron5</sup> and *CHMP2B*<sup>Δ10</sup> form insoluble polymers, often coating endosomes, and cause dominant-negative inhibition of ESCRT-dependent processes, including autophagosome maturation (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007; Skibinski et al., 2005). In cultured cortical neurons, overexpression of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> was shown to induce retraction of dendritic arbors and subsequent cell death, partly through toxic build-up of autophagosomes (Lee et al.,



**Fig. 1. Structure and distribution of CHMP2B constructs.** (A) Primary structure of CHMP2B constructs used in this study. The ESCRT-III domain is the conserved sequence domain common to all members of the charged multivesicular body proteins (CHMP1–7) superfamily. Positively (blue) and negatively (red) charged  $\alpha$  helices (1–5) are located along the sequence according to the 3D structure of the closely related CHMP3 protein (Muziol et al., 2006). MIM: microtubule interacting and transport domain (MIT)-interacting module, required for binding to the SKD1 (Vps4) ATPase responsible for dissociation of CHMP polymers. V: a single valine residue replaces the normal C-terminus in CHMP2B<sup>intron5</sup>. The green line in CHMP2B<sup>Δ10</sup> indicates the aberrant C-terminus carried by this mutant. Ellipses indicate tags fused to the N-terminus (tags are nine or ten residues long). Sequence lengths are those of the untagged proteins. (B) Subcellular distribution of tagged CHMP2B proteins. Neurons were transfected with the indicated plasmids, processed for immunofluorescence staining with anti-tag antibody and imaged by confocal microscopy. Two representative cells are shown for each plasmid. Top: CHMP2B<sup>wt</sup> diffuses throughout the entire neuron, including the heads of dendritic spines (arrows). Middle: CHMP2B<sup>intron5</sup> forms multiple small clusters in the soma and dendrites, and occasional larger aggregates. Bottom: CHMP2B<sup>Δ10</sup> has a clustered distribution similar to that of CHMP2B<sup>intron5</sup>.

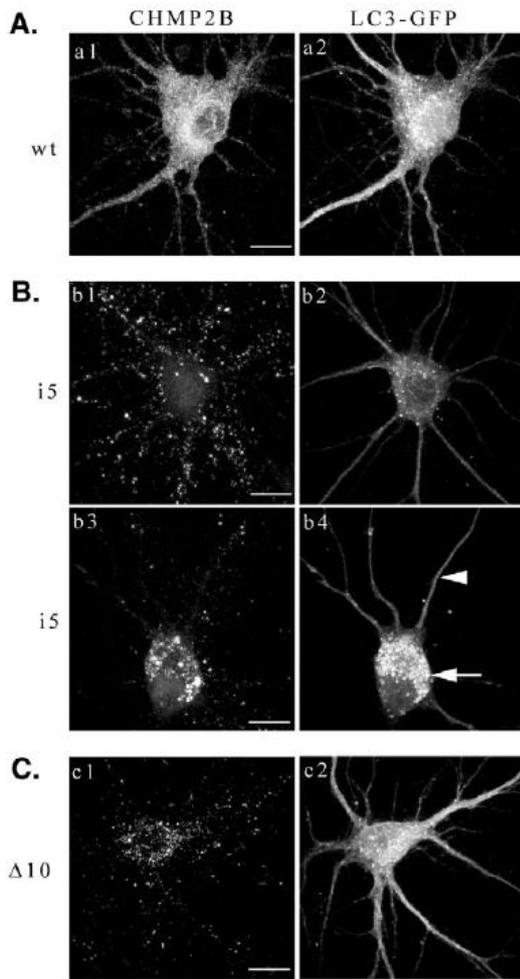
2007; Lee and Gao, 2009). Surprisingly, however, CHMP2B<sup>Δ10</sup> failed to increase neuronal death, even though its effects in heterologous cells on autophagy are similar to those of CHMP2B<sup>intron5</sup> (Filimonenko et al., 2007). Furthermore, knockdown of CHMP2B by RNAi did not modify neuronal viability. These observations suggest that disease-linked CHMP2B mutations might affect neuronal physiology in ways other than by lethal malfunction of autophagic mechanisms.

Accumulating evidence indicates that, in various neurodegenerative diseases, neuronal death is a late event, preceded by early disruption of dendritic spines and synapses, which itself is a pivotal pathogenic step (Morfini et al., 2009; Wei et al., 2009; Wishart et al., 2006). In FTD, extensive synaptic loss and reduction in the number of spines have been documented in diseased cortex (Ferrer, 1999; Lipton et al., 2001). Given its role in endosomal trafficking and plasma membrane deformation, ESCRT-III might plausibly control aspects of synaptic biology. Here, we examine the possible impact of CHMP2B mutants and CHMP2B depletion on the development of dendritic spines. CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup> was expressed in hippocampal neurons without causing apparent anomalies in endosomal morphology, autophagosome amount or cell viability. The mutants potently suppressed the growth of spine heads, strongly lowering the proportion of mushroom spines. Very similar effects were obtained with an siRNA targeting endogenous CHMP2B, consistent with dominant-negative action of the mutants. Physiologically, CHMP2B<sup>Δ10</sup> caused a drop in the frequency and amplitude of spontaneous excitatory synaptic currents, with selective disappearance of large currents. We propose that CHMP2B and potentially ESCRT-III are required for the maturation of dendritic spines, and that pathogenic CHMP2B mutants perturb this process. To the extent that maturation correlates with functional potentiation, these results implicate ESCRT-III in synaptic plasticity. In the protracted course of FTD, CHMP2B mutations might affect synaptic homeostasis and plasticity long before inducing massive neuronal death.

**Results**

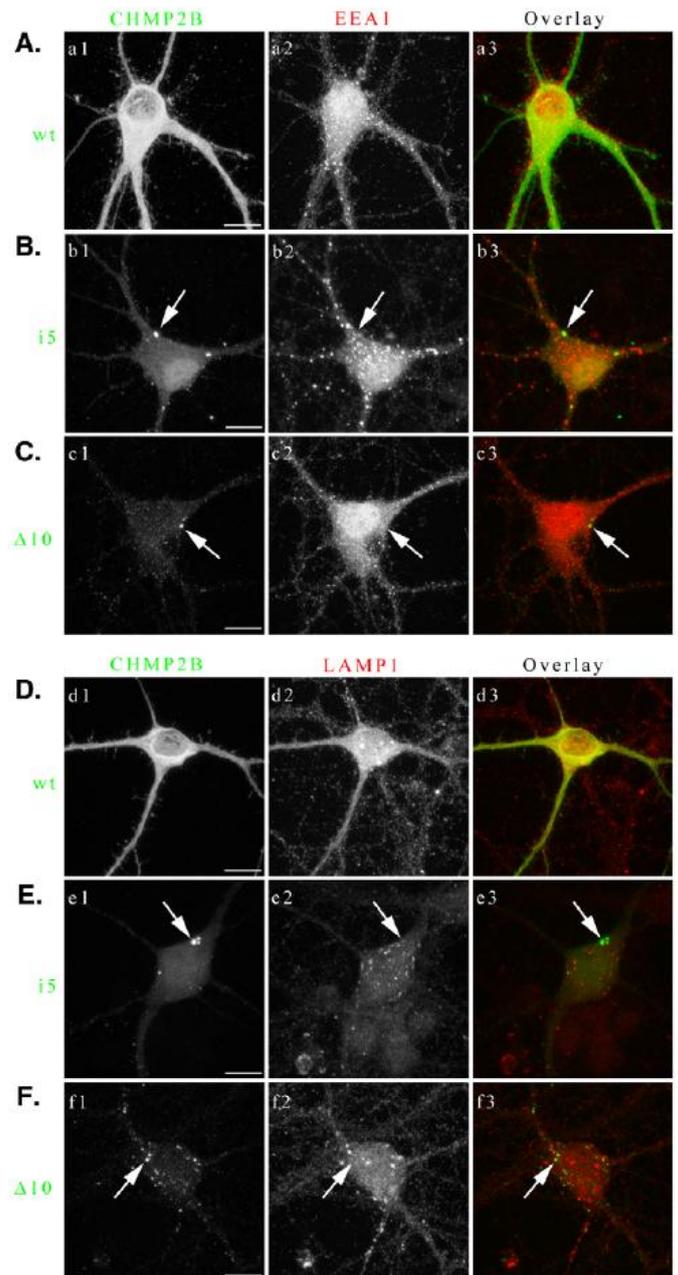
**Expression of CHMP2B variants in hippocampal neurons**

To study the neuronal effects of CHMP2B proteins, hippocampal neurons were transfected at 10 days in vitro (DIV) with plasmids encoding N-terminally tagged CHMP2B<sup>wt</sup> (wild type), CHMP2B<sup>intron5</sup> or CHMP2B<sup>Δ10</sup> (Fig. 1). Using immunofluorescent staining with anti-tag antibody, expression of these plasmids could be reliably detected up to 5 days after transfection. The subcellular distribution of the mutant proteins clearly differed from that of wild type (Fig. 1B; Fig. 2, left; Fig. 3, left). Wild-type CHMP2B was homogeneously distributed throughout the entire neuronal cytoplasm, including in axons, dendrites and dendritic spines (Fig. 1B, arrows). By contrast, both CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup> formed varying numbers of small bright puncta, which were found in the soma and proximal dendrites. Larger aggregates were occasionally observed in the soma. To determine whether expression of CHMP2B mutants perturbed autophagy in our system, we performed co-transfection experiments with LC3–GFP as an autophagosome marker. In a vast majority of neurons, expression of either CHMP2B<sup>Δ10</sup> or CHMP2B<sup>intron5</sup> failed to induce clustering of LC3–GFP (Fig. 2, b2, c2). In support of this, despite evaluation by two independent investigators, we could not detect any autophagy-associated drop in the diffuse pool of LC3–GFP. Thus, in the present setting, pathogenic CHMP2B mutants did not substantially enhance autophagosome accumulation. Furthermore, to determine whether the mutant CHMP2B puncta observed in transfected neurons were related to endosomes, transfected neurons were doubly stained with anti-tag antibody and antibodies raised against either the early endosomal marker EEA-1 (Fig. 3, a2–c2) or the late-endosomal–lysosomal protein LAMP-1 (Fig. 3, d2–f2). No colocalisation was observed with these markers. These data suggest that the CHMP2B aggregates that form under our transfection conditions are not associated with endosomes.



**Fig. 2. Lack of LC3–GFP clustering in neurons expressing mutant CHMP2B.** Neurons were co-transfected at 10 DIV with the indicated CHMP2B plasmids (left), together with the autophagosomal marker LC3–GFP. The cells were fixed 5 days later and processed for immunofluorescence staining with anti-tag antibody and Alexa-Fluor-594-coupled secondary antibody. Confocal images were acquired in both the immunofluorescence and GFP channels. Diffuse LC3–GFP localisation predominated upon co-transfection with CHMP2B<sup>wt</sup> (a1,a2), CHMP2B<sup>Δ10</sup> (c1,c2) and in a large majority of cases with CHMP2B<sup>intron5</sup> (b1,b2). Autophagosome accumulation was seen in rare cells transfected with CHMP2B<sup>intron5</sup> (b3, b4, arrow). Arrowhead: no autophagosomes were detected in the dendrites. Scale bars: 10 μm.

To visualise the morphology of neurons that had been expressing mutant CHMP2B for several days, the cells were co-transfected with CHMP2B constructs and a plasmid encoding the fluorescent protein mCherry, allowing staining of the whole cytosol. At 5 days after transfection, 75–80% of neurons co-transfected with empty vector, CHMP2B<sup>wt</sup> or CHMP2B<sup>Δ10</sup>, and 55% of neurons co-transfected with CHMP2B<sup>intron5</sup> were healthy, as judged from the overall integrity of their neurites and the absence of neuritic swellings (supplementary material Fig. S1). These percentages did not change much after 10 days, and were largely sufficient to allow meaningful analysis of dendritic arbors and spines. Only healthy neurons were retained for further analysis.



**Fig. 3. Non-endosomal localisation of exogenously expressed CHMP2B proteins in hippocampal neurons.** Neurons were doubly stained with monoclonal anti-tag antibody (a1–f1) together with polyclonal antibody against the respective marker (a2–f2), as indicated. Immunofluorescence was recorded by dual-channel confocal microscopy. Arrows indicate CHMP2B puncta. Note that they do not coincide with EEA1 (a2–c2) or LAMP1 (d2–f2) puncta. Scale bars: 10 μm.

The effect of CHMP2B constructs on dendritic arborisation was determined by Sholl analysis of neuronal morphology. For this, we measured the rate of increase in total neuritic length as a function of radial distance from the cell body (supplementary material Fig. S2). CHMP2B<sup>wt</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup> had no significant effect on arborisation. CHMP2B<sup>intron5</sup> induced a moderate (25%) decrease in average branching rate, but did not induce the large-scale retraction of dendrites that accompanies lethal perturbations of ESCRT-III (Lee et al., 2007).

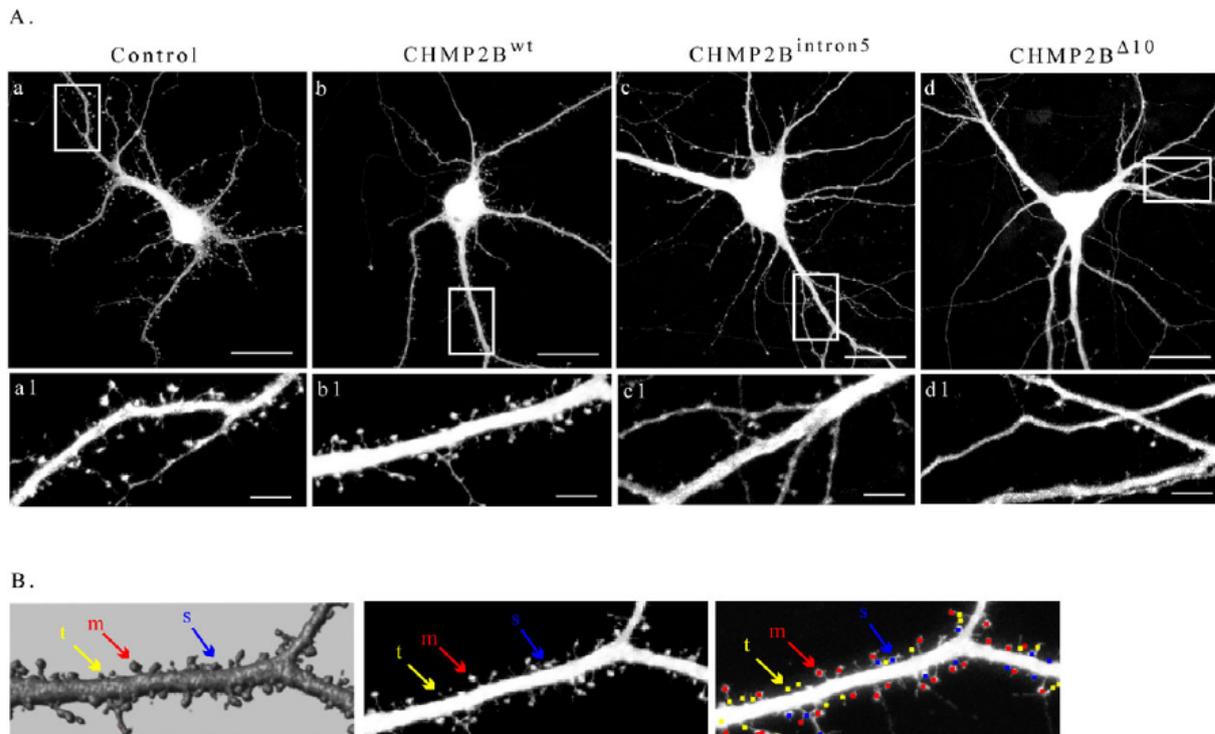
**CHMP2B mutants affect dendritic spine density and morphology**

The dendritic morphology of neurons that were co-transfected with mCherry and CHMP2B plasmids was examined in detail by three-dimensional (3D) confocal imaging of mCherry fluorescence. Fig. 4A (a–d) shows representative views of neurons transfected with the different CHMP2B constructs. Stacks of serial optical sections were produced for each neuron and the NeuronStudio software package (Rodriguez et al., 2008; Rodriguez et al., 2006) was then used to generate 3D reconstructions of dendritic arbors and spines, and to count, measure and classify spines (see Materials and Methods). Fig. 4B shows a reconstructed dendritic segment obtained from a typical control neuron, and the results of automated identification of spine types. The volumes of the reconstructed spines followed a statistical distribution that closely resembled that described in a recent study of hippocampal spine dynamics (Yasumatsu et al., 2008) (supplementary material Fig. S3). Furthermore, the peak of our distribution (between 0.050 and 0.075  $\mu\text{m}^3$ ) was in the same range as published values ( $0.058 \pm 0.034 \mu\text{m}^3$ ) previously obtained by electron microscopy for the spines of hippocampal neurons in dissociated culture at 14 DIV (Boyer et al., 1998). The distribution of spine lengths was also similar to previously published values (Fig. 4G). These data indicate that analysis by NeuronStudio correctly detected the spine population in our cultured neurons.

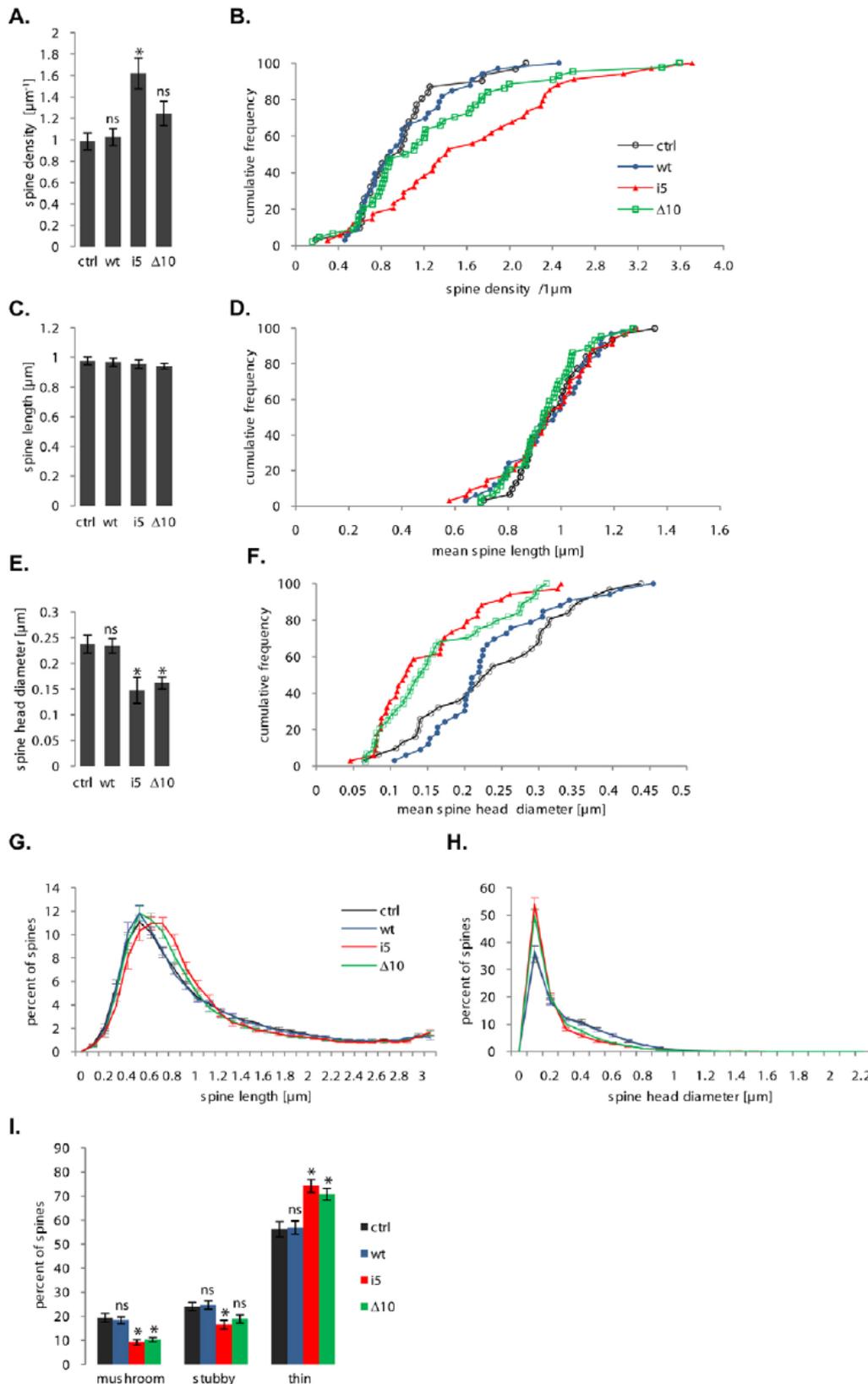
The density of spines (pooling all spine types) detected by this technique was determined for each neuron (Fig. 5A,B).

Overexpression of tagged, wild-type CHMP2B did not change the average density compared to control (co-transfection with empty vector). By contrast, expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> raised the average density of spines by 64% compared with control (Fig. 5A, column 3). However, many of these additional spines were very small (see below). These small spines were often hard to detect in uniformly thresholded 2D projections of image stacks, but were revealed by the 3D reconstruction procedure (supplementary material Fig. S4). Neurons expressing the CHMP2B <sup>$\Delta$ 10</sup> mutant also had a tendency to increase the density of their protrusions (average density 24% higher), but this trend did not reach significance (Fig. 5A, column 4).

To investigate the possible effect of CHMP2B mutants on spine dimensions, we determined the mean length of spines and the mean diameter of spine heads for each neuron. None of the CHMP2B constructs modified spine length (Fig. 5C,D). Wild-type CHMP2B did not change spine head diameter either. By contrast, mutant proteins strongly affected spine diameter. Expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> induced a 40% reduction in average spine diameter, whereas CHMP2B <sup>$\Delta$ 10</sup> reduced average diameter by 32% (Fig. 5E,F). These changes in average spine dimensions reflect the selective loss of large-headed spines. Fig. 5G,H shows the normalised distributions of spine lengths and spine head diameters in neurons transfected with each of the four plasmids. Both mutants had a clear, comparable effect on the distribution of spine diameters (Fig. 5H). In control neurons, thin spines (diameter <0.2  $\mu\text{m}$ ) predominated on top of a distinct population of larger spines,



**Fig. 4. Detection and classification of dendritic spines in transfected hippocampal neurons.** (A) Neurons were co-transfected with the indicated constructs together with mCherry, fixed 5 days later and images of mCherry fluorescence were acquired by confocal microscopy. The figure shows maximal intensity projections of confocal image stacks. Control: empty pcDNA3 vector. The boxed regions in a–d (scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ) were scanned at higher magnification in a1–d1 (scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ). (B) Stacks of optical slices acquired in A served to generate 3D models of the dendrite, using the surface-defining Ray Burst algorithm implemented in NeuronStudio (Rodriguez et al., 2006). The dimensions of the modelled structures were automatically measured as described previously (Rodriguez et al., 2006) and used to identify and classify spines. Left: surface rendering of a segment from the dendrite shown in b1. Middle: maximal intensity projection of optical sections from the same segment. Right: automated spine detection and classification. Appropriately coloured dots are superimposed onto the spines. Yellow (t): thin spines; red (m): mushroom spines; blue (s): stubby spines.



**Fig. 5. Effects of FTD-linked CHMP2B mutants on the density and dimensions of spines.** All parameters were measured on the same sets of neurons (pooled from three independent cultures). Ctrl, control plasmid ( $n=31$  neurons); wt, tagged wild-type CHMP2B ( $n=33$  neurons); i5, CHMP2B<sup>intron5</sup> ( $n=34$  neurons);  $\Delta 10$ , CHMP2B <sup>$\Delta 10$</sup>  ( $n=44$  neurons). Measurements were obtained from 700–1500  $\mu\text{m}$  dendrites and 600–1200 spines per neuron. (A) Mean spine counts per  $\mu\text{m}$  dendrite in neurons co-transfected with mCherry and the indicated plasmids. CHMP2B<sup>intron5</sup> increases the total density of spines (\* $P=0.0005$ ). The increase caused by CHMP2B <sup>$\Delta 10$</sup>  remains non-significant (ns) with  $P=0.09$ . (B) Cumulative frequency histogram of spine densities per neuron, corresponding to the dataset in A. (C) Mean length of spines per neuron. No significant difference was observed between conditions. (D) Cumulative frequency histogram of mean spine length per neuron, corresponding to dataset in C. (E) Mean diameter of spine heads per neuron. Both mutants cause an overall shrinkage of spine heads (\* $P=0.0005$  for both mutants). (F) Cumulative frequency histogram of mean spine head diameters per neuron, corresponding to the dataset in E. (G) Normalised distribution of spine lengths per neuron. Spine length histograms obtained for each neuron (0.1- $\mu\text{m}$ -wide bins) were normalised to 100 total counts. The distribution shows the mean normalised values of each bin, for the respective neuron group. Error bars: s.e.m. for each bin. (H) Normalised distribution of spine head diameters per neuron. Spine diameter histograms obtained from each neuron were normalised and averaged as in F. Note the coincidence of the control and wild-type distributions, and that of the two mutant distributions. (I) Effects of FTD-linked CHMP2B mutants on the morphological type of spines. Histogram shows the mean percentages per neuron of spines with mushroom-like, stubby and thin morphologies. Both mutants potently reduce the mushroom spine fraction (\* $P<0.000001$  for both mutants). CHMP2B<sup>intron5</sup> also reduces the fraction of stubby spines (\* $P=0.005$ ) but CHMP2B <sup>$\Delta 10$</sup>  does not ( $P=0.09$ ). Conversely, both mutants increase the thin spine fraction (\* $P=0.0001$  for both mutants).

represented as a shoulder and tail in the distribution [interquartile range (IQR), 5.98  $\mu\text{m}$ ]. This subset of larger spines was still present in neurons transfected with CHMP2B<sup>wt</sup> (IQR, 6.00  $\mu\text{m}$ ), but strongly reduced following transfection with either

CHMP2B<sup>intron5</sup> (IQR, 2.89  $\mu\text{m}$ ) or CHMP2B <sup>$\Delta 10$</sup>  (IQR, 3.12  $\mu\text{m}$ ). Because spines with similar head width might differ in the size of their neck, with important consequences for their physiology (Noguchi et al., 2005), we determined how CHMP2B mutants

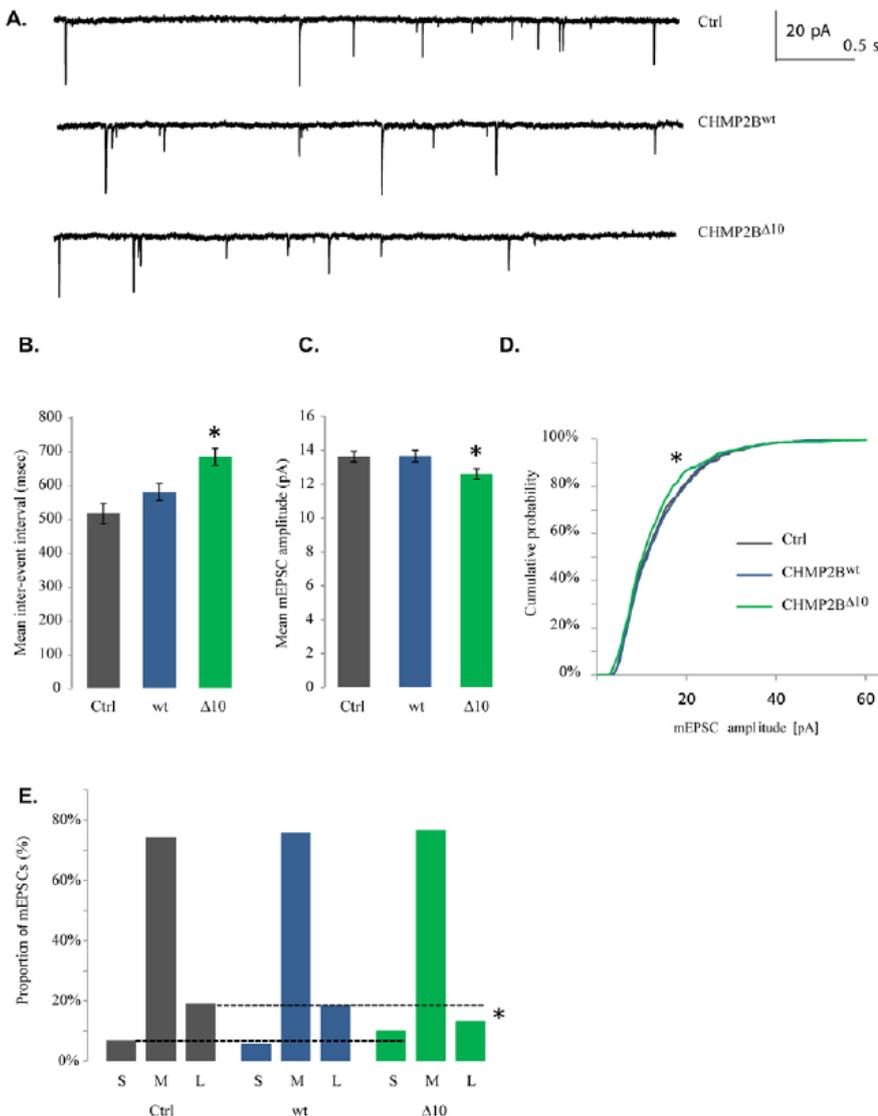
affected the basic morphological categories of spines. Fig. 5I shows that neurons expressing either mutant had an abnormally low fraction of mushroom spines, identified by their head vs neck width ratio. The fraction of spines with mushroom morphology was decreased by ~50% with both CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup>, because they were replaced by an enlarged proportion of thin spines. Stubby spines were also reduced in number, but to a smaller extent, by expression of CHMP2B<sup>intron5</sup>. The average diameter of spines in the mushroom spine subset (0.56 μm) did not significantly change in cells transfected with the mutants, confirming the consistency of morphotype identification.

Taken together, these data indicate that expression of a mutant ESCRT-III subunit linked to a human neurodegenerative disease can strongly affect the density and morphology of dendritic spines, and disrupt the normal pattern of spine development.

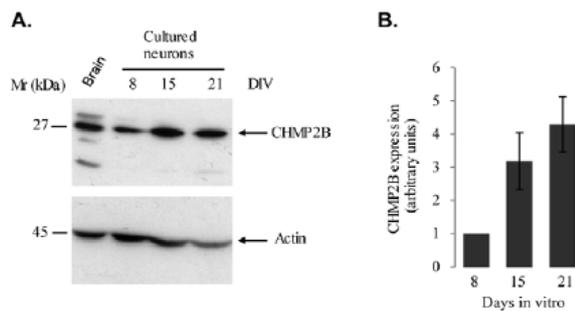
**A CHMP2B mutant affects miniature excitatory synaptic currents**

To determine whether the effects of mutant CHMP2B on spine morphology correlated with functional changes at synapses, we recorded excitatory synaptic currents from cultured hippocampal

neurons that had been co-transfected with GFP together with empty vector, or together with vectors encoding wild-type CHMP2B or CHMP2B<sup>Δ10</sup>. Transfected cells were identified by GFP fluorescence. We monitored the frequency and amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) as an indicator of possible effects of plasmids on synaptic strength. In total, 16 out of 18 transfected neurons were synaptically active; the two inactive neurons were discarded from analysis. Sample traces that were representative of each transfection condition are shown in Fig. 6A. A sequence of 128 consecutive mEPSCs was randomly picked from each recording, and the sequences were pooled according to the transfected plasmid. Mean inter-event intervals were calculated for each pool. Intervals were significantly longer between mEPSCs observed in neurons expressing CHMP2B<sup>Δ10</sup> than in controls (Fig. 6B). Thus, the mean frequency of mEPSCs was lower in CHMP2B<sup>Δ10</sup>-expressing cells than in control cells (1.47 vs 1.94 Hz), indicating a decrease in synaptic activity (Fig. 6B). The mean amplitude was slightly lower in mEPSCs of cells transfected with CHMP2B<sup>Δ10</sup> than in those of control- or CHMP2B<sup>wt</sup>-transfected neurons (12.6 vs 13.6 pA) (Fig. 6C). However, cumulative amplitude histograms indicated that CHMP2B<sup>Δ10</sup> caused a



**Fig. 6. Electrophysiological effects of wild-type and mutant CHMP2B.** mEPSCs were recorded from transfected neurons under voltage clamp in the whole-cell configuration, in the presence of tetrodotoxin and D-APV to isolate AMPA-receptor-mediated spontaneous synaptic currents (control: *n*=4 cells; CHMP2B<sup>wt</sup>: *n*=6 cells; CHMP2B<sup>Δ10</sup>: *n*=6 cells). (A) Representative sample traces from neurons co-transfected with GFP and control plasmid (top), CHMP2B<sup>wt</sup> (middle) and CHMP2B<sup>Δ10</sup> (bottom). (B) Mean duration of inter-event intervals along sequences of mEPSCs pooled from equivalently transfected neurons (control: *n*=516 events; CHMP2B<sup>wt</sup>: *n*=768 events; CHMP2B<sup>Δ10</sup>: *n*=768 events). Compared with control, intervals were significantly longer in mEPSCs from CHMP2B<sup>Δ10</sup>-expressing neurons (\**P*=0.00001), but not from CHMP2B<sup>wt</sup> neurons (*P*=0.05, significance threshold alpha=0.017 with Bonferroni correction for multiple comparisons). (C) Mean amplitude of mEPSCs from the different transfection groups. The overall variation of mean amplitude as a function of transfected plasmid was significant (ANOVA: *F*<sub>2,2049</sub>=3.04, *P*=0.048); the specific difference between the means of CHMP2B<sup>Δ10</sup> and control was barely below threshold (\**P*=0.026 with Bonferroni-corrected alpha=0.025). (D) Cumulative histogram of mEPSC amplitudes; same dataset as in C. \* indicates significant reduction in the top quintile in the case of CHMP2B<sup>Δ10</sup> (see Results and panel E). (E) Histogram of mEPSC amplitudes showing the specific reduction in the proportion of large currents (>20 pA) and the increase in small currents. S, *i*<5pA; M, 5≤*i*≤20 pA; L, *i*>20 pA. The two dashed lines refer to the respective proportions of large and small currents in the control neurons. The proportion of large currents was lower in neurons transfected with CHMP2B<sup>Δ10</sup> compared with control or CHMP2B<sup>wt</sup> neurons (\**P*<0.05).

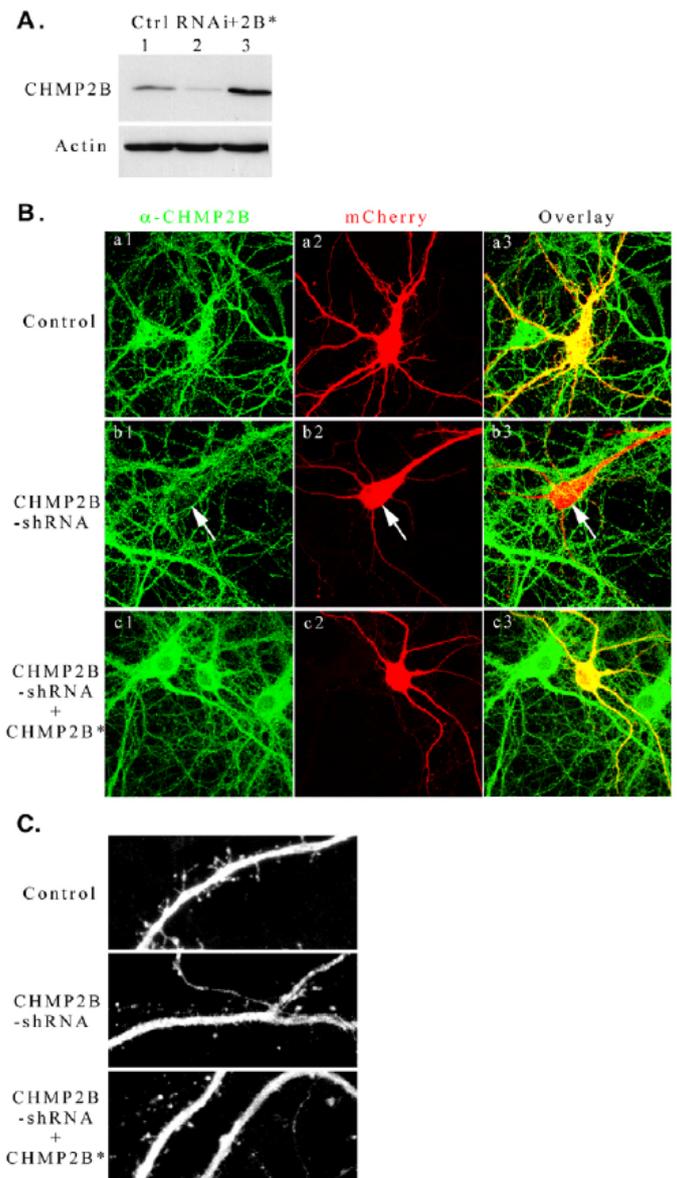


**Fig. 7. Levels of endogenous CHMP2B increase during neuronal maturation in culture.** Sister cultures of hippocampal neurons maintained in plastic dishes were lysed at the indicated time points (DIV). The lysates were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western immunoblotting with anti-CHMP2B antibody. The blots were reprobed with anti-actin antibody to normalise for loading error. (A) Representative blot. Leftmost lane: rat brain lysate, showing the pattern of CHMP2B in vivo. (B) Films were scanned and the optical density of the CHMP2B band was measured in grey levels for each lane. Band intensities were normalised by dividing each value by the intensity of the actin band in the same lane. Care was taken to obtain immunodetection in the linear range. The graph shows mean normalised intensities at three time points ( $n=3$  cultures). Error bars: s.e.m.

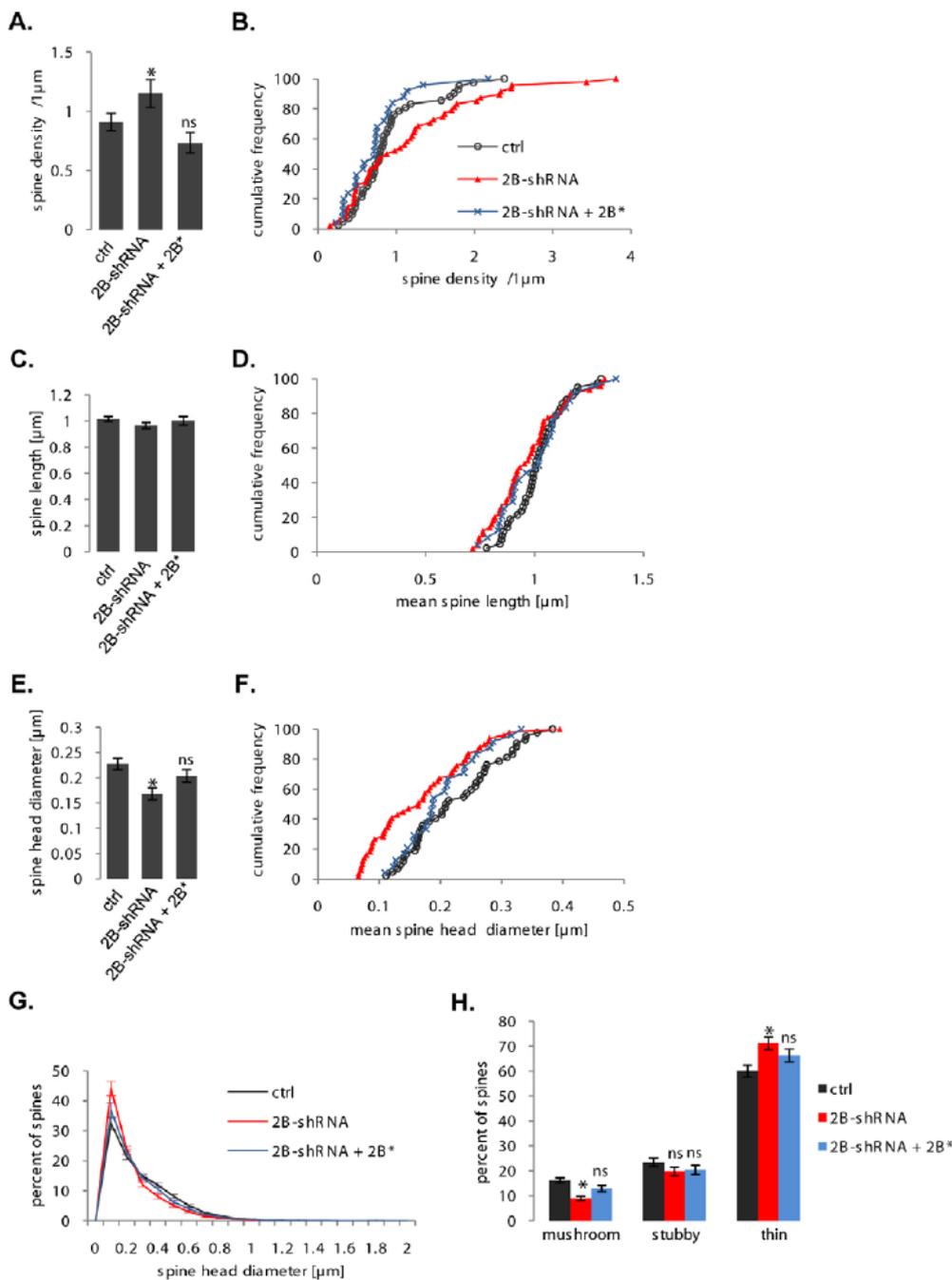
significant reduction in the frequency of large amplitude events, i.e. those belonging to the top quintile (Fig. 6D). mEPSCs with an amplitude larger than 20 pA (approximately twice the median amplitude), which represented up to 19% of mEPSCs in control neurons, were reduced by a third in neurons expressing CHMP2B<sup>Δ10</sup>. Conversely, the proportion of small amplitude events (<5 pA) rose from 6.8% in controls to 10% in neurons expressing CHMP2B<sup>Δ10</sup> (Fig. 6E). The drop in the frequency of large currents was not observed in neurons that overexpressed CHMP2B<sup>wt</sup>. In view of the known correlation between spine head size and amplitude of AMPA-receptor-mediated synaptic currents (Matsuzaki et al., 2001), these data are consistent with the morphologically observed reduction in mushroom spines. Mutant CHMP2B might cause a reduction in the proportion of the more potent synapses and an increase in the proportion of weak synapses.

**Endogenous CHMP2B is required for maturation of dendritic spines**

Because dysregulated CHMP2B mutants affect spine morphogenesis, the issue arises of whether the endogenous normal protein plays some role in this process. Endogenous CHMP2B was clearly detectable in extracts from cultured neurons at 8 DIV and increased in older cultures, in which synaptogenesis and spine maturation are known to take place (Fig. 7). Immunofluorescent staining of the neurons with the anti-CHMP2B antibody showed the protein to be widely distributed throughout soma, axons and dendrites, similar to data obtained with the tagged wild-type protein (Fig. 8). To disrupt endogenous CHMP2B expression, we transfected cultured hippocampal neurons at 10 DIV with a pSuper-based plasmid vector encoding a previously described CHMP2B-specific shRNA (Lee et al., 2007). The efficiency of RNAi was ascertained by western blotting of transfected baby hamster kidney (BHK) cells (Fig. 8A). Transfected neurons could be tracked and outlined by mCherry, which was coexpressed from the same plasmid. Immunofluorescent staining with anti-CHMP2B antibody confirmed the efficient downregulation of endogenous CHMP2B



**Fig. 8. Knockdown of endogenous CHMP2B in hippocampal neurons.** (A) To verify the efficacy of the shRNA-encoding plasmid, the indicated plasmids were transfected in rodent (BHK) cells and equal protein amounts of transfected cell lysates were analysed by western immunoblotting with anti-CHMP2B antibody, or with anti-actin as a control. Lane 1: empty pSuper-mCherry plasmid; lane 2: shRNA-expressing plasmid; lane 3: shRNA-expressing plasmid co-transfected with vector encoding CHMP2B\* (native CHMP2B cDNA with silent mutations at the siRNA target site). Note that the CHMP2B protein remaining after transfection of the shRNA plasmid largely originates from non-transfected cells in the culture. (B) Neurons were transfected at 10 DIV with the plasmids indicated on the left, fixed at 15 DIV and stained with anti-CHMP2B antibody and Alexa-Fluor-488-labelled secondary antibody. Confocal images were acquired in both the Alexa-Fluor-488 and mCherry channels. Representative images of transfected neurons are displayed. Control: empty pSuper-mCherry vector. Note the drop in immunofluorescence in the shRNA-expressing neuron (arrow) compared with surrounding cells, and the decreased green vs red ratio (overlay) compared with control or rescued cells. (C) Maximal intensity projections of image stacks, showing representative dendritic segments visualised by mCherry fluorescence in neurons transfected with the indicated plasmids.

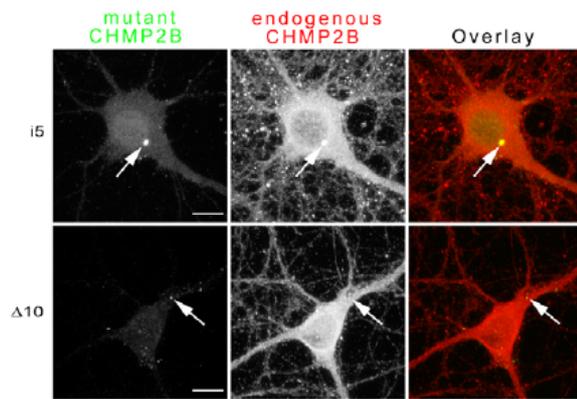


**Fig. 9. Effects of CHMP2B depletion on the density and morphology of dendritic spines.** All parameters were measured as in Figs 3 and 4. Ctrl:  $n=42$  cells; shRNA:  $n=48$  cells; shRNA together with rescuing CHMP2B:  $n=25$  cells. (A) The mean density of spines varied as a function of CHMP2B depletion (ANOVA:  $F_{2,112}=3.80$ ,  $P=0.025$ ), although pairwise differences with control remained below significance (\* $P=0.021$  vs rescued cells). (B) Cumulative frequency histogram of spine densities per neuron (normalised in percent); same data as in A. (C) CHMP2B depletion had no effect on the mean spine length per neuron. (D) Cumulative frequency histogram of spine lengths. (E) Mean spine head diameter per neuron. The CHMP2B shRNA induces a highly significant decrease (\* $P < 0.001$ ), which is rescued by re-expression of CHMP2B (ns,  $P=0.19$ ). (F) Cumulative frequency histogram of spine head diameters. (G) Normalised distribution of spine head diameters. Note the superposition of 'control' and 'rescued' (2B-shRNA + 2B\*) curves, and the recovery of larger spines in the 'rescued' profile. (H) Proportions of basic spine types. The CHMP2B shRNA potentially decreases the mushroom spine fraction (\* $P < 0.001$ ) and the effect is suppressed in the rescued cells (ns,  $P=0.028$ , corrected alpha=0.017).

expression in transfected neurons (Fig. 8B, middle panel). In agreement with published results (Lee et al., 2007), the CHMP2B shRNA did not affect neuronal viability. To verify the target specificity of RNAi, control experiments were performed in which CHMP2B shRNA was coexpressed with an RNAi-resistant CHMP2B mRNA (called CHMP2B\*) (Fig. 8B, lower panel). Confocal imaging of mCherry and spine analysis were performed as in the case of mutant CHMP2B (Fig. 8C, Fig. 9).

Depletion of endogenous CHMP2B increased the average density of spines, and the increase was fully reversed upon rescue by CHMP2B\* (Fig. 9A,B). CHMP2B depletion did not significantly affect the length of spines (Fig. 9C,D). By contrast, a highly significant reduction in mean spine diameter per neuron was observed in shRNA-transfected cells compared with controls; this

was rescued to a near-normal value upon coexpression of CHMP2B\* (Fig. 9E,F). Similar to the case of neurons transfected with mutant CHMP2B, the size distribution of spine heads showed a loss of the large spine subset; this loss was largely reversed by rescue with RNAi-resistant CHMP2B (Fig. 9G). Spine classification revealed a 50% drop in the average proportion of mushroom spines, from 17% in control neurons to 9% in shRNA-transfected cells (Fig. 9H). This effect is equivalent to that observed upon expression of mutant CHMP2B. Upon coexpression of CHMP2B\*, the average proportion of mushroom spines could be rescued to 13%, at which level the difference with control neurons was no longer significant (Fig. 9H). This demonstrates the specificity of the effects of CHMP2B shRNA. Taken together, these results indicate that CHMP2B is required for spine head expansion, a



**Fig. 10. Effect of mutant CHMP2B on the subcellular distribution of the normal protein.** Hippocampal neurons were transfected with the indicated mutant, and processed for dual immunofluorescent staining with anti-tag and anti-endogenous-CHMP2B antibodies. Confocal images were acquired in both channels. Co-clustering of endogenous CHMP2B with mutant protein (arrows) was evident in some of the CHMP2B<sup>intron5</sup> aggregates (upper panel), and faintly discernible in some of the CHMP2B<sup>Δ10</sup> puncta (lower panel). Scale bars: 10  $\mu$ m.

basic structural aspect of synaptic plasticity. Furthermore, the data suggest that human-disease-linked CHMP2B mutants act as dominant negatives with respect to CHMP2B function in spine morphogenesis.

To determine whether mutant CHMP2B could perturb the subcellular distribution of the normal endogenous protein, neurons transfected with tagged CHMP2B<sup>intron5</sup> or CHMP2B<sup>Δ10</sup> were immunostained with both anti-CHMP2B and anti-tag antibodies (Fig. 10). For this, we took advantage of the fact that the anti-CHMP2B antibody was raised against the wild-type C-terminal region, and therefore does not recognise the mutant proteins. The larger CHMP2B<sup>intron5</sup> aggregates recruited conspicuous amounts of the endogenous protein, inducing it to form abnormal clusters (Fig. 10, upper panel, arrow). Faint clusters of CHMP2B also occasionally overlapped with CHMP2B<sup>Δ10</sup> puncta (Fig. 10, lower panel). However, the major, diffuse pool of endogenous CHMP2B remained unaffected. These results suggest that a fraction of native CHMP2B molecules might be perturbed in their biochemical function by interaction with mutant protein.

## Discussion

Here we found that, in cultured hippocampal neurons, two FTD-linked CHMP2B mutants strongly perturbed the normal pattern of dendritic spine development. Both mutants caused a striking decrease in the proportion of large spines with mushroom morphology, i.e. those associated with potentiated synapses. This outcome was not associated with cell death. In keeping with these results, CHMP2B<sup>Δ10</sup> induced a loss of large mEPSCs, namely those reflecting the activity of the strongest synapses. Consistent with the view that CHMP2B mutants act as dominant negatives, depletion of endogenous CHMP2B by RNAi resulted in changes that were very similar to those induced by mutant CHMP2B, and that could be largely suppressed by coexpression of rescuing protein. Together, these data show that normal spine morphogenesis requires CHMP2B, and that abnormal stoichiometry or pathological dysregulation of the protein can deeply affect the structure and function of spines.

Overexpression of CHMP2B<sup>intron5</sup> in neurons has previously been shown to trigger a specific toxic process, leading to dramatic retraction of dendritic trees followed by cell death after 2–3 days; this lethality has been linked to excessive accumulation of autophagosomes (Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009). However, several lines of evidence indicate that the impairment in spine maturation described here occurs through a mechanism that is distinct from this toxic process. First, the changes in spine morphology were observed in healthy neurons. In particular, expression of CHMP2B<sup>Δ10</sup> or knockdown of endogenous CHMP2B potentially affected spines, even though we found, in agreement with published data, that these perturbations of CHMP2B activity did not diminish neuronal viability. Second, alterations of spines did not correlate with changes in dendritic complexity. CHMP2B<sup>Δ10</sup> elicited no detectable loss of dendritic branching and, in our conditions, CHMP2B<sup>intron5</sup> only induced a 25% decrease in branching rate. This reduction remained modest compared with the 80% shortening of total dendritic length shown to occur in the early phase of CHMP2B<sup>intron5</sup>-induced cell death (Lee et al., 2007). The CHMP2B shRNA caused a reduction in dendritic branching, but this might have been an off-target effect because, unlike the reduction in mushroom spines, it was not suppressed by coexpression of an RNAi-insensitive CHMP2B cDNA (A.B. and Y.G., data not shown). Third, when expressed in hippocampal neurons, neither of the CHMP2B mutants caused a clear-cut increase in LC3–GFP condensation onto autophagosomes. By contrast, a lethal degree of CHMP2B<sup>intron5</sup> overexpression has been shown to induce strong clustering of LC3–GFP; furthermore, preventing autophagosome formation retarded the neuronal death caused by CHMP2B<sup>intron5</sup> (Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009). Beyond some threshold level of expression, the ability of CHMP2B mutants to block the ESCRT-dependent fusion of autophagosomes to lysosomes (Filimonenko et al., 2007; Urwin et al., 2010) might favour the proliferation of toxic autophagosomes. The difference with our results might arise in part from the relatively low level of mutant CHMP2B expression we used in hippocampal neurons. Indeed, with fourfold higher amounts of CHMP2B<sup>intron5</sup> plasmid, leading to higher expression, we observed toxicity similar to that described by Lee et al. (Lee et al., 2007) (although comparison is difficult, because Lee et al. did not mention the amounts of plasmid in their transfection assays). The non-endosomal location of mutant CHMP2B proteins in our experiments also seem at first sight to be at variance with previously published results from other cell types. However, HA-tagged CHMP2B<sup>intron5</sup> did accumulate around endosomes when overexpressed in BHK cells (A. Belly, unpublished data). It should also be noted that, even in heterologous cells, a fraction of CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup> aggregates consistently fail to colocalise with endosomal markers (Skibinski et al., 2005) (A.B., unpublished). In transfected hippocampal neurons, presumably similar non-endosomal aggregates largely predominated. The occurrence of non-endosomal CHMP2B clusters is also consistent with the fact that, in vitro, activated ESCRT-III subunits can form large polymers in the absence of lipids (Lata et al., 2008). Our attempts to identify further components of the mutant CHMP2B clusters have so far been unsuccessful, except for the finding that endogenous CHMP2B is sometimes concentrated in CHMP2B<sup>intron5</sup> granules. This suggests that native CHMP2B can be trapped in polymeric structures together with the mutant. Because much of the endogenous CHMP2B seemed to remain outside of the mutant CHMP2B puncta, sequestering of the native protein in the aggregates is unlikely to explain the apparent

dominant-negative effect of the mutants, especially in the case of CHMP2B<sup>Δ10</sup>. Mutant molecules might instead perturb or displace their native counterparts in supramolecular structures that cannot be detected by simple light microscopy.

The mechanism(s) through which mutant CHMP2B proteins and CHMP2B depletion affect the morphology of spines will require elucidation. Given the endosomal trafficking function of ESCRT-III, one possibility is that disabling CHMP2B interferes with the endocytic recycling of a membrane protein that is crucial for spine growth. Examples of such proteins include the EphB and TrkB receptor tyrosine kinases and the GluR2 subunit of AMPA receptors (Henkemeyer et al., 2003; Passafaro et al., 2003). Of note, perturbation of a neurotrophin receptor such as TrkB would have implications for both spine morphogenesis and long-term survival of specific neurons. Alternatively, spine growth might require direct deformation of the dendritic plasma membrane by CHMP2B-containing ESCRT-III filaments (Hanson et al., 2008; Sweeney et al., 2006), or coupling of the actin cytoskeleton to ESCRT-III (Sevrioukov et al., 2005; Vaccari et al., 2009). Identification of CHMP2B-binding dendritic proteins and observation of ESCRT-III dynamics in live neurons might shed light on these possibilities.

Looking for a functional correlate of the CHMP2B<sup>Δ10</sup> effect, we found that this mutant significantly decreased the frequency of mEPSCs. This result indicates that CHMP2B<sup>Δ10</sup> elicits a decrease in synaptic activity. Moreover, the mutant induced a significant drop (32%) in the proportion of large mEPSCs. The two observations are in keeping with the loss of mature postsynaptic spines. In view of the general correlation between spine size and synaptic potency (Matsuzaki et al., 2001), the change in synaptic properties is consonant with the reduction in the proportion of mushroom spines induced by CHMP2B<sup>Δ10</sup>. This result raises the intriguing possibility that pathogenic CHMP2B mutants might directly prevent synaptic potentiation and/or weaken previously strong synapses, and thereby perturb the functional connectivity of neurons. Further experiments are required to determine the role of CHMP2B and the impact of CHMP2B mutants on activity-dependent changes of spine structure, such as the enlargement associated with long-term potentiation.

Although lethal perturbation of autophagy might explain the loss of cortical neurons at the symptomatic stage of FTD-3 (Lee and Gao, 2009; Urwin et al., 2010), the protracted course of the disease, the lack of toxicity displayed by disease-linked mutants such as CHMP2B<sup>Δ10</sup> and the low level of mutant CHMP2B mRNA in patients' brains lead one to argue that CHMP2B mutants might initially have pathogenic effects other than dysfunctional autophagy leading to cell death. Our results suggest that, in FTD-3, as in Alzheimer's disease, the pathogenic proteins might perturb synaptic plasticity and microstructure, long before overt cell death. A synaptotoxic mechanism would be consistent with observations of synapse loss in FTD (Ferrer, 1999; Lipton et al., 2001), and the widespread abnormalities in spine density and morphology seen in diverse neurodegenerative diseases (Fiala et al., 2002; Wishart et al., 2006). Understanding how defects in the highly conserved CHMP2B protein specifically lead to cortical degeneration might shed light on fundamental mechanisms of normal and pathological neurobiology.

## Materials and Methods

### Plasmids and antibodies

The mCherry plasmid was a kind gift from Pascal Dournaud (INSERM, Paris, France). The LC3-GFP plasmid was a kind gift from Tamotsu Yoshimori (National Institute of Genetics, Mishima, Japan). The GFP plasmid was pEGFP-C1 (Clontech).

The wild-type human CHMP2B cDNA was cloned from HeLa cells by RT-PCR, in frame with an N-terminal dimeric HA tag, using the following primer pair: 5'-CTCTCGAGGCCACCATGTACCCATACGACGTCACGACTACGCTT-ACCCATACGACGTCACGACTACGCTGCGTCCCTCTTCAAGAAGAA-3' and 5'-TACTCGAGCTGCAGTCACTAATCTACTCCTAAAGCCTTGAGT-3'. The CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant cDNA was amplified from the same cDNA preparation, using an alternate rearward primer (5'-TACTCGAGTCACACCTTCCAGAAATTC-AAT-3'). The two cDNAs were subcloned in pcDNA3.1 between the XhoI sites. To obtain the CHMP2B<sup>Δ10</sup> cDNA, the C-terminal part was first synthesised in vitro using megaprimers (5'-ATGCCCAGGATATTGTGAATCAAGTTCTTGATGAAATTG-GAATTGAAATTTCTGGAAAGGTGTTGCACCAACTTCTAGAAGCTTACC-3' and 5'-TAATCTTGAATTGCCATTAGACGCTTCATCTGTGATGTAGACGT-TGTAGTAAAGGTAATGGTAAGCTTCTAGAAGTTGGTGAAC-3') and then fused with the CHMP2B<sup>intron5</sup> cDNA. The cDNAs were subcloned in pcDNA3.1 between the EcoRV and NotI sites. The pSuper-mCherry plasmid was constructed by removing GFP from pSuper-Neo-GFP (Oligoengine) and replacing it with mCherry. The shRNA targeted the rat CHMP2B sequence at positions 578–596 (5'-GACACTACAAACAATGCAG-3') according to Lee et al. (Lee et al., 2007) and the encoding oligonucleotide was cloned between the HindIII and BglII sites of pSuper-mCherry. The RNAi resistant CHMP2B cDNA was generated by introducing four silent mutations in the target sequence (yielding 5'-GACGTTACAGACGATGCAA-3') by means of the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). All plasmids were verified by sequencing (Cogenics, Meylan, France), and initially tested in transfected BHK cells by immunoblotting and immunofluorescence with anti-tag antibody. The following polyclonal antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK): anti-CHMP2B, anti-EEA1, anti-LAMP1. Anti-HA-tag antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), anti-myc-tag antibody from Santa Cruz (CA) and anti-actin antibody from Chemicon.

### Neuronal culture and transfection

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared according to a modification of the procedure described previously (Banker and Goslin, 1998). Handling and sacrifice of animals were in conformity with European law (EEC Directive no. 86/609) and the internal regulations of INSERM. Hippocampi were dissected out from embryonic day 19 (E19) rat embryos, digested with trypsin and hippocampal cells were seeded at a density of 12,000 per cm<sup>2</sup> onto acid-washed glass coverslips (13 mm diameter, Marienfeld, Germany) that had been precoated with 50 µg/ml poly-D-lysine (Sigma). Cultures were maintained in serum-free Neurobasal medium containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml penicillin and streptomycin and 2% B27 supplement (Invitrogen). For transfection, all plasmids were purified using the Endotoxin-free purification kit (Quiagen, Hilden, Germany). Preliminary experiments established that CHMP2B<sup>intron5</sup> toxicity was minimal when transfected at the dose used here. The conditioned culture medium was removed and saved, and coverslips were placed in 2 ml minimal essential medium (MEM; Invitrogen) containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 15 mM HEPES, NaOH (pH 7.35), 0.5 µg CHMP2B plasmid (or control vector) was mixed with 2.5 µg mCherry, GFP or LC3-GFP plasmid, diluted into 250 µl transfection medium and combined with 1.5 µl of 'Plus' reagent and then 4 µl Lipofectamine LTX (Invitrogen). The mixture was incubated for 25 minutes at room temperature (RT), then added to the dishes, which were left to incubate at 37°C for 1 hour. The transfection solution was removed and the conditioned medium was returned to the dishes. A total of 20–60 neurons per coverslip were usually transfected.

### Fixation and immunostaining

The coverslips were rinsed in PBS and incubated for 8 minutes in PBS containing freshly prepared 4% p-formaldehyde and 4% sucrose at RT. After 3–4 washes in PBS, the cells were permeabilised by incubating in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 minutes at RT. After washing, coverslips were pre-incubated in blocking solution [PBS containing 2% goat preimmune serum and 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)] for 1 hour, then in blocking solution containing 0.5–1 µg/ml primary antibody (or antibody mixture) at RT. After washing, incubation with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, 0.2 µg/ml) and final washes, coverslips were gently dried and mounted on slides in Mowiol medium. The specificity of immunofluorescence was routinely verified by staining control cultures that had been transfected with empty pcDNA vector (for anti-tag antibodies) or by omitting the primary antibody in control incubations. The specificity of anti-CHMP2B antibody was further confirmed by RNAi-mediated extinction of immunofluorescence.

### Microscopy

Images of fluorescent neurons were acquired with a Leica SP-E laser scanning confocal microscope equipped with a 100× Leica Neofluar objective with NA 1.3. Laser power was adjusted to maximise the dynamic range of each sample. For dual-colour samples, the adjustable spectral window of fluorescence collection was set for each channel with a singly coloured control sample, so that cross-contamination between channels was avoided. Stacks of 0.2-µm-spaced optical sections were acquired (averaging over four scans per pixel, 512×512 pixels) with the required electronic magnification. For spine analysis, any neuron showing signs of neuritic swellings or retraction was excluded. Dendritic segments located at approximately

equivalent distances from the soma were selected, and each of those was scanned at 1.5× electronic zoom.

### Image analysis

Image files were processed with MetaMorph (Molecular Imaging). All figures show maximal intensity projections. For analysis of spines, serial image files corresponding to z-stacks of 20–30 optical sections per dendritic segment were directly processed with NeuronStudio, a software package specifically designed for spine detection and analysis (Rodriguez et al., 2008; Rodriguez et al., 2006) (<http://www.mssm.edu/cnic/tools.html>). Voxel size was 0.143×0.143×0.200 μm. The fluorescence threshold for inclusion in objects was dynamically set for each local sampling of the dendrite surface by the Isodata segmentation algorithm implemented in NeuronStudio. The seed location for automatic dendrite tracing was typically set near the base of a major proximal dendrite. At bifurcation points, the attach ratio was 1.5 and neurites shorter than 5 μm were not retained. After modelling of the dendrite surface, protrusions with a minimum volume of 5 voxels (0.020 μm<sup>3</sup>), length of between 0.2 μm and 3 μm and a maximal width of 3 μm were retained as spines. Following default settings of the program and the empirical classification rule defined by Rodriguez et al. (Rodriguez et al., 2008), spines with a minimum head diameter of 0.35 μm and minimum head vs neck ratio of 1.1 were classified as mushroom spines. Non-mushroom spines with minimum volume of 10 voxels (0.040 μm<sup>3</sup>) were classified as stubby spines. All other spines were considered thin. The typical percentages of the three spine types that we obtained were close to those found by Rodriguez et al. (Rodriguez et al., 2008). Measurements obtained by NeuronStudio were transferred to a spreadsheet (Excel or Gnumeric) for analysis. Sholl analysis was also performed with NeuronStudio, using single-plane lower magnification views centred on the cell soma. For each neuron, a series of 2-μm-spaced concentric circles centred on the soma were drawn as reference marks, starting with a circle just large enough to enclose the cell body. The total length of neurites within two consecutive circles was measured, and the measurement was repeated for increasingly large circle radii. Stepwise increases in neuritic length were plotted as a function of radial distance from the soma.

### Cell degeneration assay

Neurons were transfected with 0.5 μg CHMP2B plasmid and 2.5 μg mCherry as above. After fixation and mounting onto slides, neurons were observed under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M) with a 63× objective (1.3 NA) and a Rhodamine filter, and scored as dead or alive according to morphological criteria (see Results). The actual presence of coexpressed CHMP2B was verified by immunofluorescent staining with anti-tag antibody, using the GFP filter.

### Electrophysiology

Spontaneous tetrodotoxin-resistant mEPSCs were recorded by means of the whole-cell configuration of the patch clamp method (Hamill et al., 1981). The recording medium contained (in mM): 136 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucose, 0.0005 TTX, 0.025 D-APV, pH 7.4 (NaOH). Patch pipettes were made with the DMZ Universal Pipette puller (Zeitz Instruments, Germany) from thick wall borosilicate glass capillaries (1.5 mm outside diameter × 0.86 mm internal diameter) (Clark Electromedical Instruments, Phymep, France). Filled with a medium consisting of (in mM): 130 Cs-gluconate, 5 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, HEPES, 4 Na<sub>2</sub>-ATP, pH 7.2 (CsOH), they had a resistance of 3–4 MΩ. Glass coverslips were put on the stage of an upright Olympus microscope (BX51WI, Olympus, France) equipped with a water immersion objective lens (20×, N.A. 0.95, Olympus, France). GFP-expressing cells were voltage clamped at a holding potential of -70 mV and the mEPSCs were recorded and then analyzed off-line by means of the pClamp software (Molecular Devices, Dipsi, France). Synaptic currents, filtered at 1 kHz, were sampled at 10 kHz on an Axoclamp 200B amplifier (Molecular Devices, Dipsi, France). The experiments were conducted at RT (20–22°C).

### Western immunoblotting

Neurons were plated in plating medium at a density of 24,000 cells per cm<sup>2</sup> onto 35 mm plastic dishes (Nunc) that had been pre-coated with 50 μg/ml poly-D-lysine, and grown as described for coverslips. Sister dishes were withdrawn at the indicated time points and cells were lysed in lysis buffer containing 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 10 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate (pH 7.5) and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Molecular), and frozen. All lysates from a given culture were loaded on the same 10% SDS-polyacrylamide gel (10 μg total protein per lane) and analysed by electrophoresis and immunoblotting with anti-CHMP2B antibody and anti-actin antibody. Bands were revealed by chemiluminescence (Pierce Femto reagent). Luminographs were scanned (300 dpi, 8-bit scale) and the resulting image files were analysed with MetaMorph. Grey levels measured for CHMP2B bands were normalised to the corresponding actin bands.

### Statistical analysis

The statistical significance of overall variations within sets of conditions was determined by one-way ANOVA. The significance of pair-wise differences between conditions was then assessed by post-hoc one-tailed *t*-tests using the Bonferroni method. Unless indicated otherwise, all the reported *P* values refer to the difference with the control condition. We verified that criteria for robust ANOVA were satisfied;

moreover, Kruskal-Wallis analysis of mean rank variance yielded the same qualitative results as ANOVA. For analysis of mEPSC frequency, the significance of the treatment effect was confirmed by two-way ANOVA on a balanced subset of mEPSCs, separating the effect of plasmid identity from intrinsic neuron-to-neuron variation owing to the variability of innervation in the culture. The significance of differences between multiple frequency distributions was assessed with the  $\chi^2$  test. A post-hoc test of pairwise differences used the Marascuilo procedure (NIST Handbook of statistics, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>). For Sholl analysis, curves were compared by two-way ANOVA, separating the effect of plasmid identity from that of radial distance. Post-hoc comparisons between curves were performed by the Bonferroni method. All calculations were performed with the statistics-oriented spreadsheet Gnumeric (http://projects.gnome.org/gnumeric/) or with OpenStat (<http://statpages.org/miller/openstat/>). All error bars show s.e.m.

A. Belly was supported by the Fondation France Alzheimer. G.B. was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Work was funded by INSERM, Université Joseph Fourier and Fondation France Alzheimer. We thank David Béal for technical assistance, Anne Petiot for advice on autophagy assays, Douglas Ehlenberger for help with NeuronStudio, Tamotsu Yoshimori for the gift of LC3-GFP, Pascal Dournaud for the gift of mCherry, Winfried Weissenhorn for discussions, Jeremy H. Henley for critical reading of the manuscript, two anonymous reviewers for suggestions and all members of the lab for support.

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/123/17/2943/DC1>

### References

- Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszk, D. G., Hill, C. P. and Sundquist, W. I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 754–762.
- Banker, G. and Goslin, K. (1998). *Culturing Nerve Cells*, 2nd edn. MIT Press.
- Boyer, C., Schikorski, T. and Stevens, C. F. (1998). Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J. Neurosci.* **18**, 5294–5300.
- Carlton, J. G. and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908–1912.
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J. D., Briggs, J. A. G., Weissenhorn, W. and Kozlov, M. M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000575.
- Ferrer, I. (1999). Neurons and their dendrites in frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **10**, 55–60.
- Fiala, J. C., Spacek, J. and Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **39**, 29–54.
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H. and Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* **179**, 485–500.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85–100.
- Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y. and Heuser, J. E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* **180**, 389–402.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W. and Ethell, I. M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J. Cell Biol.* **163**, 1313–1326.
- Hurley, J. H. and Emr, S. D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 277–298.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G. and Weissenhorn, W. (2008). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* **321**, 1354–1357.
- Lee, J. A. and Gao, F. B. (2009). Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J. Neurosci.* **29**, 8506–8511.
- Lee, J. A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. and Gao, F. B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* **17**, 1561–1567.
- Lipton, A. M., Cullum, C. M., Satumira, S., Sontag, E., Hynan, L. S., White, C. L., III and Bigio, E. H. (2001). Contribution of asymmetric synapse loss to lateralizing clinical deficits in frontotemporal dementias. *Arch. Neurol.* **58**, 1233–1239.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. and Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 1086–1092.
- Morfini, G. A., Burns, M., Binder, L. I., Kanaan, N. M., LaPointe, N., Bosco, D. A., Brown, R. H., Jr, Brown, H., Tiwari, A., Hayward, L. et al. (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci.* **29**, 12776–12786.
- Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H. and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* **10**, 821–830.

- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. and Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron* **46**, 609-622.
- Passafaro, M., Nakagawa, T., Sala, C. and Sheng, M. (2003). Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* **424**, 677-681.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Hof, P. R. and Wearne, S. L. (2006). Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nat. Protoc.* **1**, 2152-2161.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. and Wearne, S. L. (2008). Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE* **3**, e1997.
- Rusten, T. E. and Simonsen, A. (2008). ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle* **7**, 1166-1172.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E. and Emr, S. D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**, 97-109.
- Sevrioukov, E. A., Moghrabi, N., Kuhn, M. and Kramer, H. (2005). A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in Drosophila. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2301-2312.
- Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T. et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* **37**, 806-808.
- Slagsvold, T., Patti, K., Malerød, L. and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* **16**, 317-326.
- Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S. and Sundquist, W. I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* **449**, 740-744.
- Sweeney, N. T., Brenman, J. E., Jan, Y. N. and Gao, F.-B. (2006). The coiled-coil protein shrub controls neuronal Morphogenesis in Drosophila. *Curr. Biol.* **16**, 1006-1011.
- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J. E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D. S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J. et al. (2010). Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2228-2238.
- Vaccari, T., Rusten, T. E., Menut, L., Nezis, I. P., Brech, A., Stenmark, H. and Bilder, D. (2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in Drosophila by efficient isolation of ESCRT mutants. *J. Cell Sci.* **122**, 2413-2423.
- von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Müller, B., Ward, D. M., Chung, H.-Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G.-P., Cimbara, D. M. et al. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701-713.
- Wei, W., Nguyen, L. N., Kessels, H. W., Hagiwara, H., Sisodia, S. and Malinow, R. (2009). Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat. Neurosci.* **13**, 190-196.
- Wishart, T. M., Parson, S. H. and Gillingwater, T. H. (2006). Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 733-739.
- Wollert, T. and Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-869.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. and Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172-177.
- Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. and Kasai, H. (2008). Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J. Neurosci.* **28**, 13592-13608.
- Zamborini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G. and Gottlinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19140-19145.



***2. Article 2: The ESCRT-III protein CHMP2B is recruited at the plasma membrane and polymerises into hollow tubes protruding from the cell surface.***

Gilles Bodon, Romain Chassefeyres, Karin Pernet-Gallay, Guy Schoen, Agnes Belly, Béatrice Blot, Winfried Weissenhorn, Yves Goldberg and Rémy Sadoul.

*Contexte de l'étude:*

ESCRT-III (Endosomal sorting complex required for transport-III) est un complexe formé de petites protéines solubles (les CHMPs) qui polymérisent de manière transitoire sur la face cytosolique des membranes. Ce complexe est recruté au cou de bourgeons membranaires, et provoque leur fission. Il permet ainsi la genèse de compartiments intracellulaires comme les corps multivésiculés (CMV), et des remodelages de la membrane plasmique requis pour l'accomplissement de la cytokinèse, ou le bourgeonnement de certains virus enveloppés. Une fois la fission accomplie, ce complexe est dépolymérisé par l'action de l'ATPase Vps4.

Le mécanisme par lequel ESCRT-III accomplit la fission de ces membranes est encore inconnu. Le modèle actuel est basé sur l'observation qu'*in vitro* CHMP2A et CHMP3 s'assemblent en une structure tubulaire se terminant par une extrémité en forme de dôme. L'adhésion de la membrane à cet échafaudage moléculaire au niveau du cou du bourgeon serait suffisante pour provoquer la fission de cette dernière. La seule donnée expérimentale suggérant l'existence de tels complexes *in vivo*, provient de la coexpression de CHMP4 avec un dominant négatif de VPS4, provoquant ainsi la formation de structures tubulaires déformant la membrane plasmique. La base de ces tubes est formée de filaments organisés en spirale contenant CHMP4, mais la composition de la partie tubulaire est inconnue.

CHMP2B est le seul composant de ce complexe à avoir été impliqué directement dans des maladies neurodégénératives. Il a été montré que des mutations de cette protéine reliées à ces pathologies affectent le trafic endosomal, et provoque une dérégulation de la machinerie autophagique. Or, chez *Saccharomyces cerevisiae*, son homologue (Vps2) ne semble pas participer à la fission membranaire mais serait simplement en charge du recrutement de l'ATPase Vps4. De plus, aucune structure semblable à celle formée par CHMP2A et CHMP3 n'a encore été observée avec CHMP2B. Il est donc supposé que sa fonction est de recruter VPS4 aux complexes ESCRT-III polymérisés à la surface de ces organelles, et que ces pathologies résulteraient de l'incapacité des mutants pathogènes à accomplir cette tâche. Cependant jusqu'ici, aucune étude ne traite de la place et du rôle de CHMP2B au sein de ce complexe.

*Résultats :*

La surexpression de CHMP2B provoque l'apparition des tubulations de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire. L'analyse par microscopie électronique de ces derniers montre la polymérisation de CHMP2B en une structure tubulaire sous-jacente à la membrane plasmique, qui présente des striations perpendiculaires à l'axe du tube. Cette texture révèle ainsi que ces assemblages sont formés d'un ou plusieurs filaments protéiques qui s'enroulent régulièrement en une hélice creuse similaire à celle formée par CHMP2A et CHMP3 *in vitro*. Cette structure présente une rigidité intrinsèque et une affinité avec la membrane qui lui permettent d'imposer de fortes courbures à cette dernière.

Ces déformations sont observées exclusivement à la membrane plasmique, ce qui est surprenant au regard de la littérature concernant CHMP2B. L'accumulation de complexes contenant CHMP2B à la surface de la cellule et provoquée par la suppression de VPS4A et B par SiRNA, démontre l'existence de complexes éphémères contenant CHMP2B polymérisant à la membrane plasmique, et dont la dissociation est assurée par VPS4.

Aucune expression des autres composants du complexe ESCRT-III testés (CHMP2A, CHMP3, CHMP4 A, B, C) ne provoque le même phénomène, ce qui suggère une propriété particulière de CHMP2B. D'autre part, aucun d'entre eux ne semble recruté dans ces tubes, ce qui sous-entend qu'ils ne participent pas à leur structure. Cependant CHMP4A endogène s'accumule à la base du tube, et pourrait participer à son élaboration.

#### *Conclusions :*

Ce travail démontre pour la première fois que CHMP2B peut participer à la formation d'assemblages supramoléculaires capables d'imposer de fortes courbures aux membranes biologiques. Il est aussi le premier à suggérer un rôle spécifique et direct de cette protéine dans le remodelage de la membrane plasmique.



Classification: BIOLOGICAL SCIENCES; Cell biology.

**The FTD-linked ESCRT-III protein CHMP2B polymerizes into tightly packed helical structures deforming the plasma membrane.**

Gilles Bodon<sup>1,3</sup>, Romain Chassefeyre<sup>1,3</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>2,3</sup>, Grégory Effantin<sup>4</sup>, Nicolas Martinelli<sup>3,4</sup>, Agnes Belly<sup>1,3</sup>, Béatrice Blot<sup>1,3</sup>, Winfried Weissenhorn<sup>3,4</sup>, Guy Schoehn<sup>4,5</sup>, Yves Goldberg<sup>1,3</sup> and Rémy Sadoul<sup>1,3</sup>.

*1 INSERM, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, F-38042,*

*France*

*2 INSERM, U836, Plateforme de microscopie, F-38042, France*

*3 Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France*

*4 Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-Grenoble, F-38042, France*

*5 Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, Grenoble F-38027 France*

*Corresponding author : Rémy Sadoul, Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F- 38042 Grenoble, France. Phone: +33 456 520 544. Fax: +33 456 520 554*

**Keywords:** ESCRT, Frontotemporal dementia, membrane remodeling, curvature, VPS4.

**Abstract:**

The endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) is composed of charged multivesicular body proteins (CHMPs). These cytosolic proteins are recruited to membranes and catalyze membrane fission during endosome biogenesis, budding of enveloped viruses and cytokinesis. The CHMP2B isoform stands out in that mutations within its C-terminus have been associated with frontotemporal dementia (FTD). Here we show that, unlike other CHMPs, CHMP2B is recruited at the plasma membrane where it polymerizes into long rigid tubes that protrude out of the cell. Depletion of VPS4, an ATPase regulating ESCRT-III polymerisation, induces specific accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane. Immuno-EM and Cryo-EM of the CHMP2B structures confirm the presence of CHMP2B in a tightly packed helical lattice lining the membrane. Our data thus demonstrate that CHMP2B can serve as a scaffold to shape the plasma membrane *in vivo*, a specialized function which might be connected to the genetic linkage of CHMP2B and FTD.

## Introduction

Endocytosed proteins selected for degradation are entrapped inside vesicles budding from the limiting membranes of endosomes into their lumen. Fusion of endosomes with lysosomes assures degradation of the intraluminal vesicles and their cargoes by lysosomal hydrolases. Studies in yeast have revealed that protein complexes called ESCRTs (Endosome Sorting Complexes Required for Transport) play a pivotal role in intraluminal vesicle budding (1-3). ESCRTs are also involved in the egress of a few enveloped viruses (4-7) and during cell division (8-10).

Noteworthy is the particularity of ESCRT complexes to induce membrane vesiculation with a topology that is inverted compared to coated vesicles budding from a donor membrane which are released into the cytosol. Four ESCRT complexes have been characterized so far: ESCRT-0, -I, -II, -III. ESCRTs 0, I and II are recruited to membranes as complexes (11). In contrast the subunits of ESCRT-III, called charged multivesicular body proteins (CHMPs) assemble transiently at membranes and require the AAA-ATPase VPS4 for disassembly and recycling (12-15). *In vitro* experiments using Giant Unilamellar Vesicles indicate that ESCRT-III members constitute the minimal fission machinery (16, 17).

Yeast ESCRT-III is composed of 7 isoforms while mammals have 12 members with up to 3 homologs of each yeast protein. ESCRT-III proteins are small helical assemblies, autoinhibited in the cytosol and becoming activated upon membrane interaction (13, 18-22). One common theme between CHMP proteins is their capacity to polymerize *in vitro*. CHMP1A polymerizes into large tubes, IST1 assembles into curled sheets (20) while CHMP4B associates into arrays of loose circular filaments (23). In contrast, CHMP3 and CHMP2A polymerize into helical tubular structures closed at one end by a dome (13, 20). Interaction of the dome with the lipid bilayer at the neck of budding vesicles has been proposed to induce high membrane curvature allowing membrane fission (24). However little direct evidence exists so far revealing how ESCRT-III complexes scaffold membrane deformation *in vivo*.

The implication of ESCRT proteins in enveloped virus egress and the final abscission step of cytokinesis suggest a genuine role at the plasma membrane. Recently, overexpressed human CHMP4 proteins were reported to be recruited to the plasma membrane where they assemble into circular arrays of filaments. Co-expression of an ATPase dead version of VPS4B led to the formation of tubular plasma membrane protrusions (25).

Among the ESCRT-III subunits, CHMP2B has received particular attention following the discovery that mutations in the *CHMP2B* gene underlie a dominantly heritable form of frontotemporal

dementia (called FTD-3) (26). The single point mutation at the splice acceptor site of CHMP2B exon 6, generates two distinct aberrant transcripts, CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>Δ10</sup>, both of which encode proteins with a defective C-terminus. Impairments of endosomal traffic and autophagy caused by expression of mutated CHMP2B has been put forward to explain the selective degeneration of cortical neurons signing the presenile dementia (27-31). We have recently discovered that CHMP2B affects the morphogenesis of dendritic spines (32), small membrane protrusions corresponding to post-synaptic elements of excitatory synapses. Expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> decreased the number of the biggest spines which correspond to the most efficient synapses, while increasing the number of thin spines. Similar effects could be seen upon downregulation of CHMP2B. Thus, the pathogeny of CHMP2B mutants might come, at least in part, from a direct role of CHMP2B on membrane deformation into dendritic spines. In the protracted course of FTD, CHMP2B mutations could affect synaptic homeostasis and plasticity long before inducing massive neuronal death.

Here we report that overexpressed CHMP2B is recruited to the plasma membrane, where it forms long protrusions. This property is specific for CHMP2B since CHMP2A, CHMP3 or CHMP4 isoforms do not induce such plasma membrane deformation. Furthermore none of the latter proteins colocalize with CHMP2B inside tubes. Binding of the ATPase VPS4 to the C-terminal MIM domain of CHMP2B regulates its capacity to make membrane protrusions. Immunofluorescence and cryo-EM analysis demonstrate that the tubes are lined by a tightly packed helical CHMP2B polymer. The CHMP2B protein lattice is intimately associated with the inner leaflet of the bilayer and imposes membrane constriction, indicating for the first time how a CHMP protein lattice can induce membrane constriction *in vivo* as postulated. Downregulating VPS4 leads to accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane demonstrating its presence in ESCRT-III complexes formed transiently at the membrane. This indicates that endogenous CHMP2B has a specific role at the plasma membrane such as membrane remodeling, which is under the control of VPS4.

## Results

### **Expression of wild type CHMP2B induces cell surface protrusions.**

Immunostaining of HeLa cells revealed the homogenous cytoplasmic expression of endogenous CHMP2B (Fig. 1A). Similarly, overexpressed CHMP2B was homogeneously distributed throughout the cytoplasm. However, in 10 % of cells, the cytoplasmic staining was partially or entirely lost and CHMP2B was relocated to the plasma membranes producing long protrusions pointing out into the culture medium (Fig1A and C). Some protrusions had a length of up to several tens of microns. Fusion of a Flag peptide to the C-terminal part of CHMP2B increased the capacity of the protein to assemble into surface protrusions, which were detected in about 40% of CHMP2B-Flag positive cells (Fig. 1A and 1C). Projection in the x-z plane (Fig. 1A) and 3D reconstruction (S1 and S2 videos) of cells expressing CHMP2B or CHMP2B-Flag, show that the tubes protrude on the sides and above the cell and are rarely attached to the cell culture substrate. In some cases however, CHMP2B protrusions detached from the cell surface and were observed on the substrate.

Expression of CHMP2B also induced the formation of tubes in HEK 293T cells. Strikingly these tubes were often longer than those seen in HeLa cells (Fig. S1). CHMP2B expressed in post-mitotic neurons also deformed the membrane into protrusions in which it accumulates (Fig. S1). This demonstrates that CHMP2B protrusions do not result from cell retraction occurring during cell migration or division.

### **The N-terminal end of CHMP2B is required to deform the plasma membrane.**

In contrast to CHMP2B-Flag and wild-type CHMP2B, N-terminally-Flag-tagged CHMP2B (Flag-CHMP2B) remained cytoplasmic and failed to induce growth of surface protrusions (Fig. 1B and C). Similarly other tags fused to the N-terminus (Myc, mcherry, HA) also blocked the capacity of CHMP2B to induce membrane tubulation (not shown). Western blot analysis showed similar levels of expression of CHMP2B, Flag-CHMP2B or CHMP2B-Flag (Fig. S2), demonstrating that the inability of N-terminally tagged versions of CHMP2B to induce tubule formation is not due to differences in their expression level.

Based on these observations, we reasoned that the N-terminal part of the protein might be crucial for deforming membranes. The CHMP2B N-terminal 8 amino-acids are conserved throughout the CHMP family. In particular Leu4 and Phe5 of CHMP2B, followed by a cluster of positively charged residues (Lys and Arg) are conserved within all CHMPs (Fig. S3B). Expression of the double mutant

L4D and F5D (CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag) did not deform the plasma membrane into protrusions (Fig. 1B and C). In order to test whether these mutations affect membrane binding, a liposome flotation assay was employed using purified recombinant CHMP2B and CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>. The presence of CHMP2B in the upper fractions demonstrated the capacity of the protein to interact with liposomes (Fig. 1D). In contrast, most CHMP2B<sup>L4DF5D</sup> stayed in the bottom fraction demonstrating that the L4D and F5D mutation impairs CHMP2B lipid bilayer interaction *in vitro*. These data confirm the requirement of an intact N-terminus for CHMP2B function.

### **The ESCRT-III core complex members CHMP2A, CHMP3, and CHMP4A, B, C, do not induce plasma membrane tubulation.**

Because formation of CHMP2B cell protrusions depended on an intact N-terminus, we re-examined the expression of C-terminally Flag-tagged CHMP2A, CHMP3 and the CHMP4A, B and C isoforms. None of them induced membrane protrusions when expressed alone (Fig. S4). Although CHMP2A and CHMP3 polymerize into tubes *in vitro*, no such structures could be observed *in vivo* upon co-expression of CHMP2A-Flag and CHMP3-Flag (Fig. S5A).

We next tested whether other members of the ESCRT-III core complex polymerize with CHMP2B inside protrusions. In order to restrain possible interference with CHMP2B polymerization, we cotransfected minute amount of C-terminally-Flag-tagged CHMP proteins together with CHMP2B. CHMP2A, 3, 4A, 4B, 4C were absent from CHMP2B-containing protrusions (Fig. S5B). Except for CHMP3, all proteins were often concentrated at the base of CHMP2B protrusions. Endogenous CHMP4A was also recruited at the base of CHMP2B protrusions (Fig. 2A and video S3). The lack of antibodies recognising *in vivo* the other isoforms did not allow us to test for their possible recruitment. Noteworthy very few cells coexpressing CHMP4 isoforms and CHMP2B displayed protrusions. Increase of the CHMP4 expression levels completely abolished CHMP2B protrusions and led relocalization of CHMP2B to CHMP4-containing structures (Fig. 2B). In contrast, neither CHMP2A nor CHMP3 abolished formation of CHMP2B protrusions. These observations thus suggest that CHMP4 isoforms regulate CHMP2B's capacity to polymerize and deform the plasma membrane.

### **CHMP2B membrane tube formation is regulated by VPS4.**

The C-terminal MIM domain of CHMP2B recruits the ATPase VPS4. Accordingly we found that GFP-VPS4B decorated the entire length of CHMP2B containing protrusions (Fig. 3A). In contrast the ubiquitin hydrolase GFP-AMSH specific for MIMs of CHMP1A, B, 2A and 3 (19, 33) was absent from

CHMP2B protrusions (Fig. S6).

We next tested whether VPS4 binding to CHMP2B is necessary for its membrane tubulating activity. Here we used a CHMP2B double mutation L207D and L210D (CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag) which impairs VPS4B recruitment (34) (Fig. S3A). CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag did not co-localize with GFP-VPS4B demonstrating its inability to bind the ATPase (Fig. 3B). Unexpectedly, although CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag accumulated at the plasma membrane of all transfected cells, it almost never induced tube formation. This observation suggests that VPS4 is required for the formation or integrity of CHMP2B tubes. However, the FTD-linked CHMP2B mutant (CHMP2B<sup>intron5</sup>) lacking the MIM domain formed patches at the plasma membrane like CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag but nevertheless polymerized efficiently into membrane tubes (Fig. 3B). GFP-VPS4B was not detected inside tubes made of CHMP2B<sup>intron5</sup>-Flag. Therefore, VPS4 regulates CHMP2B tubulating activity but is not necessary to maintain the structure of the protrusions. This was further supported by the fact that co-expressing VPS4B-DN with CHMP2B, strikingly increased the number of cells making tubes compared to cells expressing CHMP2B only (Fig. S6B).

The capacity of CHMP2B, but not of related CHMPs, to make tubes implies that the endogenous protein plays a specific role to scaffold the plasma membrane. In order to show that this is indeed the case, we knocked-down VPS4A and VPS4B known to impair the dissociation of endogenously formed ESCRT-III complexes (Fig. S7). This resulted in a striking relocalization of endogenous CHMP2B from the cytoplasm to the plasma membrane (Fig. 4A). In contrast CHMP4A relocalizes mainly inside cytoplasmic patches (Fig. 4B). This suggests that VPS4 is required to dissociate plasma membrane based ESCRT-III complexes containing CHMP2B and thus intimately controls ESCRT-III activity at the plasma membrane.

### **Relationship between CHMP2B and actors of membrane deformation**

Classically, actin and tubulin underlie plasma membrane protrusions. No immunostaining of  $\beta$ -tubulin was detected inside CHMP2B tubes (Fig. S8A). Absence of microtubules inside CHMP2B protrusions was also obvious from the electron-microscopy data (see below). Thus CHMP2B-induced protrusions are not related to microvilli or other protrusions made by microtubules.

Phalloidin sometimes revealed the presence of F-actin filling the base of CHMP2B protrusions (Fig. S8A). In HEK cells staining could even be detected in the entire CHMP2B processes (not shown). This shows that F-actin can sometimes be inserted in CHMP2B protrusions but is not necessary to keep them intact. The lack of a structural role of actin for maintaining CHMP2B protrusions was confirmed

by the fact that neither latrunculin (not shown) nor cytochalasin D, which dramatically disrupted the actin cytoskeleton, affected their integrity (Fig. S8B). Our observations thus demonstrate that CHMP2B assembly can scaffold plasma membrane tubes independently of actin and tubulin.

### **Electron microscopy characterization of CHMP2B membrane tubes.**

Immunoelectron microscopy demonstrated the presence of CHMP2B inside a continuous, tubular, electron dense structure covered by a single membrane (Fig. 5A and B). Immunolabeling with anti-CHMP4A confirmed its restriction to the base of the membrane tube (Fig 5C). Because CHMP2B protrusions are often found shed from HeLa cells, we collected them from the culture medium of CHMP2B expressing cells. After low speed centrifugation, membranes were pelleted at 30 000g (P1). P1 pellets were solubilized in 1% Triton X-100 and centrifuged at 20 000 g (P2 and S2). Western blot analysis demonstrated the presence of large amounts of CHMP2B in the P1 pellets, the vast majority remaining insoluble in Triton-X100 (Fig. S9A). This is in good agreement with the known resistance of ESCRT-III complexes to non-ionic detergents. In contrast to CHMP2B or CHMP2B-Flag, CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag, which does not make tubes, could not be recovered in P1 or P2 pellets.

EM examination of P1 pellets negatively stained with uranyl acetate demonstrated the presence of numerous rigid tubes surrounded by plasma membrane. Their diameter ranged from 70 to 350 nm. No such tubes could be seen in similar supernatants of untransfected cells (not shown). Immunogold labeling with an anti-CHMP2B antibody revealed the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes (Fig. S9B). Striations of CHMP2B tubes could sometimes be detected (Fig. S9C).

### **Cryo-EM observation reveals CHMP2B polymerized into a tightly packed helical structure.**

We next observed CHMP2B tubes using cryo-EM to better characterize their structure (Fig. 6 and S10). The diameter of the tubes ranged from 100 to 400 nm. Here again regular striations perpendicular to the longitudinal axis of the tube could be revealed. The hollow nature of the tubes was demonstrated as they were sometimes filled with small vesicles (Fig. 6A). This arrangement is reminiscent of that of tubes formed *in vitro* by polymers of recombinant CHMP3 and CHMP2A (13, 20). In this latter case, striations were shown to reflect assembly of the proteins into helical structures with a 32 Å pitch. Regardless of the diameter of the tubes, the regular striations of CHMP2B tubes were regular and spaced by a 32 Å gap as determined by Fourier transform of the images. Noteworthy was the tight link of the CHMP2B protein lattice with the internal leaflet of the

membrane derived from the plasma membrane. In some cases one portion of the tube was constricted revealing the same lateral striation (Fig. 6B). Also remarkable was the fact that the striation was always perpendicular to the lipid bilayer. Sometimes tubes had a succession of uniform segments with different diameters (Fig. S10B). In all cases, the outer surface of the tube remained tightly attached to and deformed the lipid bilayer. These analyses show that CHMP2B assembles into a helical polymer to deform the membrane into tubes with variable diameters.

## Discussion

CHMP proteins have repeatedly been shown to polymerize *in vitro* into well defined supramolecular structures (13, 20, 23). However the arrangements and localization of such structures in cells remains unclear. Here we show that CHMP2B expression is sufficient to induce the formation of membrane tubes protruding from the cell surface. CHMP2B is the first ESCRT-III protein that can induce such massive plasma membrane remodeling without co-expression of other ESCRT-III partners. Although CHMP4 has been previously shown to form spiral structures accumulating at the plasma membrane, membrane remodeling into tubular structures was only observed in presence of catalytically inactive VPS4 (25). Furthermore the length of CHMP2B tubes reaches hitherto unreported values.

Our cryo-EM data demonstrate the presence of a protein lattice in close association with the inner leaflet of the tube membrane. Immunogold labeling indicates that the protein lattice is made of CHMP2B, confirming the immunofluorescence staining of CHMP2B along the entire length of cellular membrane tubes. In contrast other members of the ESCRT-III core complex were absent from the membrane tubes. The CHMP2B protein lattice present in the tubes displays a lateral striation that is produced by helical symmetry. The pitch of the helix was determined to be 32 Å, the same as the helical pitch of CHMP2A/CHMP3 tubular structures assembled *in vitro* in the absence of membranes (13). This 32 Å pitch could reflect the width of the filament winding into a helix. CHMP4 filaments observed *in vitro* and *in vivo* were consistently reported to be ~30 Å wide (23, 25). It is thus conceivable that all four ESCRT-III proteins follow the same structural principle for polymer assembly.

Membrane deformation into tubes by CHMP2B polymers might follow the biophysical principle of membrane buckling proposed for ESCRT-III polymer assembly (35). The high membrane curvature imposed by the helical lattice at its smallest diameter (10 nm) implies sufficient rigidity of the latter together with high affinity to the inner leaflet to overcome the membrane bending energy. By analogy to the CHMP2A/CHMP3 tubes, the N-terminal part of CHMP2B should point out of the helical lattice and could influence interactions with the membrane. Accordingly, the capacity of CHMP2B to make cell protrusions and to bind to membranes *in vitro* depends on an intact N-terminal end suggesting that this domain participates in the regulation of the interaction between the lattice and the inner membrane leaflet.

Shedding of CHMP2B membrane tubes suggest that they can be released from cells through fission. Cryo EM revealed tube constriction down to a diameter of 10 nm as well as membrane covered domes closing one end. These profiles might be the first to illustrate different steps of the

membrane fission process following the same principle as postulated for CHMP2A/CHMP3 polymers (24).

Even if CHMP proteins vary extensively in their primary sequence, they share a common folded structure with an N-terminal basic domain interacting with the C-terminal acidic regulatory domain. Because CHMPs are cytosolic, they require an activation step to polymerize on membranes (13, 18-20) Lata, 2008 #77; Shim, 2007 #102}. The autoinhibition is thought to be relieved by displacement of the C-terminal region from the N-terminal core, which subsequently permits polymerization at membranes. The fact that wild type CHMP2B is able to form tubes indicates that the protein needs to be activated prior to polymerization at the plasma membrane. The AAA-ATPase VPS4 could be part of this activation through binding to the C-terminal MIM domain of CHMP2B, thus releasing auto-inhibition. A similar mechanism has already been described for activation of CHMP3 by AMSH (19). Indeed mutations in the VPS4 binding site of CHMP2B prevent membrane tube formation. Furthermore, co-expression with catalytically inactive VPS4B increases the propensity of CHMP2B to polymerize into tubes. However, CHMP2B<sup>intron5</sup> is deleted of its VPS4 binding but still induces tube formation. In this case, the lack of VPS4 binding could be overcome by the absence of the C-terminal  $\alpha 6$  helix thus rendering the protein constitutively active.

On the other hand, the ATPase activity of VPS4 is known to regulate the dissociation of ESCRT-III complexes (12, 14, 15). Accordingly downregulation of VPS4A and B revealed the accumulation of cytoplasmic CHMP4A-containing ESCRT-III complexes. In contrast, the same downregulation led to preferential accumulation of endogenous CHMP2B in plasma membrane patches. This reveals that ESCRT-III complexes forming transiently at the plasma membrane are major sites of CHMP2B polymerization. Altogether our results suggest that VPS4 plays a dual regulatory role: binding to CHMP2B would structurally favor polymerization into tubes, whereas its ATPase activity depolymerizes plasma membrane ESCRT-III complexes. CHMP2B<sup>intron5</sup> polymerization would escape control by VPS4 potentially contributing to its pathogenic activity.

We have not yet been able to characterize the composition of plasma membrane based ESCRT-III complexes. Indeed none of the CHMPs tested so far copolymerized with CHMP2B inside tubes, although they all tended to concentrate at their base. However, only CHMP4 isoforms had a drastic effect in blocking CHMP2B tubulating activity corroborating their regulatory role in this process.

Recruitment of endogenous CHMP2B at the plasma membrane indicates that the propensity of CHMP2B to deform the cell membrane is of physiological relevance. A growing body of literature indicates that vesicles are directly shed from the cell surface, but the molecular mechanisms allowing this type of secretion remain unclear (36, 37). It is tempting to speculate that CHMP2B can be

recruited into the neck of plasma membrane buds, thereby allowing such vesicle release. Massive increase in the cytoplasmic concentration of CHMP2B could displace the equilibrium towards polymerization at these budding sites thereby leading to membrane protrusions.

Another possibility is that CHMP2B participates in the first steps of the deformation into tubular structures such as filipodia. These are highly dynamic spikes or needle like protrusions containing bundled actin filaments. Depolymerization of F-actin had no effect on the stability of preformed tubes in agreement with the apparent lack of the protein inside CHMP2B tubes made by HeLa cells. Even if F-actin is not obligatory to keep CHMP2B tubes intact, the protein is detected inside the very long tubes protruding from HEK cells. Furthermore, we observed a massive reorganization of F-actin into patches in some CHMP2B-overexpressing cells, suggesting a possible link between the proteins (unpublished observations). Thus, as in the case of IRSp53 (Insulin Receptor Tyrosine kinase Substrate p53) (38, 39), scaffolds of CHMP2B polymers could deform the membrane into buds recruiting F-actin to allow filipodia growth. In this scenario, tubes would represent abnormal extensions of these buds. Similarly to CHMP2B, overexpressed IRSp53 has been reported to polymerize into static membrane protrusions lacking actin. Another common point between both proteins is their capacity to regulate dendritic spine morphogenesis which tightly depends on actin organization (32, 40). Further work is now needed to test a possible role of CHMP2B in directing actin based protrusions or vesiculation at the plasma membrane.

Even though membrane recruitment of, and deformation by CHMP2B were easily observed in the present experiments, this property has escaped detection in previous studies. This can be explained by the fact that all the other studies used tagging of the protein at the N-terminus which clearly abolishes its capacity to form plasma membrane tubes. The pathogeny of CHMP2B mutations in FTD was therefore only proposed to arise from effects on endosomal trafficking and autophagy (27-31). Consistent with the loss of the regulatory domain, mutated CHMP2Bs were reported to form insoluble polymers, often coating endosomes, and to cause dominant-negative inhibition of ESCRT-dependent processes including autophagosome maturation. In the light of our previous demonstration that CHMP2B takes part in dendritic spine morphogenesis (32), our present work showing the capacity of the protein to deform plasma membranes opens completely new avenues towards the comprehension of FTD mechanisms linked to CHMP2B mutations.

## Material and Methods

*SI Material and Methods provides additional experimental detail.*

- **HeLa cells transfections:** Cells were transfected with using the jetPEI transfection reagent (Polyplus). SiRNA (100-nM) were transfected using the Oligofectamine reagent (Invitrogen).

- **Immunofluorescence.**

HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde. After permeabilisation with Triton X-100, cells were stained with the indicated antibodies or reagents.

- **CHMP2B tube purification.**

Culture media were cleared of debris and centrifuged at 30 000g. Pellets (P1) was resuspended in HEPES buffer saline and analyzed by EM.

- **Electron microscopy.**

Cells were fixed (2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde) and embedded in 10% gelatine. Ultrathin cryosections were stained with the indicated antibodies and revealed with protein A-gold conjugate (CMC, Utrecht). Cryosections were analysed using a 1200EX JEOL TEM microscope.

P1 pellets loaded on a grid were rapidly plunged into liquid ethane. Samples were observed using a FEI Tecnai Polara electron microscope.

## Acknowledgments:

G. B. and R.C. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, G.B. and A.B. by the Fondation France Alzheimer, N.M. by the région Rhône-Alpes (Cluster 10 infectiologie), G.E. by the Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work was funded by INSERM, CNRS, Université Joseph Fourier, Fondation France Alzheimer and ANR (08-Blanc-0271 to W.W. R.S. and G.S.), we acknowledge the support by the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB) and the GIS-IBISA platform for access to the Polara microscope. We thank W.I. Sundquist and S. Urbé for generous gift of reagents, D. Béal for technical assistance, F. Hemming for critical reading of the manuscript and all members of the lab for helpful suggestions.

## References

1. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, & Emr SD (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3(2):283-289.
2. Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, & Emr SD (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3(2):271-282.
3. Katzmann DJ, Babst M, & Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106(2):145-155.
4. Demirov DG & Freed EO (2004) Retrovirus budding. *Virus Res* 106(2):87-102.
5. Morita E & Sundquist WI (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:395-425.
6. Bieniasz PD (2009) The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5(6):550-558.
7. Martin-Serrano J, Zang T, & Bieniasz PD (2003) Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* 77(8):4794-4804.
8. Carlton JG & Martin-Serrano J (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316(5833):1908-1912.
9. Morita E, *et al.* (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(29):12889-12894.
10. Morita E, *et al.* (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26(19):4215-4227.
11. Hurley JH (2010) The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* .
12. Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, & Hanson PI (2005) Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem* 280(13):12799-12809.
13. Lata S, *et al.* (2008) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321(5894):1354-1357.
14. Babst M, Sato TK, Banta LM, & Emr SD (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J* 16(8):1820-1831.
15. Babst M, Wendland B, Estepa EJ, & Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* 17(11):2982-2993.
16. Wollert T & Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290):864-869.
17. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, & Hurley JH (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458(7235):172-177.
18. Muziol T, *et al.* (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 10(6):821-830.
19. Zamborlini A, *et al.* (2006) Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50):19140-19145.
20. Bajorek M, *et al.* (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 16(7):754-762.
21. Lata S, *et al.* (2008) Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol* 378(4):818-827.
22. Shim S, Kimpler LA, & Hanson PI (2007) Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8(8):1068-1079.
23. Pires R, *et al.* (2009) A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17(6):843-856.
24. Fabrikant G, *et al.* (2009) Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 5(11):e1000575.

25. Hanson PI, Roth R, Lin Y, & Heuser JE (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* 180(2):389-402.
26. Skibinski G, *et al.* (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37(8):806-808.
27. Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, & Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17(18):1561-1567.
28. Lee JA, Liu L, & Gao FB (2009) Autophagy defects contribute to neurodegeneration induced by dysfunctional ESCRT-III. *Autophagy* 5(7):1070-1072.
29. Urwin H, *et al.* (2010) Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet* 19(11):2228-2238.
30. Lee JA & Gao FB (2009) Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J Neurosci* 29(26):8506-8511.
31. Filimonenko M, *et al.* (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179(3):485-500.
32. Belly A, *et al.* (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci* 123(Pt 17):2943-2954.
33. Agromayor M & Martin-Serrano J (2006) Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J Biol Chem* 281(32):23083-23091.
34. Stuchell-Brereton MD, *et al.* (2007) ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449(7163):740-744.
35. Lenz M, Crow DJ, & Joanny JF (2009) Membrane buckling induced by curved filaments. *Phys Rev Lett* 103(3):038101.
36. Cocucci E, Racchetti G, & Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19(2):43-51.
37. Muralidharan-Chari V, *et al.* (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19(22):1875-1885.
38. Mattila PK, *et al.* (2007) Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 176(7):953-964.
39. Millard TH, *et al.* (2005) Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J* 24(2):240-250.
40. Choi J, *et al.* (2005) Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci* 25(4):869-879.

## Figure Legends

**Figure 1: Overexpression of CHMP2B or CHMP2B-Flag induce formation of long cell surface protrusions in which they concentrate.** HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and immunostained (A,B,C) 36 h later. Except otherwise stated, photographs presented in all figures are maximal intensity projections of confocal image stacks. In each case the bottom panel represents projections in the x-z plane. Bars: 20  $\mu\text{m}$ . (A) Immunostaining of non-transfected HeLa cells with anti-CHMP2B reveals a homogenous cytoplasmic localization of the protein. Overexpression of CHMP2B and CHMP2B-Flag induces the formation of cell surface protrusions, in which CHMP2B concentrates. Note the absence of cytoplasmic staining in tube forming cells. (B) Flag-CHMP2B and CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag do not induce surface protrusions. (C) Percentage of transfected cells displaying tubes as revealed with anti-CHMP2B antibodies. For each condition 200 CHMP2B expressing cells were counted. Data from 3 independent experiments are plotted. Standard error bars are shown. (D) Flotation experiments demonstrate that mutations in L4-F5 impair the capacity of CHMP2B to associate with membranes *in vitro*. Purified recombinant full length CHMP2B and CHMP2B<sup>L4DF5D</sup> were mixed with DOPC/ SOPC liposomes. Liposomes were analysed sucrose gradient centrifugation, fractions run on SDS-PAGE and proteins revealed by Coomassie staining.

**Figure 2: CHMP4 affects CHMP2B protrusions.** (A) In cells expressing CHMP2B-Flag only, immunostaining with anti-CHMP4A antibodies reveals the relocalization of endogenous CHMP4A at the base of CHMP2B tubes. Bottom panel shows projection in the x-z plane. In all cases, HeLa cells were transfected with indicated plasmids and immunostained 36h later. (B) CHMP4A or CHMP4B, co-expressed with similar amounts of CHMP2B, block the capacity of CHMP2B to form protrusions. Note the relocalization of CHMP2B inside CHMP4A or CHMP4B patches. Bars: 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3: VPS4 relocates inside CHMP2B protrusions.** (A) GFP-VPS4 is homogeneously distributed in the cytoplasm of transfected cells. In cells expressing both GFP-VPS4B and CHMP2B, the ATPase is present inside CHMP2B tubes. (B) CHMP2B<sup>L207D-L210D</sup>-Flag, mutated in the MIM domain, accumulates in plasma membrane patches but does not induce protrusions. CHMP2B<sup>intron5</sup>, which lacks the C-terminal  $\alpha 6$  helix containing the MIM domain, both accumulates inside plasma membrane patches and forms everted tubes. GFP-VPS4 is neither recruited inside CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag patches nor inside CHMP2B<sup>intron5</sup>-Flag containing tubes. HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and observed 36h later. Bars: 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4: VPS4A and B downregulation induces accumulation of endogenous CHMP2B.** HeLa cells were depleted of VPS4A and VPS4B using a mixture of SiRNA against both proteins. Control cells were transfected with an irrelevant SiRNA. Alexa594-Wheat Germ Agglutinin (WGA) staining was used to delineate membranes. (A) Confocal sections of control cells or cells depleted of VPS4 immunostained with anti-CHMP2B antibody. (B) Confocal sections of control cells or cells depleted of VPS4 demonstrate the relocalization of CHMP4A in intracellular patches.

**Figure 5: Immunogold staining of sections of HeLa cells expressing CHMP2B-Flag reveals the presence of the protein in an electron dense tubular lattice covered with plasma membrane.** (A and B) A hollow electron dense structure underlying membrane tubes is

immunolabeled by anti-FLAG. Immunostaining is concentrated on the internal side of the tubules. (C) Double immunogold labeling with anti FLAG for CHMP2B detection (10nm, arrow heads) and with anti CHMP4A (15nm, white arrows) reveals that CHMP4A labeling is restricted at the base of the tube. Bars: 200 nm.

**Figure 6: Cryo EM examination of tubes purified from culture media of CHMP2B expressing cells:** (A) Striations perpendicular to the longitudinal axis can be seen from edge to edge of the tube. Asterisk indicates a 50 nm vesicle inside the tube. (B) Constriction of a tube with no change in the helix pitch. (C) Dome closing one end of the tube. All cases demonstrate close association of the membrane with the CHMP2B protein lattice. Bars: 50nm.

Figures

Figure 1

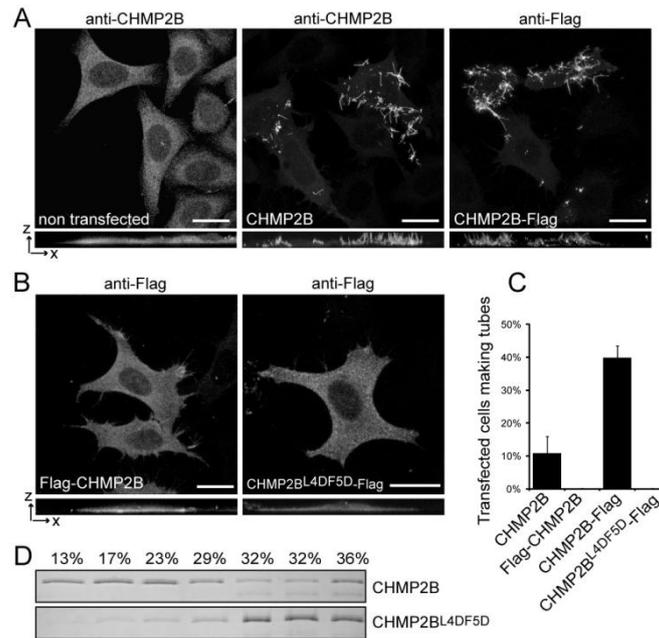


Figure 2

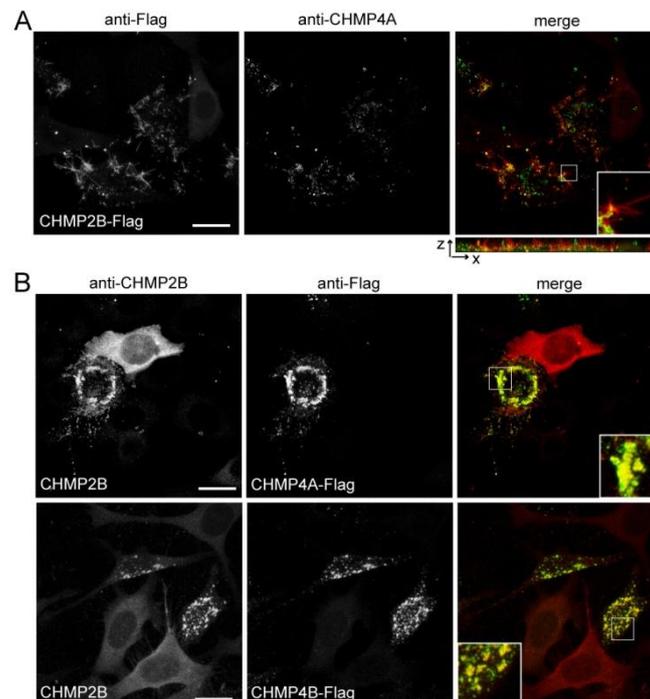


Figure 3

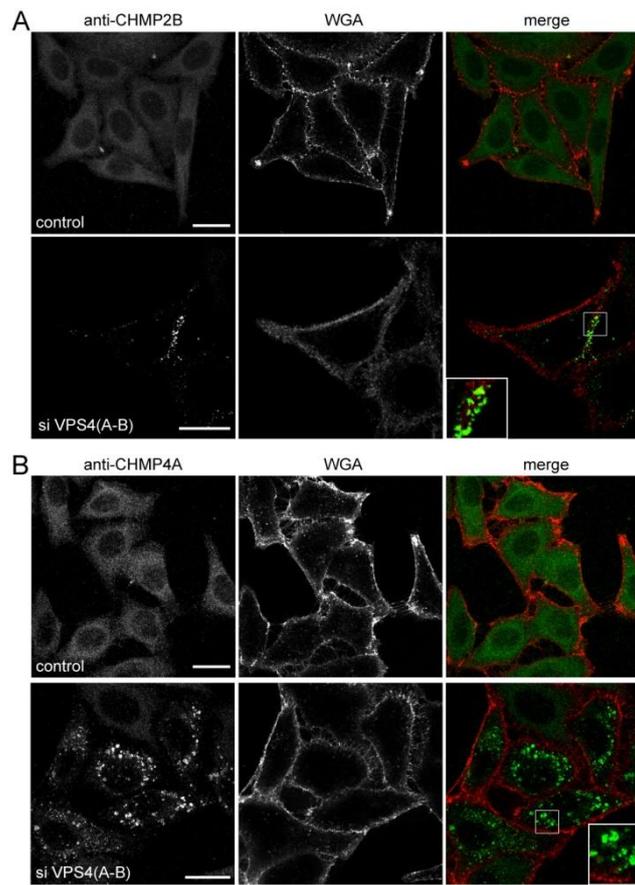


Figure 4

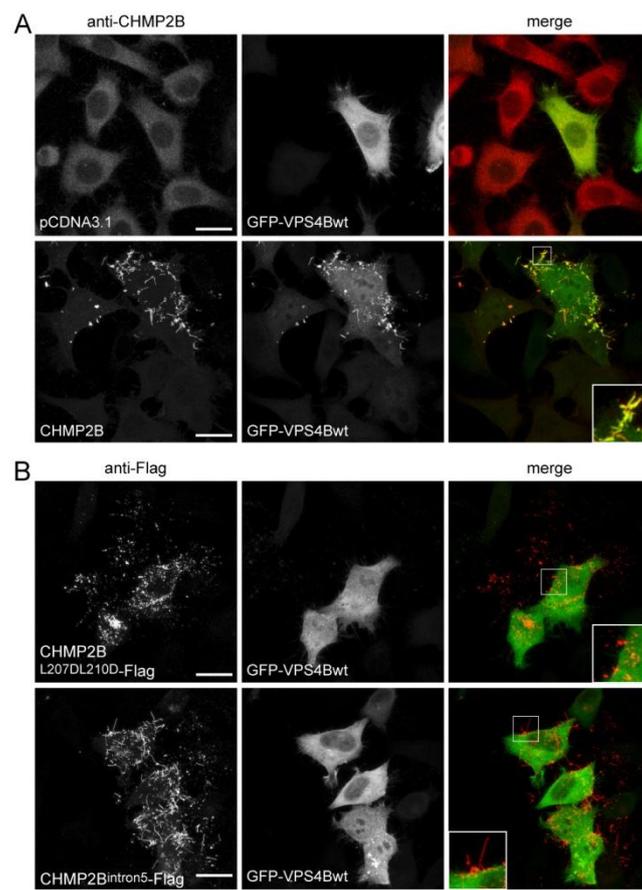


Figure 5

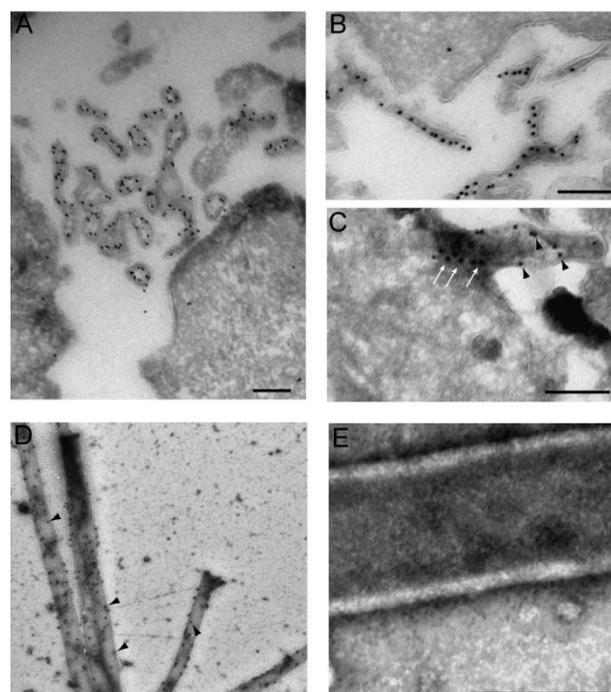
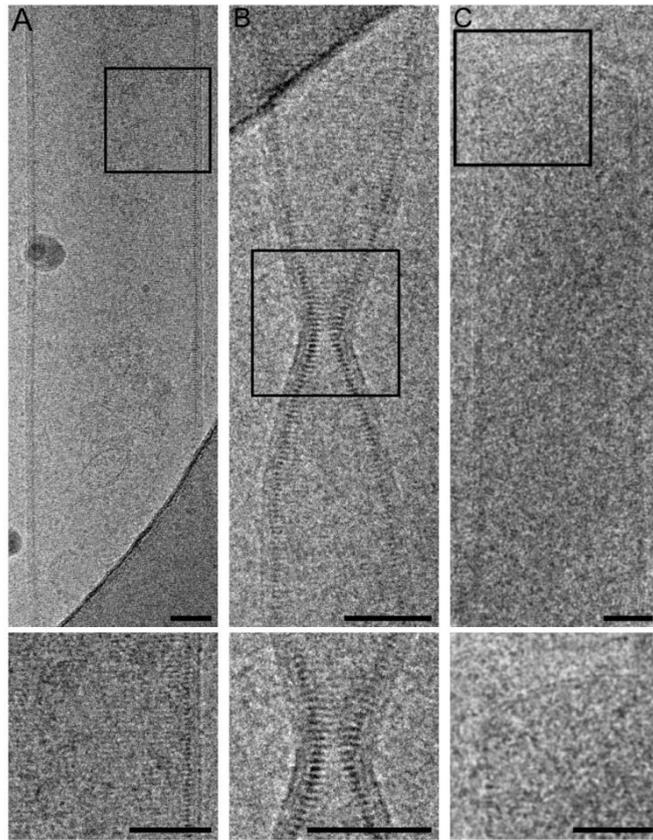


Figure 6



## Supporting information

### Supplementary figures

**Figure S1: CHMP2B overexpression in HEK cells and post-mitotic neurons induces formation of cell surface protrusions in which it accumulates.** (A) HEK-293T cells transfected with CHMP2B-Flag and immunostained 36h later with anti-Flag. (B) Rat Hippocampal neurons (E19) were prepared and transfected with CHMP2B after 14 DIV as described in (31). Three days later, CHMP2B was revealed by immunostaining with a polyclonal antibody against CHMP2B.

**Figure S2: Western blot analysis reveals comparable levels of expression of all CHMP2B constructs.** (A-B) Lysates of HeLa cells were prepared 36 h after transfection and western blots revealed using the indicated antibodies.

**Figure S3:** (A) Schematic representation of CHMP2B and CHMP2B mutants used throughout this study. (B) Alignment of the N-terminal amino-acids of human CHMP proteins. Conserved LF residues are shown in bold.

**Figure S4: Other members of the ESCRT-III core complex do not induce cell protrusions.** (A) CHMP2A-Flag, CHMP3-Flag, CHMP4A-Flag, CHMP4B-Flag, CHMP4C-Flag were transfected in HeLa cells under the same conditions as CHMP2B. Cells were immunostained and observed 36h later.

**Figure S5: Other members of the ESCRT-III core complex do not polymerize with CHMP2B inside cell protrusions.** (A) co-expressed CHMP2A-Flag and CHMP3-Flag do not induce cell protrusions. (B) CHMP4A, B and C, CHMP2A, and to a lower extent CHMP3 expressed in very low amounts localize at the base of CHMP2B tubes.

**Figure S6:** (A) In cells expressing both GFP-AMSH and CHMP2B, AMSH is not recruited inside CHMP2B protrusions. Photographs show maximal intensity projections of confocal image stacks. (B) Catalytically inactive VPS4B (VPS4B E235Q) increases the proportion of cells displaying CHMP2B protrusions. HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and observed 24 h later. For each condition 200 cells were counted. Standard error bars are shown. Mann-Whitney statistical analysis was used (n=6, p=0.0011).

**Figure S7:** Western blot analysis of HeLa cells treated with SiRNA against VPS4A and B shows decrease in expression of both proteins.

**Figure S8: HeLa cells CHMP2B protrusions do not contain actin or tubulin.** (A) Top: Staining with phalloidin, and anti-Flag to reveal CHMP2B, demonstrate the absence of F-actin inside CHMP2B tubes. Bottom: co-immunostaining with anti  $\beta$ -tubulin and anti-Flag demonstrates the absence of tubulin and microtubules inside CHMP2B tubes. (B) Cytochalasin D treatment induces depolymerization of actin but does not collapse CHMP2B tubes.

**Figure S9: Analysis of CHMP2B protrusions semi-purified from the culture medium of CHMP2B-Flag overexpressing cells demonstrates the presence of tubular CHMP2B polymers resistant to Triton-X100.** (A) Culture media of CHMP2B, CHMP2B-Flag, CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag expressing cells were centrifuged at low speed to eliminate debris. Membranes were then pelleted at 30 000 g (P1). P1 pellets were solubilized in 1% Triton X-100 and centrifuged at 20 000 g (P2 and S2). No pelleted material was detected in culture media of CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag expressing cells. (B) Semi purified tubes fixed and permeabilized with Triton-X100 before immunolabeling with anti-CHMP2B antibodies revealed by protein A gold (10 nm). CHMP2B delineates the entire tube. (C) High magnification of negatively stained semi purified tubes without permeabilization. Regular striations perpendicular to the axis of the tube can be seen. Bars: 200nm

**Figure S10:** (A) Low magnification of Cryo-EM shows CHMP2B-Flag tubes with a length reaching at least 8  $\mu\text{m}$ . (B) Change in the diameter affecting a segment of a tube.

**Movie S01:** 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B and immunostained with anti-CHMP2B antibodies.

**Movie S02:** 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B-Flag and immunostained with anti-Flag antibodies.

**Movie S03:** 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B-Flag and immunostained with antibodies against Flag and against CHMP4A reveals the presence of CHMP4A at the base of CHMP2B protrusions.

Figure S1

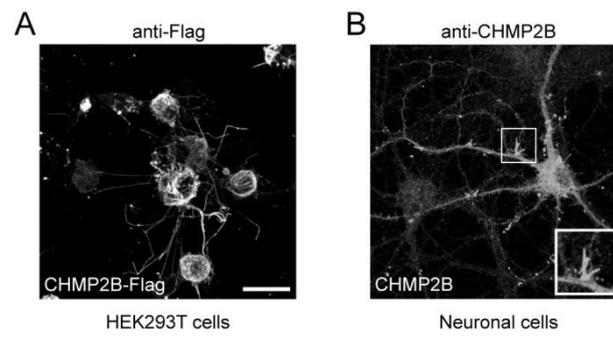


Figure S2

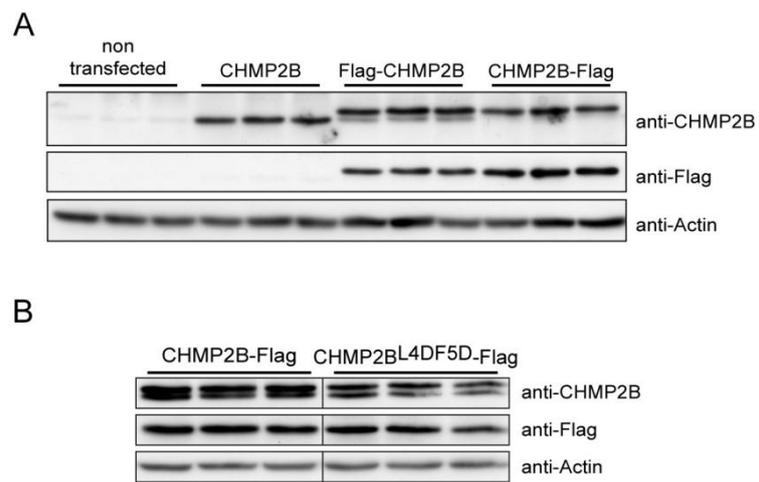
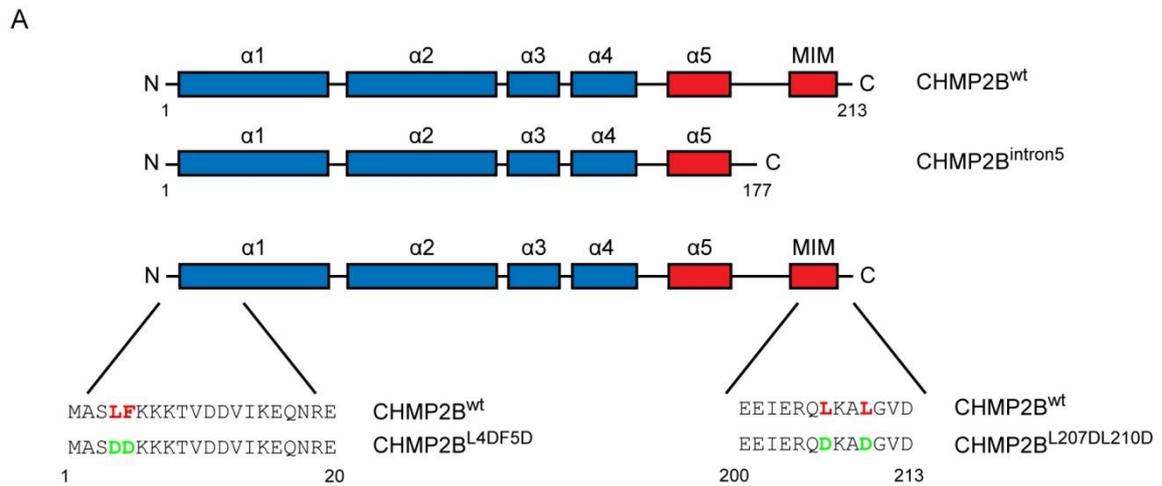


Figure S3



B

<b>CHMP1A</b>	---MDDT <b>LF</b> -QLK--FTAKQ-LEK--LAK-KAEKDSKAEQAKVKKALLQ-	39
<b>CHMP1B</b>	MSNMEKH <b>LF</b> -NLK--FAAKE-LSR--SAK-KCDKEEKAEKAKIKKA-IQ-	41
<b>CHMP2A</b>	---MD- <b>LF</b> -GRR--KTPEE-LLR--QNQ-RALNRAMRELDLDR-ERQKLET	38
<b>CHMP2B</b>	---MA- <b>SLF</b> --KK--KTVDD-VIK--EQN-RELRGTRAIIR-DRAALEK	37
<b>CHMP3</b>	---MG-- <b>LF</b> -GKTQEKPPKE-LVN--EWS-LKIRKEMRVVDR-QIRDIQR	39
<b>CHMP4A</b>	MSGLG- <b>RLF</b> -GKG--KKEKG-PTP--EEAIQKLKETEKILIK-KQEFLE-	41
<b>CHMP4B</b>	MSVFG- <b>KLF</b> -GAGGGKAGKGGPTP--QEAIQRLRDTEEMLSK-KQEFLE-	44
<b>CHMP4C</b>	MSKLG- <b>KFL</b> KGGGS-SKSRAAPSP--QEALVRLRETEEMLGK-KQEYLE-	44
<b>CHMP5</b>	---MN- <b>RLF</b> -GKA---KPKA-PPPSLTDCIGTVDSRAESIDK-KISRLD-	39
<b>CHMP6</b>	---MG- <b>NLF</b> -GRK--KQSRV-TEQ--DKAILQLKQQRDKLRQYQKR-IA-	38
	: :*	: . :

Figure S4

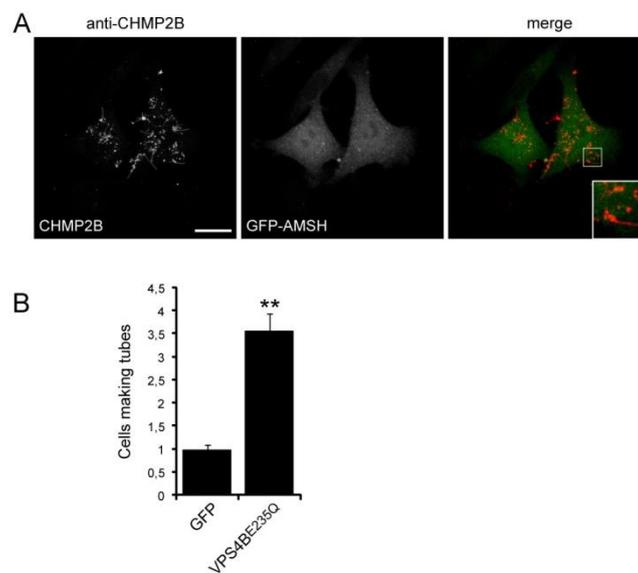


Figure S5

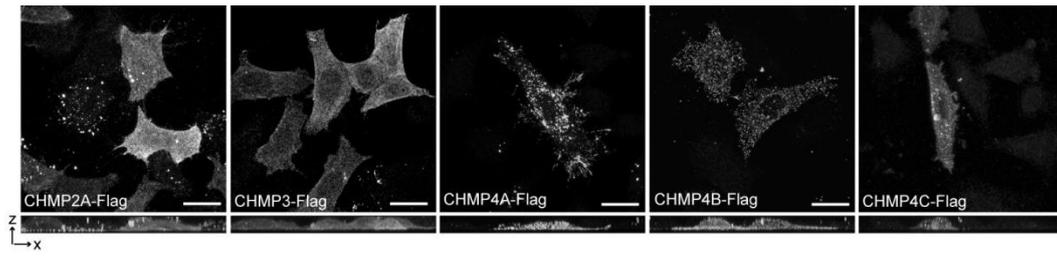


Figure S6

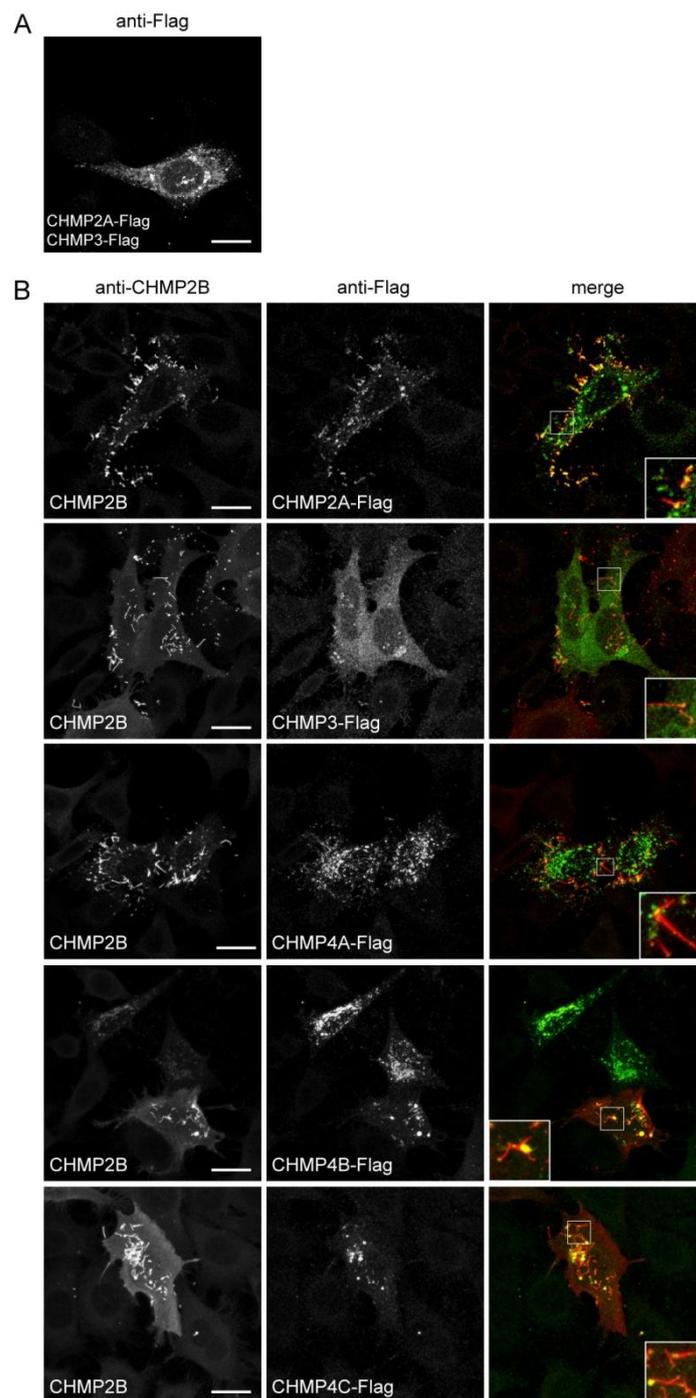


Figure S7

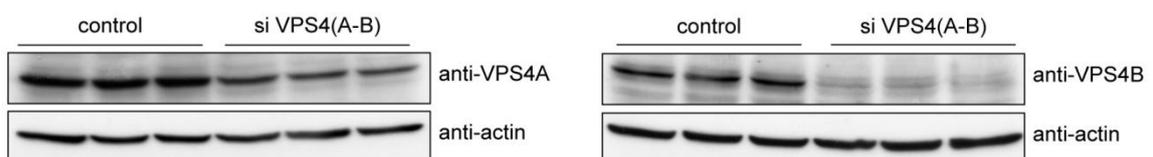


Figure S8

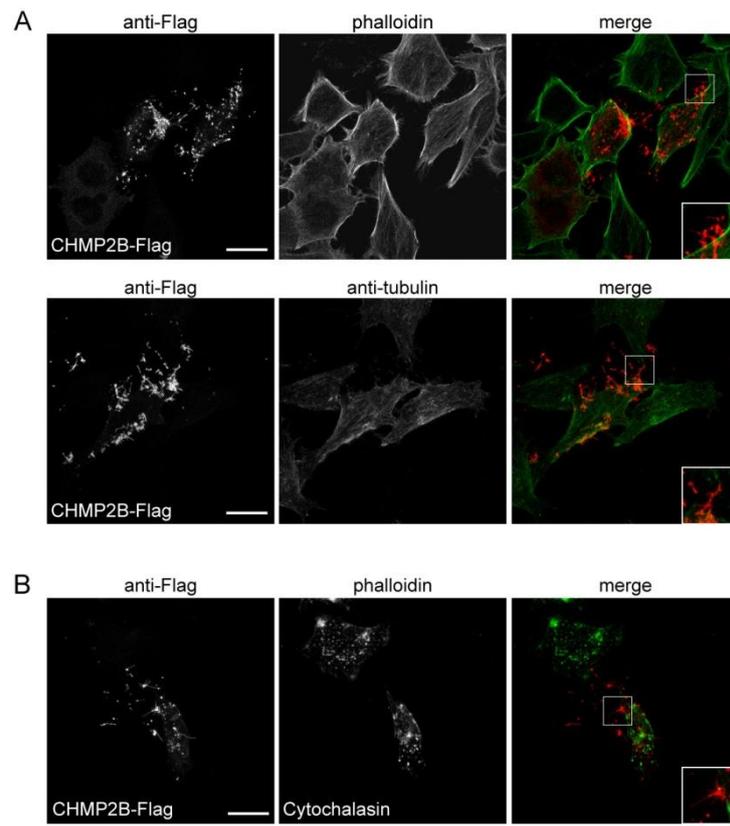
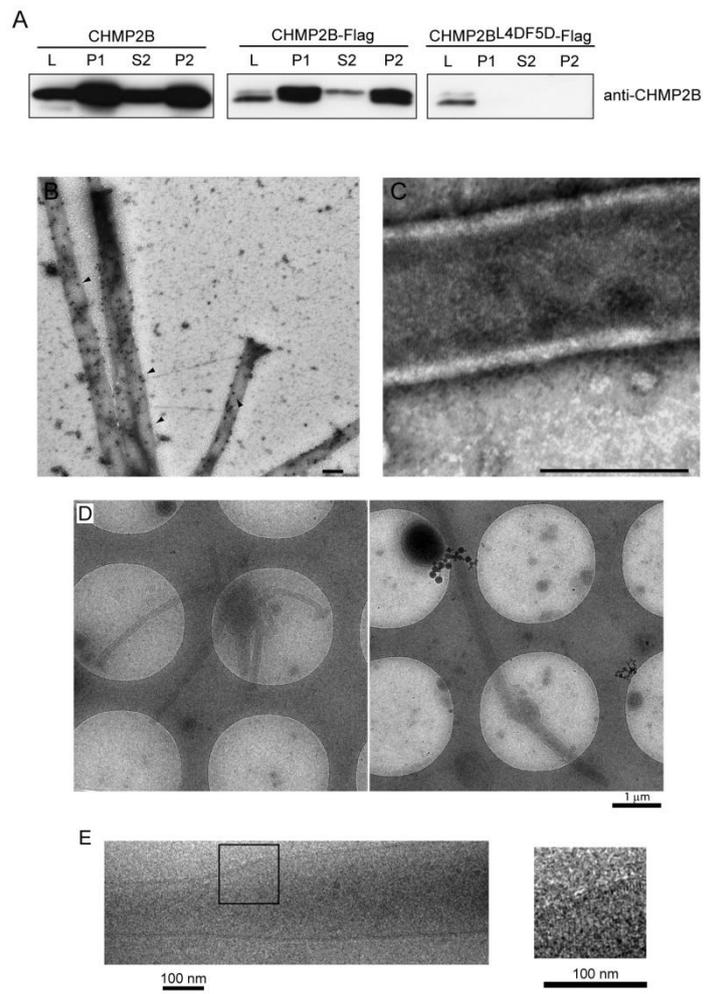


Figure S9



## Material and Methods

### - DNA constructs:

The wild-type human CHMPs (2A, 3, 4A, 4B, 4C) cDNAs were cloned from HeLa cells by RT-PCR, in frame with a C-terminal Flag inserted inside reverse primers (Table1). CHMP2B, CHMP2B<sup>Intron5</sup>-Flag, and CHMP2B-Flag, CHMP2B<sup>L207DL210D</sup>-Flag and CHMP2B<sup>L4DF5D</sup>-Flag were generated by PCR using plasmids containing HA-CHMP2B or GFP-VPS4B as templates, introducing Stop codon or point mutations inside primers when needed (Table1). The PCR fragments were inserted inside pcDNA3.1 vector using TOPO directional cloning kit (Invitrogen).

For expression in bacteria, cDNA fragments derived from human full length CHMP2B encoding residues (wt CHMP2B and mutant L4DF5D), were subcloned in frame with a C-terminal 6x Histidine tag into the expression vector pETM-13, using NcoI and XhoI, Protein were produced in E. coli strain BL21 codon plus (Invitrogen).

GPF-AMSH was a generous gift from Sylvie Urbé. pCaggs GFP-VPS4B and pCaggs GFP-VPS4(E235Q) were described previously(1).

Table 1: PCR primers used in this study.

	forward primer (5'-3')	reverse primer(5'-3')
CHMP2B <sup>L4DF5D</sup>	caccatggcgctccgacgacaagaag	catccacgggtttcttctgtcgtcggacgcatggtgaaggta
CHMP2B <sup>L207DL210D</sup> -Flag	caccatggcgctccctcttcaagaa	gggctactgtcatcgtcatcctttagtcatctactccatcagccttgtcttgcgttcaatctctcat
CHMP2B-Flag	caccatggcgctccctcttcaagaa	gggccctcgagctactgtcatcgtcatcctttagtcatctactcctaaagccttgag
CHMP2B	caccatggcgctccctcttcaagaa	gggctaactactcctaaagccttgag
CHMP2B <sup>INTRON5</sup> -Flag	caccatggcgctccctcttcaagaa	ggggggccttactgtcatcgtcatcctttagtcaaccttccagaaattcaattcc
CHMP3-Flag	caccatggggctgttggaaag	gggccctactgtcatcgtcatcctttagtgcgtcggagtggtg
CHMP4A-Flag	caccatgtcgcggcgccgccc	gggtcactgtcatcgtcatcctttagtgcggataccactcagccaact
CHMP4B-Flag	caccatgtcgggttcgggaagc	gggccctcactgtcatcgtcatcctttagtccatggatccagcccagttc
CHMP4C-Flag	caccatgagcaagttgggcaagttc	ttactgtcatcgtcatcctttagtgcggtagccaagctccaatt

### **- Reagents and antibodies:**

Polyclonal anti C-terminal part of CHMP2B primary antibody was obtained from abcam (ab33174). The anti-CHMP2B antibody was raised against the full length recombinant protein. Polyclonal anti-CHMP4A and CHMP4B primary antibodies were obtained from Santa Cruz (H-52 and C-12). Polyclonal antibodies against VPS4A and B were a kind gift of W.I. Sundquist (University of Utah). Monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal Anti- $\beta$ -Tubulin antibody was a generous gift from A. Andrieux (Inserm U836, Grenoble). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa 594-WGA and Alexa488-phalloidin were obtained from Molecular Probe.

### **- Cell Culture, Transfection**

For immunofluorescence, HeLa cells were seeded onto sterile glass coverslips in 6 well plates ( $10^5$  cells per well) in 2 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma), and 2 mM L-glutamine (Sigma). Cells were transfected 24 h later with 1  $\mu$ g DNA, and 6  $\mu$ l jetPEI transfection reagent (Polyplus), mixed in a final volume of 200  $\mu$ l of 150 mM NaCl. In cases of cotransfections, 1  $\mu$ g of CHMP2B containing plasmid were mixed with 200 ng of the plasmids. In the case of cotransfection with minute amount of CHMP4 containing plasmids, 1  $\mu$ g of CHMP2B containing plasmid was mixed with 50ng of CHMP4 plasmids. Following transfection, cells were or fixed and processed for immunostaining 24 or 36 h later.

For isolation of CHMP2B tubes, HeLa cells were seeded in 10 cm culture dishes (approximately  $10^6$  cells/well) in the same culture medium mentioned above except that FBS was previously cleared by a 60 000G centrifugation to remove potential contaminants. Cells were transfected 24 h later with 3  $\mu$ g DNA, and 18  $\mu$ l jetPEI transfection reagent (Polyplus-transfection), mixed in a final volume of 600  $\mu$ l of 150 mM NaCl. Media were harvested after 36 h.

For actin depolymerization, transfected cells were incubated with 1  $\mu$ M Cytochalasin D (Sigma) for 2 h.

Si RNA transfection: HeLa cells were seeded in 6 well plates onto sterile glass coverslips (2 coverslips per well, approximately  $10^5$  cells/well), (2 mL culture volume) were transfected with 100 nM of previously described siRNA duplexes (VPS4A CCGAGAAGCUGAAGGAUUAtt; VPS4B CCAAAGAAGCACUGAAAGAtt, Control (Luc GL2) CGUACGCGAAUACUUCGAtt (2)) using Oligofectamine reagent (Invitrogen). Cells harvested and processed 72 hours later. Extinction was estimated by western blot analysis of cell lysate.

### **- Western immunoblotting.**

Cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete, Roche Molecular). Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gel (20  $\mu$ g total protein per lane) and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Blots were revealed using Pierce Femto reagent. Luminographs were scanned (300 dpi, 8-bit scale) and the resulting image files were analysed with MetaMorph. Grey levels measured for CHMP2B bands were normalized to the corresponding actin bands.

### **- Immunofluorescence.**

SiRNA-treated and/or DNA transfected HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde. After 3–4 washes in PBS, cells were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 for and incubated in blocking solution (PBS containing 5% goat preimmune serum) for 30 min, followed by a blocking solution containing primary antibodies. After washing, cells were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa 594-WGA or Alexa488-phalloidin. After washing, coverslips were mounted in Mowiol medium.

#### **-Liposome Flotation Assay.**

Synthetic 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (SOPC) and 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoserine (DOPS) from Avanti Polar Lipids were homogeneously mixed in chloroform to achieve a 8/2 molar ratio. Dried thin lipid films were obtained by evaporation. Lipids were hydrated in (20 mM HEPES pH to a final concentration of 2.5 mg/mL. The translucent solution was then extruded 15 times through a 200 nm polycarbonate membrane (Avanti Polar Lipids). The average diameter of the liposomes was estimated to range between 200 to 400 nm by dynamic light scattering measurement and electron microscopy

Proteins and large unilamellar vesicles (LUVs) were incubated overnight. The solution was mixed with an equal volume of 80% (w/v) sucrose in 20 mM HEPES pH 7 resulting in a final sucrose concentration of 40% (w/v) with a final LUV concentration of 0.625 mg/mL. 300  $\mu$ L of this solution overlaid with 100  $\mu$ L of 30, 20 and 10% (w/v) sucrose in no-salt buffer. The gradient was then subjected to ultracentrifugation in a SW55Ti swing bucket rotor at 190 000 g for 6 h at 4°C. After ultracentrifugation gradients were separated into seven fractions. Sucrose concentration of each fraction was determined by refractometry; one third of each fraction was analyzed by SDS-PAGE.

#### **- Confocal microscopy**

Images of fluorescent neurons were acquired with a Leica SP-E laser scanning confocal microscope equipped with a 100x Leica Neofluar objective with NA 1.3. Laser power was adjusted to maximize the dynamic range of each sample. For dual-color samples, the adjustable spectral window of fluorescence collection was set for each channel with a singly colored control sample, so that cross-contamination between channels was avoided.

Since CHMP2B tubes protrude out of the cell in a large Z range, stacks of optical sections were acquired with the required electronic magnification. Image files were processed with MetaMorph (Molecular Imaging). Except when mentioned, images represent maximum intensity projections.

#### **- CHMP2B tube purification.**

Culture medium was harvested. Cells were washed twice with PBS and lysed in RIPA buffer. The culture medium was centrifuged twice at 300 g for 5 min to remove debris followed by a 30 000 g centrifugation (1 hour) to pellet membranes. The pellet (P1) was washed once with HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4), resuspended and incubated for 30 min at 4°C in HBS containing 1 mM AMPPnP (SIGMA), complete™ protease inhibitor (Roche Applied Science), and 1% Triton X100. Half of this suspension was centrifuged at 20 000 g for 30 min, the pellet (P2) was re-suspended in the same volume as S2.

Identical volumes of P1, S2, P2 were analyzed by western blot together with the cell lysate (20  $\mu$ g proteins estimated using BCA protein assay reagent (Pierce)).

## **- Electron microscopy.**

### Immuno-EM analysis of CHMP2b expressing cells:

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M, pH 7.3 during 2 h. Cells were then gently detached using a cell scraper, centrifuged at 1200 rpm during 5 minutes and embedded in 10% gelatine. The cell pellet was then cut into 1 mm<sup>3</sup> pieces.

These samples were cryoprotected during 4 h in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections of 40 nm were made at -120°C using a ultra-cryo-microtome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to the Tokuyasu protocol (Liou et al., 1996). Cryosections were first incubated with primary polyclonal anti-Flag antibody (SIGMA), and revealed with protein A-gold conjugate (CMC, Utrecht). Double immunogold labeling was performed sequentially using protein A gold of 15 nm to recognize anti-CHMP4A and protein A gold of 10 nm to detect CHMP2B.

Labeled cryosections were viewed at 80 kV with a 1200EX JEOL TEM microscope and images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

### Negative staining:

P1 pellet obtained from the culture media of ten 100 mm dishes of HeLa cells transfected with CHMP2B-Flag was resuspended in 80µl HBS. 6 µl of this sample was incubated during 10 minutes on an EM grid coated with formvar and carbon. Grids were then quickly blotted and washed 3 times in water before staining with 1% uranyl acetate during 1 min, followed by blotting to remove excess liquid.

For immunolabeling, samples were permeabilized with Triton X100 1% during 20 minutes and labeling was performed after extensive washing with water using an anti CHMP2B antibody against the whole protein. Protein A gold (CMC, Utrecht, The Nederland) was used to reveal the antibody. Finally, grids were stained with 1% uranyl acetate pH 4 during 1 minute.

Grids were viewed under a transmission electron microscope (JEOL 1200EX) and images acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

### Cryo-EM:

P1 pellets obtained the culture medium of thirty 100 mm dishes were resuspended in 40 µl HBS. 4 µl of sample were loaded onto a Quantifoil R2/1 holey grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany), blotted for 1 to 2 s to remove the excess liquid and then rapidly plunged into liquid ethane cooled using liquid nitrogen. The frozen grid was transferred into a FEI Tecnai Polara electron microscope. Images were taken under low dose conditions at 300 kV (less than 10 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>) and with a nominal magnification of 39,000 and a defocus between 2 and 3 µm using a CCD camera (GATAN ultrascan 4000).

### Calculation of the pitch of the helix:

Several of the observed tubes have been boxed in 512 x512 pixels to calculate their Fourier transform and power spectrum. The position of the layer in the power spectrum is related to the pitch of the CHMP2B helix. In our case this pitch is 32 Å.

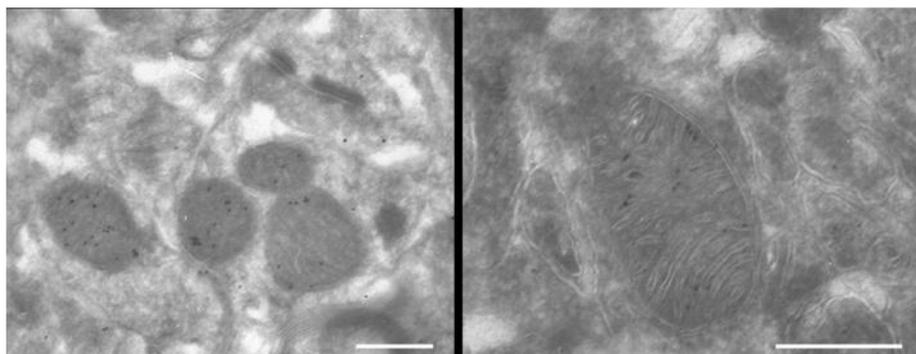
## References

1. Mahul-Mellier AL, *et al.* (2009) Alix and ALG-2 make a link between endosomes and neuronal death. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 1):200-203.
2. Morita E, *et al.* (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(29):12889-12894.

### **3. Rôle potentiel de CHMP2B dans dynamique mitochondriale.**

#### **3.1. Import dans les mitochondries.**

Une partie de ma thèse a été consacrée à l'étude du rôle potentiel de CHMP2B dans la dynamique des mitochondries. A notre surprise, l'analyse par microscopie immunoélectronique (collaboration avec Karine Pernet-Gallay) de la distribution intracellulaire de cette protéine dans des hippocampes de souris a révélé un marquage intense à l'intérieur des mitochondries (figure 26). Les CHMPs sont des protéines cytosoliques capables de s'associer aux membranes mais aucune d'entre elles n'a jusqu'ici été détectée à l'intérieur d'une organelle. De plus, les mitochondries et plus particulièrement leur dynamique, semblent jouer un rôle central dans la plupart des maladies neurodégénératives (Maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington , ALS...(Arduino et al.; de Moura et al.; Sack; Wang et al., 2009)). Le rôle potentiel de CHMP2b dans la physiologie mitochondriale pourrait se révéler capital dans la compréhension des mécanismes des FTD.



**Figure 26: Immunomarquage de CHMP2B dans les mitochondries d'hippocampe de souris.** . CHMP2B a été marquée par un anticorps anti-CHMP2B et la protéine A couplée à des billes d'or (Barre d'échelle 50nm).

Cependant, l'immunomarquage non spécifique de mitochondries est un artefact courant en microscopie électronique. Il n'est donc pas une preuve satisfaisante de la présence de CHMP2B dans ces organelles et nécessite confirmation par d'autres approches.

### ***Mise en évidence de la localisation mitochondriale de CHMP2B par fractionnement subcellulaire.***

L'isolement des mitochondries par fractionnement subcellulaire, permet de vérifier la présence de protéines dans les mitochondries, l'identité de ces protéines par leur profil de migration en Western Blot, connaître leurs localisation dans l'organelle (membrane externe, espace inter-membranaire, matrice).

#### ***Purification de mitochondries de cerveaux de rats adultes.***

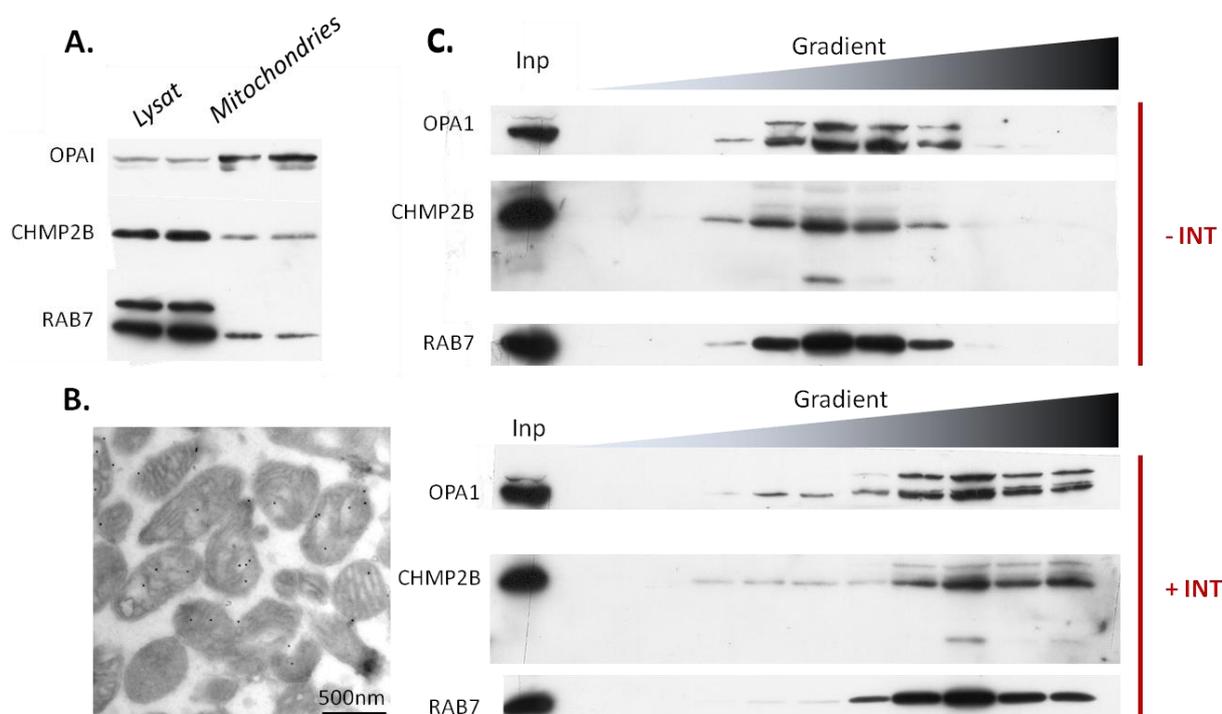
Les mitochondries sont préparées à partir d'un cerveau de rat dont le cervelet et le tronc cérébral ont été retirés. Elles sont purifiées sur gradient discontinu Percoll selon le protocole décrit par Sims *et al.* (Sims and Anderson, 2008). La même quantité de protéines de chaque fraction est déposée sur gel de polyacrylamide et analysée par Western Blot. L'augmentation du signal OPA1 (protéine de l'espace inter-membranaire) confirme un fort enrichissement des mitochondries dans la fraction mitochondriale (figure 27A). L'analyse de cette dernière en microscopie électronique (figure 27B) démontre la très bonne qualité de la purification.

L'analyse par Western Blot indique que CHMP2B est bien présente dans la fraction mitochondriale mais qu'elle n'y est pas enrichie. Or le marqueur des endosomes tardifs/lysosomes RAB7 y est aussi détectable. Il n'est donc pas possible de déterminer si le signal CHMP2B détecté provient des mitochondries ou d'une contamination de la fraction par des endosomes ou autres.

Afin de mieux séparer les mitochondries des autres structures, la fraction mitochondriale purifiée est séparée par centrifugation sur un gradient continu de sucrose (1 M-2 M). CHMP2B est bien concentrée dans les mêmes fractions qu'OPA1, mais RAB7 l'est aussi (figure 27C).

Nous avons donc mis au point une stratégie de purification modifiée, permettant de mieux séparer les mitochondries des contaminants qui co-sédimentent avec elles. Nous avons tiré profit des propriétés du chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT). Ce composé est un accepteur artificiel d'électrons, couramment utilisé comme indicateur colorimétrique d'activité de diverses déshydrogénases (Abood, 1949). En présence de mitochondries et de

succinate dans le milieu, l'INT est réduit par le NADH produit par la succinate déshydrogénase, provoquant ainsi la formation dans la matrice mitochondriale d'un précipité rouge insoluble, le formazan (Kun and Abood, 1949). La formation locale de ce précipité permet donc de modifier spécifiquement la densité des mitochondries. Cette propriété a notamment été utilisée pour éliminer les mitochondries qui contaminent les préparations de synaptoneurosomes obtenus par fractionnement sub-cellulaire (Webster and Klingman, 1979; Nieto-Sampedro et al., 1981).



**Figure 27 : CHMP2B est associée aux mitochondries dans une fraction purifiée de mitochondries de cerveau de rat.**

**A:** Les mitochondries de deux cerveaux de rats adultes ont été purifiées en parallèle selon le protocole décrit par Sims et collaborateurs. Brièvement, les cerveaux ont été lysés mécaniquement dans un tampon d'isolation de mitochondries, puis centrifugés deux fois à 1300g pour enlever les débris et noyaux. Le surnageant (Lysat) est centrifugé à 21000 g, le culot ainsi obtenu est re-suspendu puis séparé sur gradient discontinu de Percoll (15%, 23%, 40%). Les mitochondries sont récupérées à l'interface 23%-40% puis concentrées et nettoyées par deux autres centrifugations. Vingt microgrammes de protéines de chaque fraction sont analysés par western blot.

**B:** La fraction mitochondriale obtenue a été culotée, puis préparée pour la cryotomie. CHMP2B a été marquée par un anticorps anti-CHMP2B et la protéine A couplée à des billes d'or. **C:** La fraction mitochondriale a été reprise dans un tampon « d'alourdissement » (Tampon d'isolation de mitochondrie + 60mM succinate, 0,1% BSA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) puis séparée en deux, 1mM final d'INT est rajouté à l'une des fractions. Les deux fractions sont incubées 20minutes à 37°C, puis chargées sur un gradient continu de sucrose 1M-2M. Des fractions de 1ml sont collectées et analysées par western blot.

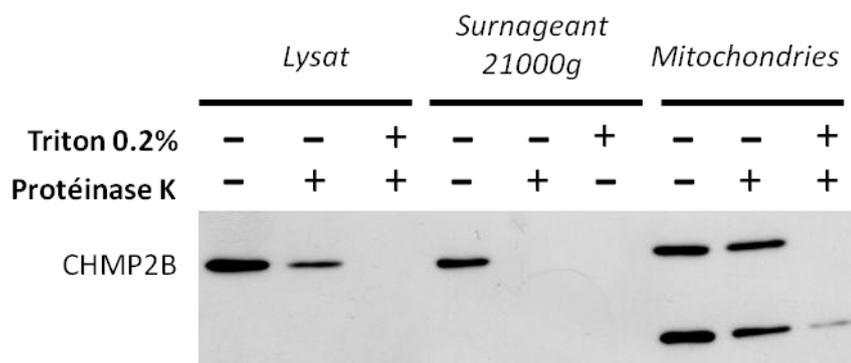
La fraction mitochondriale est préparée comme précédemment puis séparée en deux. La moitié est incubée en présence d'INT et de succinate pendant 30 min à 37°C, l'autre

dans le même tampon sans INT. Les deux fractions sont ensuite chargées sur gradient continu de sucrose (1 M-2 M).

Le traitement par l'INT provoque un décalage du marquage OPAI vers les fractions plus denses (Fig 27D) ce qui confirme l'augmentation de la densité de mitochondries. CHMP2B subit le même phénomène suggérant ainsi qu'elle y est bien associée, mais RAB7 subit lui aussi ce déplacement. Cette technique ne permet donc pas de séparer les mitochondries des contaminants. Il est possible que des endosomes soient intimement associés aux mitochondries, ou que des protéines cytosoliques contaminent notre préparation en adhérant à ces dernières.

**CHMP2B est présent dans la fraction mitochondriale, à l'intérieur de structures membranaires.**

CHMP2B tout comme RAB7 sont des protéines solubles pouvant être recrutées sur la face cytosolique de la membrane des endosomes. Le marquage de CHMP2B en microscopie immunoélectronique (figure 26) suggère qu'elle pourrait se trouver à l'intérieur des mitochondries. Si CHMP2B réside effectivement à l'intérieur de ces organelles, elle devrait résister à la dégradation par l'ajout de protéinase K dans la fraction mitochondriale. En revanche, si la fraction mitochondriale de CHMP2B provient d'une contamination, elle devrait être dégradée. En effet, cette protéase à large spectre digère les protéines cytosoliques ou associées à la face externe des membranes des organelles qui lui sont accessibles mais pas celles à l'intérieur qui sont protégées (Olichon et al., 2002). Dans la fraction cytosolique, CHMP2B est entièrement dégradé, dans la fraction mitochondriale, CHMP2B de la digestion par la protéinase K. L'ajout de triton X100 0,2% pendant la digestion provoque la dégradation de CHMP2B montrant qu'elle est protégée par des lipides qui l'enrobent. Donc CHMP2B est présente dans la fraction mitochondriale à l'intérieur de structures membranaires.



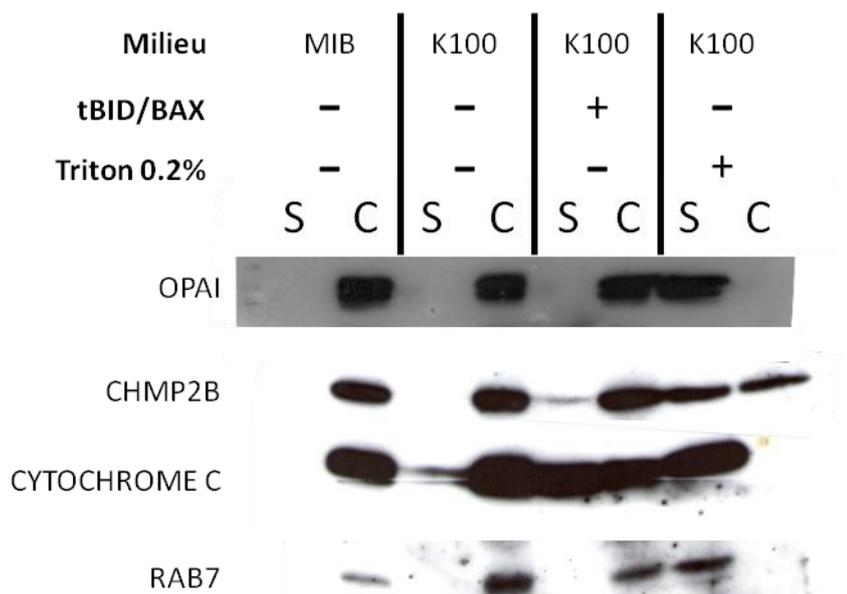
**Figure 28 : CHMP2B est à l'intérieur de membranes dans la fraction mitochondriale.**

Vingt µg de protéines de lysats, de surnageants après centrifugation à 21000g de ce lysat, ou de mitochondries de cerveau de rat sont soumis à digestion par la protéinase K seule ou en présence de 0,2% de Triton X100 détergent pendant 30 minutes à 4°C.

### **CHMP2B n'est pas présente sous forme soluble dans l'espace intermembranaire**

Afin de déterminer si ces structures membranaires sont bien les mitochondries, nous avons testé si en les perméabilisant spécifiquement nous pouvions provoquer la solubilisation de CHMP2B. BAX et BID sont deux molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Bid est clivé en tBid par diverses protéases comme la Caspase8. Il est alors activé et permet l'insertion de Bax dans la membrane externe de la mitochondrie où il s'oligomériser pour former un pore provoquant la sortie du cytochrome C dans le cytosol, et le déclenchement de l'apoptose (Jourdain and Martinou, 2009; Ott et al., 2009). L'ajout de tBid et Bax recombinants à des mitochondries de cellules Hela in vitro permet de perméabiliser spécifiquement la membrane externe, libérant ainsi le cytochrome c, mais pas les protéines des membranes internes (Roucou et al., 2002).

Nous avons reproduit cet effet de tBid/Bax sur les mitochondries de cerveau de rat ; le traitement entraîne le transfert d'environ la moitié du signal du cytochrome C dans le surnageant. En comparaison, le cytochrome c est complètement solubilisé par l'ajout de Triton X100 (figure 29). OPA1 qui est associée à la membrane interne de la mitochondrie (Olichon et al., 2002) n'est pas relarguée alors qu'elle est entièrement solubilisée par l'ajout de Triton X 100 à 0,2%. RAB7 présente le même profil qu'OPA1. Une très faible fraction de CHMP2B semble être solubilisée par l'ajout de tBid et Bax. Il semblerait au vu de ces données qu'une faible portion du signal du signal CHMP2B puisse provenir de l'espace intermembranaires des mitochondries.



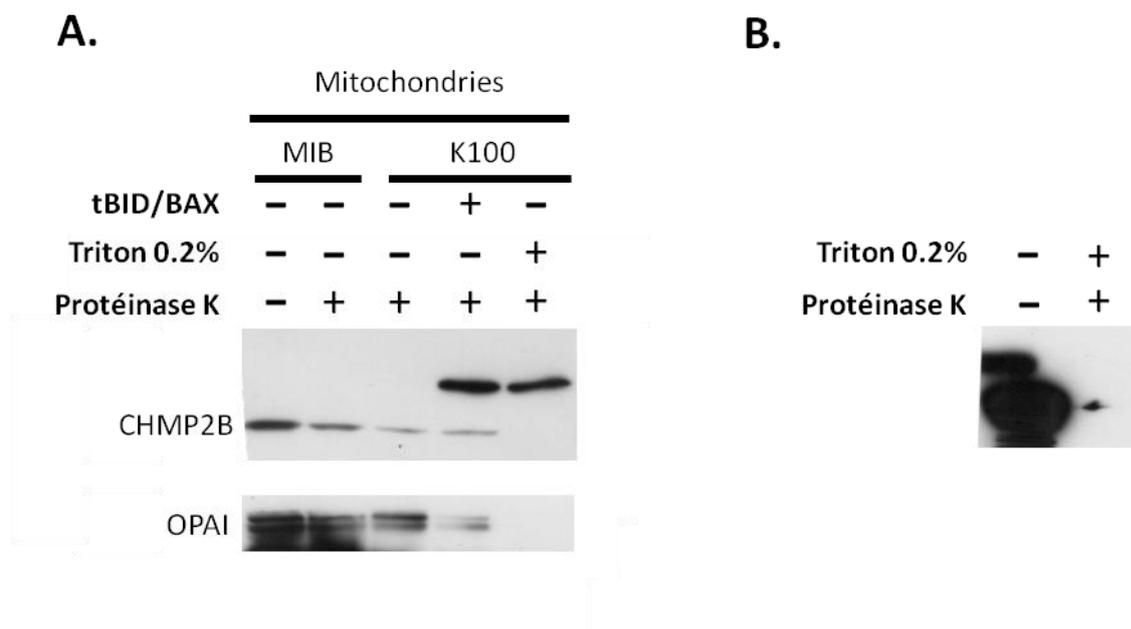
**Figure 29: CHMP2B n'est pas présente sous forme soluble dans l'espace inter-membranaire des mitochondries.**

Dix  $\mu\text{g}$  de protéines d'une fraction mitochondriale de cerveau de rat sont reprises dans du tampon d'isolation de mitochondries (Mitochondrial Isolation Buffer: MIB) ou dans un tampon hypotonique (100mM KCl : K100). Les mitochondries sont perméabilisées par ajout de Triton X100 ou des protéines tBID (20mM) et BAX (100mM). Les échantillons sont incubés 20 minutes à 30°C puis centrifugés à 13000g 10 minutes. Les surnageants (S) et culots (C) ainsi obtenus sont analysés par western blot.

Contrairement au Cytochrome C, OPA1 et RAB7, CHMP2B n'est pas entièrement solubilisée par le traitement au Triton X100. Or les complexes ESCRTIII ne sont pas solubilisés par ce détergent, et sédimentent par centrifugation à faible vitesse (Lin et al., 2005; Shim et al., 2007). Ces observations suggèrent que le signal CHMP2B présent dans la fraction mitochondriale pourrait au moins en partie provenir d'un complexe ESCRTIII qui serait donc associé aux membranes.

La solubilisation par tBID et BAX ne permet pas de distinguer les protéines logées à l'intérieur d'organelles contaminant éventuellement la préparation, de celles associées aux membranes mitochondriales. En revanche, la formation des pores BAX doit rendre les protéines intra-mitochondriales sélectivement accessibles à la protéinase K, ce qui devrait permettre de les différencier. La fraction mitochondriale a donc été digérée par la protéinase K après avoir été incubée en présence de BAX et tBID. La diminution du signal OPA1 dans ces échantillons figure 30 valide ce protocole. Cette diminution est modeste mais reproductible ; il est probable que seule une portion des mitochondries soit perméabilisées par tBID et BAX dans notre protocole. Il n'y a pas de perte nette du signal CHMP2B dans la

fraction prétraitée par tBid et Bax, ce qui suggère que cette protéine ne provient pas de l'espace intermembranaire des mitochondries.



**Figure 30: La digestion par la protéinase K de l'intérieur des mitochondries révèle un nouveau signal à 40kDa (PK40).**

**A:** Les mitochondries de cerveau de rat sont perméabilisées par ajout de Triton% 100 à 0,2% ou des protéines tBID (20mM) et BAX (100mM), les échantillons sont incubés 20 minutes à 30°C, puis digérés par la protéinase K (50µg/ml) à 4°C pendant 30 minutes. La protéinase K est ensuite bloquée par ajout de PMSF (5mM).

**B:** MBP-CHMP2B recombinant est digéré par la protéinase K dans les mêmes conditions.

### CHMP2B pourrait être présent dans les mitochondries au sein d'un complexe protéique.

Cependant dans la fraction perméabilisée au triton X100 comme dans celle traitée par tBID et BAX, la digestion par protéinase K provoque l'apparition d'une nouvelle bande reconnue par l'anticorps dirigé contre CHMP2B, d'un poids moléculaire plus important (environ 40kDa) que nous nommerons PK40 (figure 30A). Ce signal provient donc bien d'une protéine mitochondriale, reste à savoir s'il émane de CHMP2B.

La protéinase K est une sérine protéase à large spectre capable de dégrader la grande majorité des protéines, mais pas toutes. Par exemple, la forme bénigne de la protéine prion ( $\text{PrP}^c$ ) est sensible à la protéinase K alors que sa forme pathogène ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) y est résistante. Cette résistance est due à un changement de conformation de la protéine. Certaines protéines peuvent donc être sensibles ou résistantes à la protéinase K en fonction de leur

conformation tridimensionnelle. La protéine CHMP2B seule est dégradée par protéinase K puisque la protéine recombinante soluble est entièrement digérée (figure 30B) sans apparition de PK40. Tout comme pour le prion, PK40 pourrait donc provenir d'une autre forme de CHMP2B. Or nous avons déjà évoqué la possibilité de la présence dans les mitochondries d'un complexe ESCRTIII non solubilisable par le Triton X100. Ce nouveau signal apparaissant au dessus de la bande de CHMP2B sauvage pourrait donc provenir d'un «cœur » dense de ce complexe, résistant à la protéinase K.

### **Caractérisation biochimique de la nouvelle bande apparaissant suite au traitement par la protéinase K**

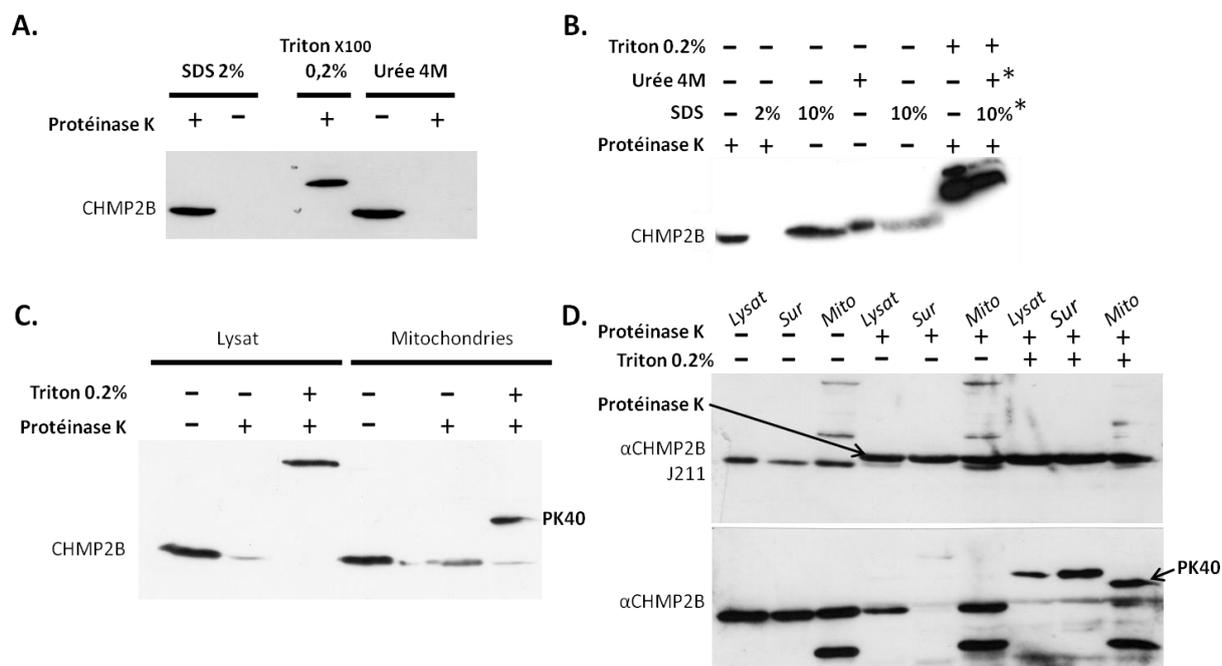
PK40 est dégradée par la protéinase K en présence d'agents dénaturants comme le SDS 2% ou l'urée 4M (figure 31A). C'est donc bien sa conformation tridimensionnelle qui la rend résistante. Elle est spécifiquement mitochondriale puisqu'elle n'apparaît ni dans le lysat ou ni dans le surnageant 21000g, suite à leur digestion par la protéinase K en présence de Triton X100 (Fig31C et D). Toutefois une autre bande apparaît d'un poids moléculaire plus important dans ces deux fractions. Tout comme pour les mitochondries, cette bande n'apparaît suite à la digestion qu'en présence de TritonX100. Elle est donc aussi protégée par des membranes.

Pourrait-il y avoir des complexes ESCRT de natures différentes en fonction des compartiments qui seraient mis en évidence par ce protocole de digestion limitée? Cette question devra être posée si nous arrivons à démontrer sans équivoque que PK40 est bien un polymère contenant CHMP2B.

Si tel est le cas, ce « cœur » est suffisamment stable pour ne pas être dissocié dans le tampon Laemmli. Le traitement de l'échantillon après la digestion par des agents dénaturants dans des conditions plus drastiques (SDS 2%+urée 4M) n'a aucun effet sur la bande à 40kDa (figure 31 R6 B). Donc soit ce cœur de complexe une fois digéré est tellement stable qu'il ne peut être dissocié dans ces conditions, par exemple si les sous unités le formant sont maintenues ensembles par des liaisons covalentes non réduites par le  $\beta$ -mercaptoéthanol, soit ce n'est pas un polymère mais une protéine autre que CHMP2B.

Or, elle n'est pas reconnue par un autre anticorps polyclonal que nous avons produit contre la protéine entière (figure 31D). Il est donc possible que cette bande soit le fait d'une

interaction non spécifique de l'anticorps primaire avec une protéine qui ne serait pas CHMP2B.



**Figure 31: Caractérisation biochimique de PK40.**

**A, B, C et D:** Vingt µg de protéines de lysats, de surnageants après centrifugation à 21000g du lysat, ou de mitochondries de cerveau de rat sont soumis à digestion par la protéinase K en présence de détergent (SDS 2% ou tritonX100 0,2%) ou d'urée 4M pendant 30 minutes à 4°C. La protéinase K est ensuite bloquée par ajout de PMSF (5mM). Pour les conditions marquées par un astérisque (\*) l'échantillon est traité par le SDS et l'urée après la digestion par la protéinase K et son blocage au PMSF. Les échantillons sont ensuite analysés par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les 15 derniers acides aminés de CHMP2B (αCHMP2B) ou contre la protéine entière (αCHMP2B -J211). Partie D : flèche : bande non spécifique, associée à la préparation de protéinase K et reconnue par l'anticorps J211.

Cette bande à 40kDa provient d'une protéine qui est clairement mitochondriale mais qui reste mystérieuse. Cette ambiguïté pourrait être levée, par l'isolation de cette bande sur gel 2D suivie de sont analyse par spectrométrie de masse.

### 3.2. Formes courtes d'ESCRTIII et mitochondries.

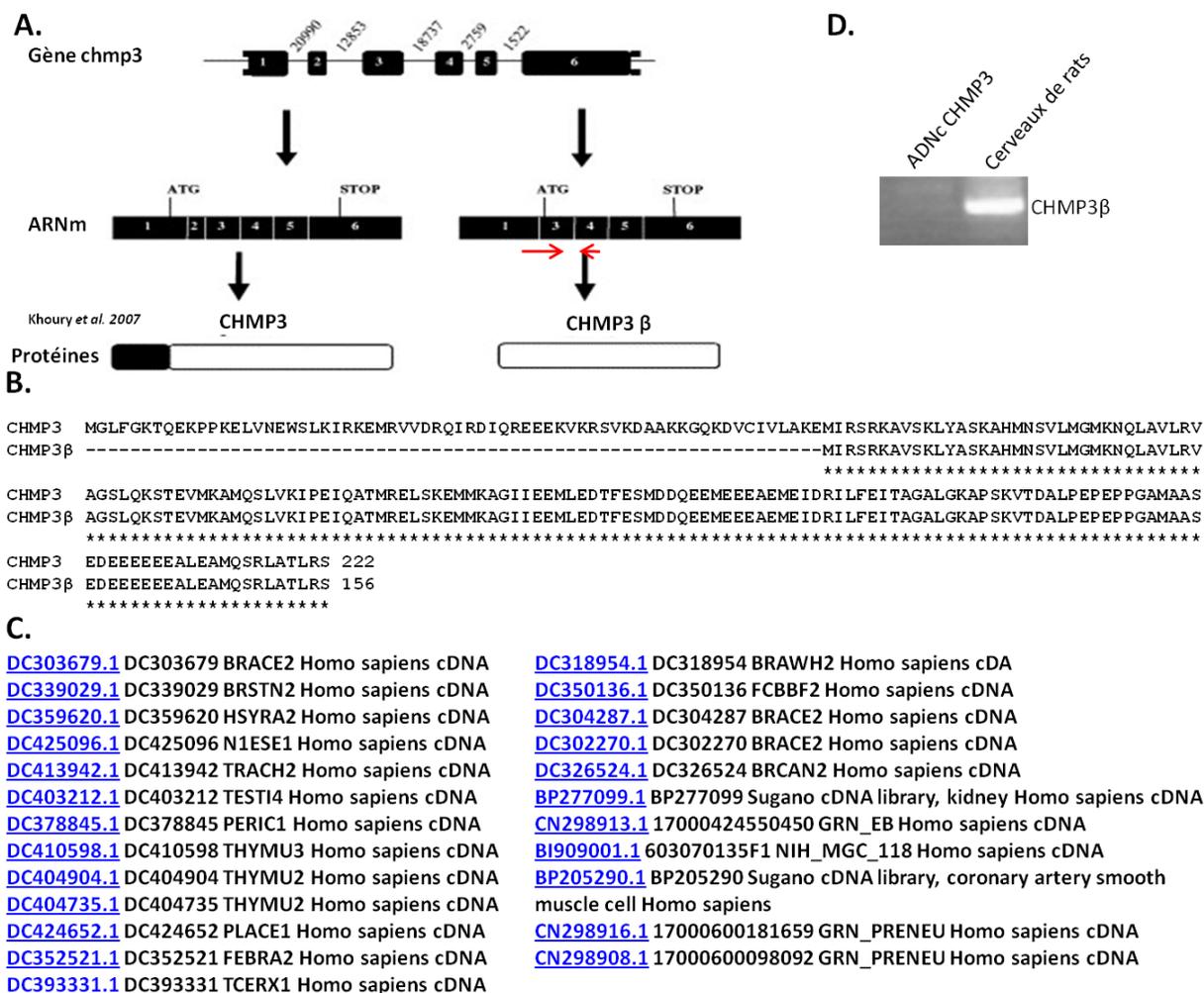
#### - CHMP36

Dans un crible pour caractériser de nouvelles protéines anti-apoptotiques, Khoury et collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois une relation entre un membre d'ESCRT III et les mitochondries. Chez les mammifères la mort cellulaire programmée ou apoptose, est assurée par une famille de protéases, les caspases. Présentes dans le cytosol sous forme de procaspases, elles sont activées par clivage. L'induction de ce phénomène passe par deux voies principales : la voie de mort extrinsèque, où l'activation de récepteurs

de mort de la famille Trail/Tnf provoque le clivage de la procaspase 8 (Mahmood and Shukla); et la voie intrinsèque où divers signaux peuvent aboutir à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et à la sortie de molécules proapoptotiques comme le Cytochrome C. Ce dernier va alors former un complexe multi-protéique appelé apoptosome permettant le clivage de la procaspase 9 et le déclenchement de l'apoptose. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie représente donc « le point de non retour » de la voie intrinsèque (Kang and Reynolds, 2009). Elle est assurée par BAX et BAK, deux protéines de la famille de BCL2 qui peuvent toutes deux s'insérer dans la membrane externe de la mitochondrie pour y former des pores (Jourdain and Martinou, 2009). L'expression de la forme humaine de BAX chez *Saccharomyces cerevisiae* provoque des dysfonctionnements des mitochondries, le ralentissement de la pousse et la mort de ces levures (Gross et al., 2000). Khoury et collaborateurs ont utilisé ce modèle pour identifier de nouvelles protéines humaines capables d'inhiber la mort induite par l'expression de BAX (Khoury et al., 2007). Ils ont criblé une banque d'ADN complémentaires issus de cœur humain en les transduisant dans des levures exprimant BAX sous le contrôle du promoteur de la  $\beta$ -galactosidase, et caractérisé ceux qui bloquent l'effet de BAX. Parmi les protéines ainsi identifiées figure un variant d'épissage de CHMP3. Ce variant, appelé CHMP3 $\beta$ , est engendré par excision de l'exon 2, et code une protéine plus courte que la forme canonique de CHMP3 (156 acides aminés pour CHMP3 $\beta$  et 222 pour CHMP3), équivalant à CHMP3 privé de ses 66 premiers acides aminés (Figure 32A et B).

Ils ont ensuite confirmé la capacité de cette protéine à protéger les levures contre différents types de stress, pro-apoptotiques ou touchant les mitochondries (NaCl en forte concentration, UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ils ont aussi montré que CHMP3 ne conférait pas cette protection et que CHMP3 $\beta$  ne jouait aucun rôle au sein du complexe ESCRT-III dans la voie endosomale.

## Caractérisation de CHMP3β dans des tissus humains



**Figure 32: Confirmation de l'existence de l'ARNm codant pour CHMP3β.**

**A:** Schémas représentatif du gène *chmp3* et de l'assortiment en exons (rectangles numérotés de 1 à 6) des ARN messagers codant CHMP3 et CHMP3β

**B:** Alignement protéique de CHMP3 et CHMP3β humains. Les étoiles (\*) représentent les acides aminés conservés entre les deux protéines.

**C:** Expressed Sequence Tag (EST) humains présents dans la base de donnée NCBI correspondant à l'ARN messenger codant CHMP3β.

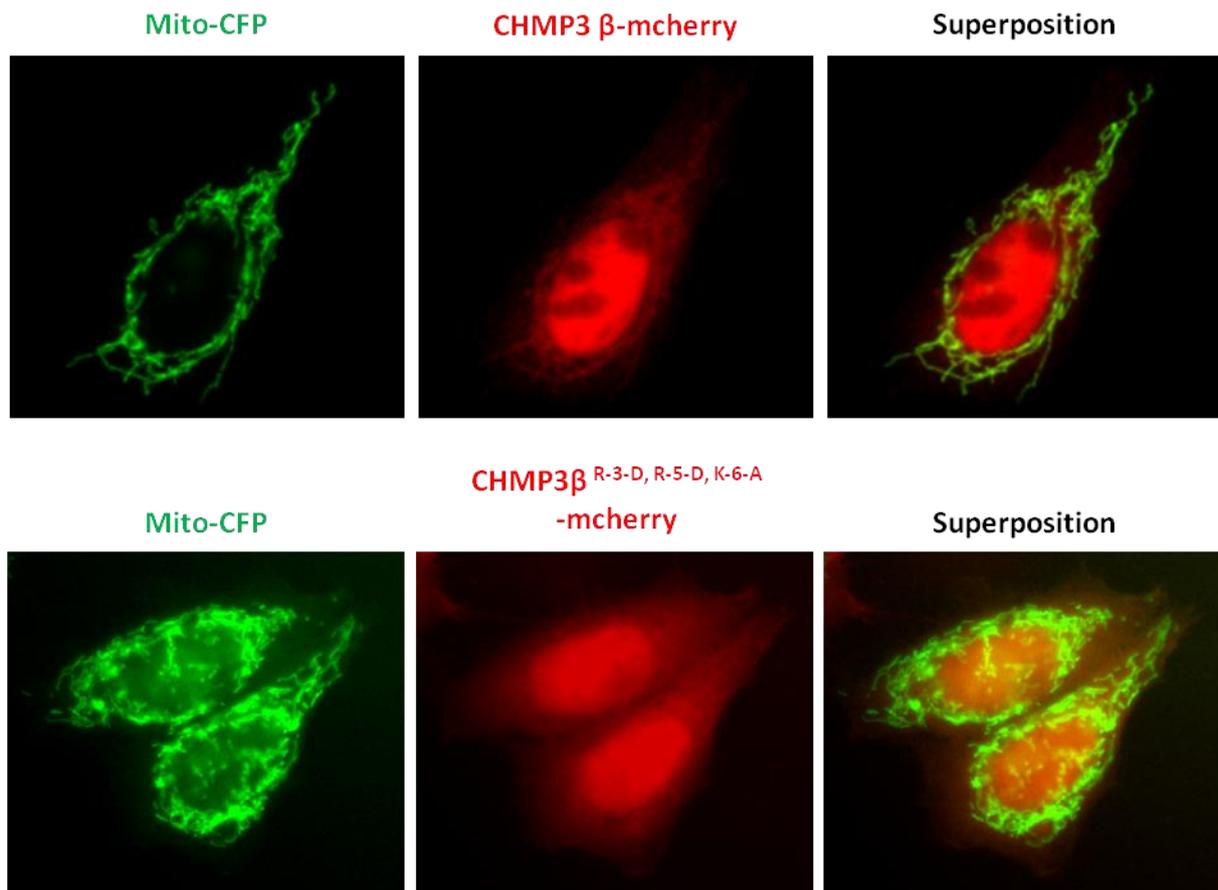
**D:** Une banque d'ADN complémentaire a été générée par RT-PCR à partir d'un lysat de cerveau de rat adulte au moyen d'hexamères aléatoires (random hexamers). Une PCR a été ensuite effectuée à partir de cette banque d'ADNc en utilisant une amorce s'hybridant spécifiquement sur le brin anti-sens au niveau de la jonction exon1-exon3 présente uniquement dans l'ARN messenger de CHMP3β (flèches rouges en A), et une seconde amorce sur le brin anti-sens au niveau de l'exon 4. La spécificité du signal a été vérifiée en utilisant l'ADNc de CHMP3 comme matrice.

Khoury et collaborateur ont identifié CHMP3β à partir d'un ADN complémentaire (ADNc) humain, mais n'ont pas réussi à détecter cet ARN par RT PCR dans les 8 organes humains qu'ils ont testés. Nous avons donc vérifié l'existence de cet ARNm dans les tissus

humains. Tout d'abord par une approche *in silico* (collaboration avec Christoph Bosc: GIN équipe 1). Un marqueur de séquence exprimée, ou Expressed Sequence Tag (EST), est une courte portion [séquencée](#) d'ADNc. Nous avons criblé les EST présents dans la base de données de NCBI à la recherche de ceux correspondant à CHMP3 $\beta$ . Vingt-six ARNm ont été identifiés confirmant ainsi la présence de cet ARN dans des tissus humains comme le cerveau, la trachée, le thymus les testicules, le cœur (figure 32C). Nous avons ensuite vérifié son expression dans le cerveau de rat par RT PCR (figure 32D).

L'analyse de la séquence protéique de CHMP3 $\beta$  par l'algorithme Mitoprot estime à 98% la probabilité de la présence d'un peptide signal d'import à la mitochondrie en N-terminal de CHMP3 $\beta$ , alors que cette probabilité n'est que de 7% pour CHMP3. Cette prédiction est confirmée par l'expression dans des cellules Hela de CHMP3 $\beta$  fusionné à la protéine mCherry à son extrémité carboxy-terminale. Dans certaines cellules il y a une franche colocalisation de CHMP3 $\beta$  mcherry avec les mitochondries (figure 33)

La grande majorité des protéines importées dans la mitochondrie possèdent à leur extrémité N-terminale un peptide signal d'import riche en résidus basiques ou hydroxylés. Ce peptide signal est « masqué » par les 66 premiers acides aminés de CHMP3. Ces acides aminés sont absents dans CHMP3 $\beta$ , le peptide signal n'est donc pas camouflé, ce qui permet l'import de la protéine. Les mutations ponctuelles R-3-D, R-5-D, K-6-A dans ce peptide signal font chuter la probabilité d'import estimée par mitoprot de 98% à 6%. CHMP3 $\beta$ <sup>R-3-D, R-5-D, K-6-A</sup> mcherry ne présente aucune co-localisation avec les mitochondries (Fig). Ces données confirment l'hypothèse selon laquelle elle pourrait être adressée vers le système d'import dans la mitochondrie via un peptide signal en N-ter de la protéine. Toutefois, la présence de CHMP3 $\beta$  à l'intérieur des mitochondries reste à confirmer par l'approche biochimique. Il semble donc bien y avoir des protéines de types ESCRTIII qui soient importées dans les mitochondries.



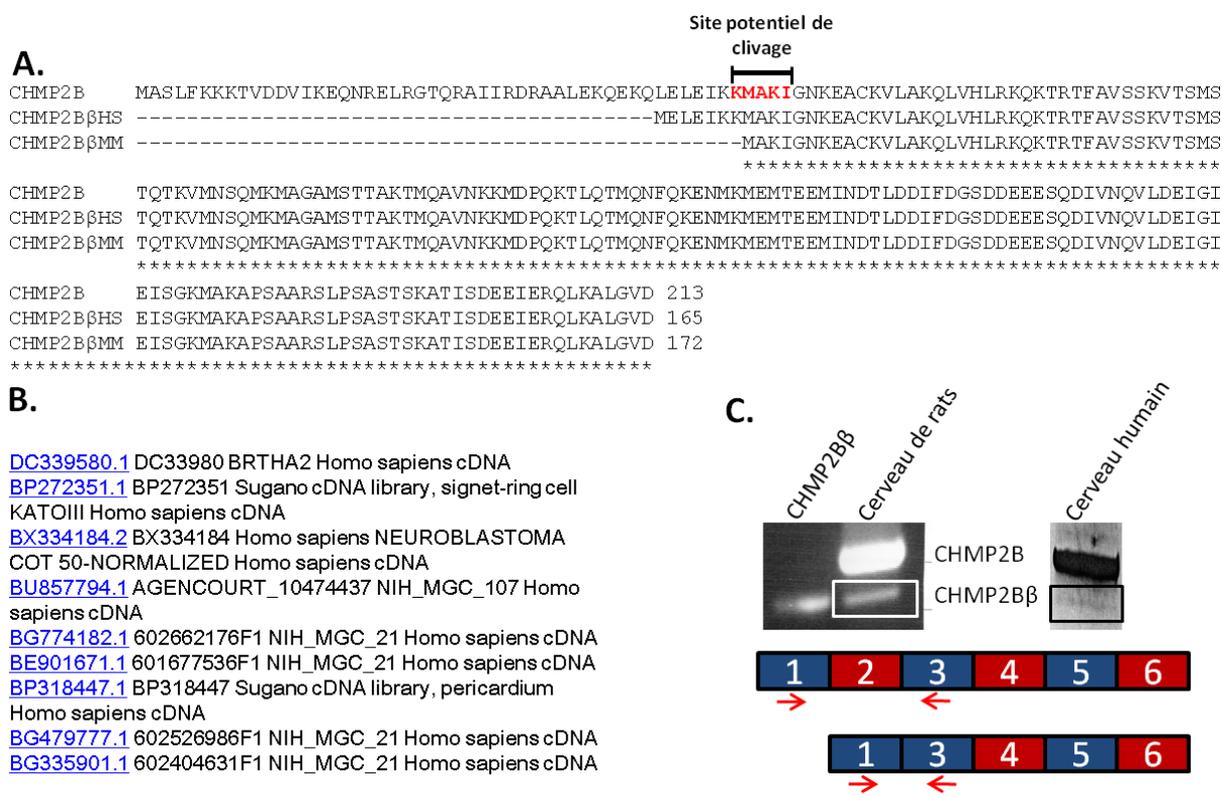
**Figure 33: L'extrémité N-terminale de CHMP3 $\beta$  est requise pour son adressage aux mitochondries.**

CHMP3 $\beta$ -mcherry ou CHMP3 $\beta$ <sup>R-3-D, R-5-D, K-6-A</sup>-mcherry sont cotransfectées avec le marqueur mitochondrial Mito-CFP. CHMP3 $\beta$ -mcherry est concentré aux mitochondries alors que le mutant CHMP3 $\beta$ <sup>R-3-D, R-5-D, K-6-A</sup> présente une distribution diffuse.

Même si la présence de CHMP3 $\beta$  à l'intérieur des mitochondries reste à confirmer par l'approche biochimique, ces données confirment l'hypothèse selon laquelle elle pourrait être adressée vers le système d'import dans la mitochondrie via un peptide signal en N-ter de la protéine, inaccessible dans CHMP3 mais « démasqué » par épissage alternatif. Il semble donc bien y avoir des protéines de types ESCRTIII qui soient importées dans les mitochondries.

- **CHMP2B**

Dans les levures, l'homologue de CHMP3 (vps24) interagit directement avec celui de CHMP2 (Vps2). L'ARN messager de CHMP2B ne pourrait-il donc pas lui aussi subir le même type de maturation au niveau de l'exon 2 pour donner un ARNm codant pour un variant de CHMP2B (CHMP2B $\beta$ ) qui serait importé dans les mitochondries. Cette protéine pourrait donc être à l'origine du signal à 24 kDa reconnu par l'anticorps dirigé contre CHMP2B, et fortement enrichi dans la fraction mitochondriale de cerveau de rat (figure 27C). Le marquage observé en microscopie immuno-électronique pourrait donc provenir de CHMP2B $\beta$ . Cette information serait d'autant plus importante que cette nouvelle protéine serait elle aussi mutée en C-ter chez les patients atteints de FTD3 liée au gène *chmp2b*.



**Figure 34: Comme pour CHMP3, l'ARNm de CHMP2B peut subir une excision de l'exon 2 pour donner naissance à CHMP2B $\beta$ , qui correspond à CHMP2B tronquée dans sa partie Nterminale.**

**A:** Alignements des séquences prédites des protéines issue de l'ARNm de CHMP2B:

Humain non épissé (CHMP2B), Humain avec excision de l'exon 2 (CHMP2B $\beta$ HS), ou Murin avec excision de l'exon 2 (CHMP2B $\beta$ MM).

**B:** Expressed Sequence Tag (EST) humains présents dans la base de donnée NCBI correspondant à l'ARN messager codant pour CHMP2B $\beta$ .

**C:** Une banque d'ADN complémentaire de rat a été générée par RT-PCR à partir d'un lysat de cerveau de rat adulte au moyen d'hexamères aléatoires (random hexamers). Une série de PCR sont effectuées à partir de cet ADNc de cerveau de rat ou d'un ADNc de cerveau humain en utilisant une amorce s'hybridant sur le brin anti-sens au niveau de l'exon1 et une autre sur le brin sens au niveau de l'exon 3. La différence de taille des fragments amplifiés due à l'absence de l'exon 2 sur l'ARNm de CHMP2B $\beta$  est visible sur gel d'agarose. La bande

correspondant à CHMP2B $\beta$  ( bande dans le carré) a été découpée, purifiée sur colonne puis séquencée pour vérifier l'excision de l'exon 2.

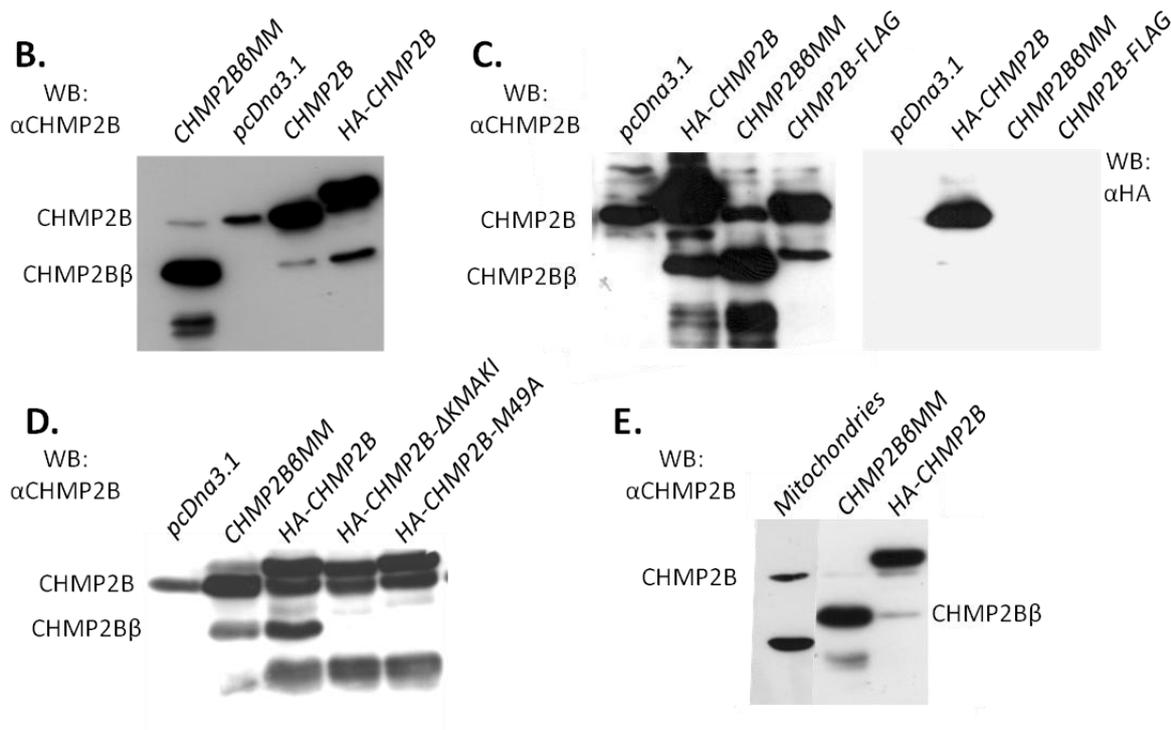
La recherche *in silico* a permis d'identifier 9 ARNm correspondant à celui de CHMP2B privé de l'exon 2 issus de cerveau, de carcinomes, de neuroblastomes, et de cœur humain (figure 34B). L'existence de ces ARNs a été vérifiée par RT PCR à partir d'ADNc issus de cerveau humain, ou de rats Whistar adultes (figure 34C). Chez l'homme, cet ARN coderait une protéine (CHMP2B $\beta$ HS) équivalente à CHMP2B privé de ses 42 premiers acides aminés (figure 34A) Mais contrairement à CHMP3 $\beta$ , la probabilité qu'elle soit importée dans la mitochondrie est très faible, seulement 8%. Il est à remarquer que, chez les rongeurs, CHMP2B $\beta$ MM serait un peu plus courte de 6 acides aminés, et sa probabilité d'être importée dans la mitochondrie monte alors à 80%.

Dans les deux cas, les ARN codant pour CHMP2B $\beta$  extrêmement faiblement représenté par rapport à celui codant pour CHMP2B.

#### **Chez l'homme l'équivalent de CHMP2B $\beta$ MM est généré par clivage.**

Il est possible que la cellule humaine puisse produire une protéine similaire à CHMP2B $\beta$ , de manière régulée, sans avoir recours à un épissage alternatif, simplement par clivage de CHMP2B. En effet CHMP2B $\beta$  correspond à CHMP2B tronquée en N-terminal, donc un clivage après la lysine 48 générerait un équivalent exact de CHMP2B $\beta$ MM. Or de nombreuses protéines comme le récepteur rétinolique X (RXR), le récepteur au glucocorticoïde (GR), le cytochrome P4501A1 (CYP1A1) et p53 subissent un clivage dans le cytosol qui libère un peptide signal cryptique et permet leur import dans la mitochondrie (Casas et al., 2003; Koufali et al., 2003). Boopathi et collaborateurs ont identifié un dimère de sérines protéases, P90 et P40 responsables d'un clivage de CYP1A1 qui démasque un peptide signal d'import vers la mitochondrie (Boopathi et al., 2008). Ils ont ensuite cherché d'autres protéines susceptibles d'être importées dans la mitochondrie suite à un clivage par ces sérine-protéases. Ladite protéine devait être connue pour être importée vers la mitochondrie, et contenir un site potentiel de clivage par une sérine protéase dans sa partie Nterminale. Ce site devait être conservé entre le rat, la souris, et l'humain, et se situer immédiatement en amont d'un peptide signal d'import vers la mitochondrie. Ils ont ainsi identifié RXR $\alpha$ , GR et p53 et ont montré qu'ils sont importés dans la mitochondrie suite à leurs clivages par p40 et P90.





**Figure 35: CHMP2B est clivé entre les acides aminés 48 et 52.**

**A :** Conservation du site de clivage potentiel chez les mammifères.

**B, C, D :** Des cellules Hek 293T sont transfectées par le plasmide pcDna3.1 vide ou portant les différentes constructions de CHMP2B indiquées. Les lysats sont analysés par western blot au moyen d'un anticorps dirigé contre les 15 derniers acides aminés de CHMP2B ou d'un anticorps anti-HA, comme indiqué.

**E :** Les mitochondries de cerveau de rat sont déposées en parallèle de lysats de cellules Hek 293T surexprimant CHMP2B $\beta$  ou HA-CHMP2B et révélés par l'anticorps dirigé contre CHMP2B. Le signal dans la piste des mitochondries étant plus faible, elle est présentée avec une exposition plus longue que les deux autres.

Le clivage est complètement aboli par la délétion (HA-CHMP2B $\Delta$ KMAKI) ou une mutation (HA-CHMP2B $M^{49S}$ ) de ce site (figure 35D). CHMP2B est donc bien clivé entre l'acide aminé 48 et 52. Le mutant pathogène CHMP2B $^{intron5}$  subit lui aussi ce clivage (données non montrées).

Ce clivage n'a pas encore été observé quand la protéine n'est pas surexprimée.

### 3.3. CHMP2B et fission mitochondriale.

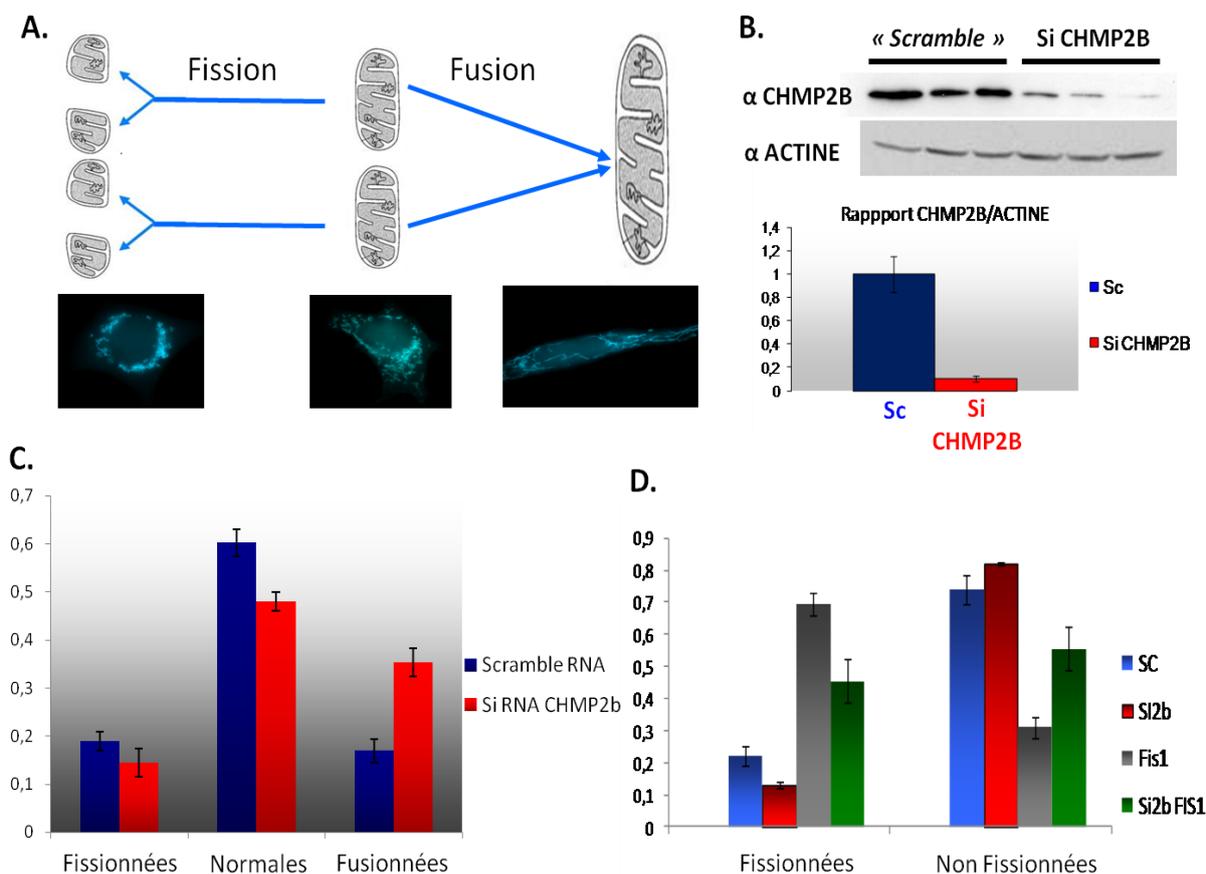
#### - Cellules Hela

En parallèle des études menées sur la localisation mitochondriale de CHMP2B nous avons cherché à savoir si elle jouait un rôle dans la physiologie de ces organelles. Le complexe ESCRT III est impliqué dans divers processus de fission membranaire (génèse des corps multi-vésiculés, bourgeonnement des virus enveloppés, cytokinèse). Or les mitochondries sont des organelles extrêmement dynamiques en équilibre constant entre

fission et fusion (Campello and Scorrano; Cho et al.) et des perturbations de cet équilibre semblent être impliquées dans la plupart des maladie neurodégénératives (Su et al.; Chen and Chan, 2009). Cette dynamique implique d'importants processus de remodelage membranaire encore peu connus. Vu la présence d'une fraction de CHMP2B et de CHMP3b dans les mitochondries, nous avons cherché à savoir si la machinerie ESCRTIII pouvait être impliquée dans ces processus.

La morphologie des mitochondries est dictée par cet équilibre constant entre leur fission et fusion. L'analyse de la forme des mitochondries permet donc de mettre en évidence l'altération de ces processus (figure 36A) (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Même s'il existe une certaine variabilité au sein d'une même cellule, les morphologies sont suffisamment homogènes pour permette la classification des cellules en fonction de la forme générale leurs mitochondries. Suite aux différents traitements, les mitochondries ont été marquées puis analysées par microscopie à fluorescence. Elles ont été classées en 3 types de morphologies : fissionnées, intermédiaires, longues (un exemple type de chaque morphologie est présenté figure36A).

L'extinction de CHMP2B par SiRNA dans des cellules Hela (confirmée par western blot figure 36B) provoque une augmentation significative de la proportion de cellules avec des mitochondries de type allongées (figure 36C), ce qui suggère que CHMP2B pourrait jouer un rôle dans la dynamique mitochondriale. FIS1 (Mitochondrial Fission 1 Protein) est une protéine de la membrane externe de la mitochondrie, impliquée dans la fission de cette organelle probablement en recrutant DRP1 (Dynamine Related Protein 1)(Yoon et al., 2003), GTPase de la famille de la Dynamine responsable de la fission mitochondriale(Santel and Frank, 2008). La surexpression de FIS1 provoque la fragmentation des mitochondries (Stojanovski et al., 2004), mais cet effet est fortement inhibé dans les cellules où l'expression de CHMP2B a été au préalable éteinte par SiRNA (figure36D). CHMP2B semble donc être requis pour le l'équilibre morphologique des mitochondries.



**Figure 36: L’extinction de CHMP2B augmente la proportion de cellules Hela avec des mitochondries « allongées ».**

**A:** Schéma représentatif de l’équilibre entre fusion et fission mitochondriale. Chaque morphologie est illustrée par un exemple de cellules Hela où les mitochondries ont été marquées par la transfection de Mito-CFP.

**B et C:** Quantification de l’impact de l’extinction de CHMP2B sur les morphologies des mitochondries de cellules Hela. 72 heures après transfection d’un SiRNA dirigés contre l’ARNm de CHMP2B ou d’un SiRNA contrôle (Scrambled), les lamelles sont prélevées, fixées puis analysé par immunofluorescence. **B :** Les cellules au fond de chaque puits sont lysées et analysés par Western Blot pour vérifier l’extinction de CHMP2B. Le signal de chaque bande est quantifié par densitométrie et le rapport CHMP2B sur Actine est calculé pour chaque lysat n=8. **C:** Les cellules sont classées dans les différentes catégories en fonction de la morphologie globale de leurs mitochondries, par comptage au microscope à épi-fluorescence effectué sans savoir quel traitement a été appliqué à quel échantillon.

**D:** Les cellules sont d’abord traitées par SiRNA contre CHMP2B ou contrôle, 48heures plus tard elles sont transfectées par le vecteur vide (pcDNA3) ou pcDNA3-HA-FIS1, puis traitées et analysées comme pour B et C.

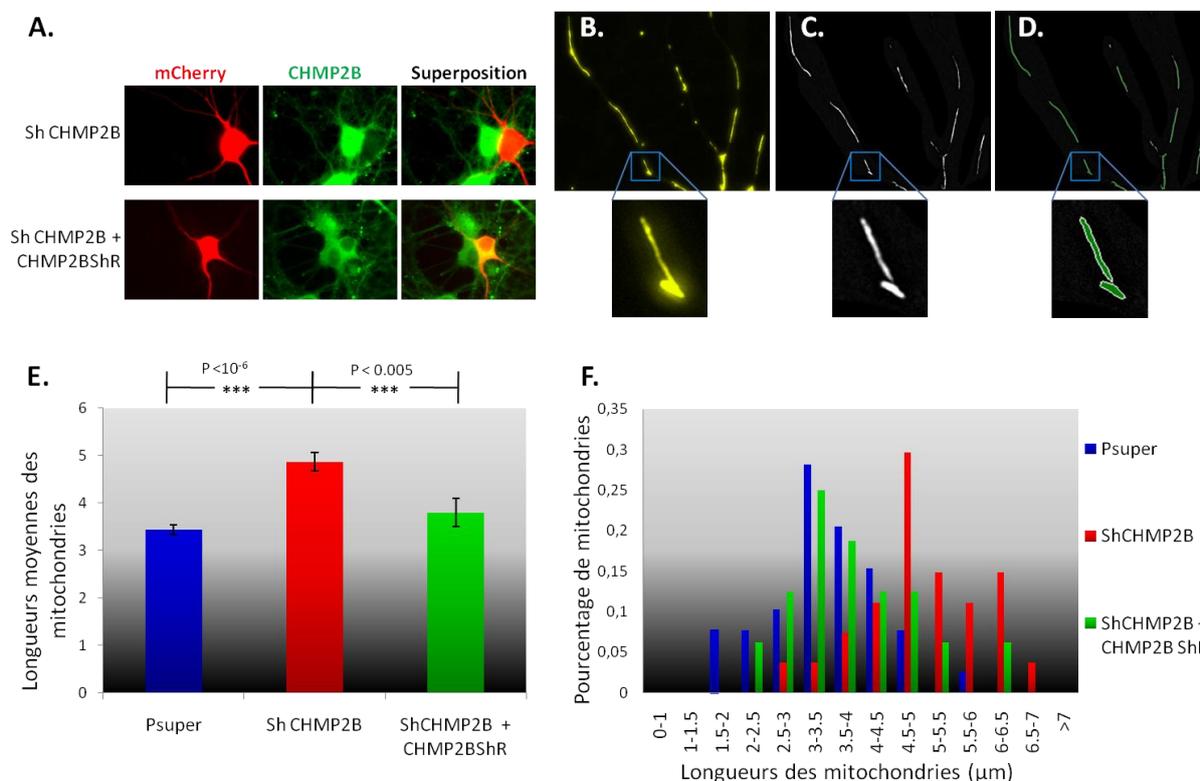
- **Rôle de CHMP2B dans la morphologie des mitochondries de neurones d’hippocampe.**

Afin de confirmer ces résultats nous avons tenté de mettre au point une quantification morpho-métrique de la forme des mitochondries. Les cellules Hela ne sont pas avérées être un bon modèle, la résolution verticale de nos microscopes ne nous permettant pas de ségréger les mitochondries qui se chevauchent, il est très difficile de les isoler pour les mesurer. Nous avons donc mené cette étude sur des neurones d'hippocampe qui de par leur morphologie permettent de limiter ce chevauchement en alignant les mitochondries le long des axes que forment leurs neurites, et donc de diminuer cet effet.

L'expression de CHMP2B est éteinte dans des neurones d'hippocampe de rat en culture par transfection à 10 Jours *In Vitro* (JIV) d'un ShRNA (small hairpinRNA) dirigé contre l'ARNm codant. Les neurones sont fixés 5 jours plus tard (15JIV) et analysés par microscopie à fluorescence. Le plasmide pSuper portant les CHMP2B-shRNA, permet de repérer les neurones transfectés puisqu'il porte le gène codant la protéine mCherry. L'extinction est vérifiée par immunomarquage en cyanine5 du soma à l'aide de l'anticorps anti CHMP2B. Les mitochondries quant à elles ont été marquées par cotransfection avec mito-CFP. Des piles d'images de neurites proximaux sont acquises pour chaque neurone. On procède à la projection de des maxima de chaque pile sur un plan. L'image obtenue est ensuite soumise à la transformation numérique dite du chapeau haut de forme (top hat) pour éliminer les variations lentes du signal et augmenter les contrastes afin de mieux isoler les mitochondries (figure 37A). Les objets (mitochondries) sont ensuite identifiés par seuillage manuel. Les tailles ainsi mesurées correspondent à ce qui a été décrit dans la littérature par d'autres approches *ie* entre 2 $\mu$ m et 6 $\mu$ m (Popov et al., 2005; Young et al., 2008). La taille moyenne des mitochondries augmente de 40% (3,5 $\mu$ m pour le contrôle, 4,9 $\mu$ m pour ShCHMP2B) suite à l'extinction de CHMP2B (figure 37B). Cette différence est due à une augmentation générale de la taille des mitochondries et une perte des mitochondries de faible taille dans cette population (figure 37C). La spécificité de cet effet est confirmée par la co-expression avec les CHMP2B-shRNA, d'un ADNc CHMP2B, muté de manière ponctuelle qui code un ARNm résistant aux shRNA. La taille moyenne des mitochondries et la distribution de ces tailles est restaurée par cette coexpression. CHMP2B semble donc bien jouer un rôle dans la morphologie des mitochondries probablement via une implication dans les processus de fission ou fusion mitochondriale.

Ce phénotype demande toutefois à être confirmé par d'autres techniques comme l'utilisation de marqueur mitochondriaux photo-convertibles permettant de séparer de

manière plus sûre les mitochondries. En effet ces marqueurs changent de spectre d'émission suite à leur activation par un laser. Leur diffusion étant restreinte au sein de la mitochondrie « stimulée » ils permettent de l'isoler des mitochondries adjacentes. L'utilisation de ces marqueurs photo-convertibles couplés à la vidéo microscopie permettrait aussi d'observer si la perte de CHMP2B induit une probabilité de fusion accrue ou une inhibition de la fission des mitochondries.



**Figure 37: L'extinction de CHMP2B provoque l'allongement des mitochondries de neurones d'hippocampe en culture.**

**A:** Les neurones d'hippocampe de rats ont été triplement transfectés par (1):le plasmide pSuper vide ou portant un ARN interférent dirigé contre CHMP2B (ShCHMP2B), (2):le plasmide pcDna3.1 vide ou portant une séquence codant pour un ARNm de CHMP2B résistant à l'ARN interférant ( CHMP2B ShR) et (3) Mito-CFP. Le plasmide pSuper porte le gène mcherry ce qui permet d'identifier les neurones transfectés. L'extinction de CHMP2B ou sa restauration par CHMP2B ShR sont vérifiées au niveau du soma par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-CHMP2B.

**B:** Les mitochondries présentes dans des neurites de neurones d'hippocampe de rats ont été marquées par la transfection de Mito-CFP. L'image représente la projection des maxima d'intensités provenant d'une série de plan acquis en Z au microscope à épifluorescence.**C:** L'image B à été soumise à la transformation numérique dite du chapeau haut de forme (top hat).**D:** Les images sont acquises et traitées comme décrit en A et B puis les objets sont identifiés par seuillage des intensités (seuls sont mesurés les objets dont la longueur est supérieure à 0,8μm).

**E:** Les paramètres morphologique sont mesurés par le logiciel Metamorph (Psuper + pcDna3.1 n=20, ShCHMP2B+pcDna3.1 n=15; ShCHMP2B + CHMP2B SHR n=10). Les probabilités de différences entre les populations ont été évaluées par le test de Student, corrigé en fonction des comparaisons multiples par la méthode de Bonferonni.

**F:** Distribution de la taille des mitochondries en fonction de leur longueur.

Ces impacts de la suppression de CHMP2B sur la morphologie des mitochondries pourraient donc indiquer un rôle de la possible faible fraction de CHMP2B importée dans les mitochondries. Mais il est aussi possible que CHMP2B agisse « par l'extérieur », voire très indirectement.

#### **4. Purification de nouveaux interacteurs neuronaux de CHMP2B**

Jusqu'à présent, différents mécanismes ont été décrits comme pouvant être à l'origine de l'apparition de FTD3 chez les patients porteurs des mutations sur le gène *chmp2b* (problèmes d'autophagie (Ahmad et al., 2009; Lee and Gao, 2009), inhibition de la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Urwin et al., 2010a), modification morphologiques des épines dendritiques (Belly et al., 2010)). Mais les mécanismes moléculaires à l'origine de ces phénomènes sont encore obscurs. Leur compréhension actuelle est basée sur l'homologie structurale et fonctionnelle qui existe entre les différents CHMPs, les études de la mécanistique d'ESCRTIII menées chez *Saccharomyces Cerevisiae*, et les phénotypes cellulaires des mutants pathogènes. Peu de littérature sinon aucune, n'aborde directement le fonctionnement moléculaire de CHMP2B. Par exemple aucun de ses partenaires n'a été clairement caractérisé excepté VPS4B (Stuchell-Brereton et al., 2007). Les mutants pathogènes de CHMP2B ont perdu cette interaction ce qui semble être au moins en partie à l'origine de la pathologie. Or une portion conséquente de la protéine est manquante chez ces mutants (16% pour *CHMP2B<sup>intron5</sup>*). D'autres interactions importantes pour la physiologie neuronale pourraient donc aussi être perdues chez ces mutants. Savoir avec qui CHMP2B accomplit ses fonctions cellulaires, est donc de première importance pour la compréhension de sa mécanistique et de la pathologie.

Nous avons donc cherché à identifier les partenaires neuronaux de CHMP2B par une approche biochimique consistant à reconstituer ces interactions sur colonne d'affinité. Nous avons choisi d'utiliser le système Strep-TagII qui présente le double avantage d'être très propre puisque l'élution se fait par compétition, et rapide puisque l'ensemble de la purification est accomplie en une heure. Ces expériences sont menées en parallèle avec 3 protéines recombinantes: Strep-TagCHMP2B, Strep-Tag-CHMP2B<sup>intron5</sup> et Strep-tag fusionné à la partie C-terminal de CHMP2B (Strep-tagCHMP2B<sup>CT177</sup>) manquante dans CHMP2B-intron5 (acides aminés 177 à 213). Ces protéines sont chargées sur colonnes Strep-Tactine (voir

matériels et méthodes). Un extrait soluble de cerveau de rat (voir matériels et méthodes) est ensuite passé dans ces colonnes, qui sont ensuite abondamment lavées. Le principe étant que les protéines ayant une affinité spécifique pour CHMP2B devraient s'y lier et être éluées avec ce dernier. Les éluats ainsi que le dernier lavage (qui sert de contrôle de spécificité d'éluion) sont récupérés en sortie de colonne puis séparés sur gel SDS-PAGE, et coloré au nitrate d'argent. Ne sont retenues que les bandes présentes dans les éluats et absentes dans les lavages correspondants.

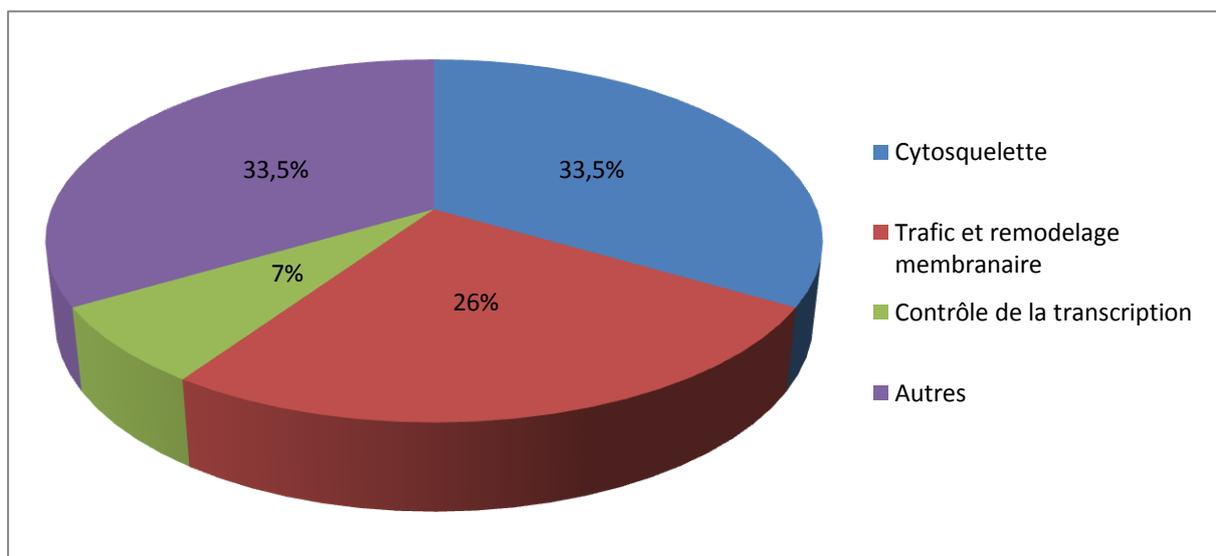
Onze bandes correspondant à ces critères (figr...) ont ainsi été découpées puis analysées par spectrométrie de masse (collaboration avec M. Louwagie et J. Garin).

Les résultats sont récapitulés tableau 5. Vingt sept protéines ont ainsi pu être identifiées.

**Tableau5: Partenaires potentiels de CHMP2B identifiés par spectrométrie de masse**

Strep-tag-CHMP2B-CT	Strep-tag-CHMP2B
---------------------	------------------

<p>78 kDa glucose-regulated protein precursor  Hsp70 / 17 days pregnant adult female amnion  cDNA  ADP-ribosylation factor 5  Actin-related protein 2/3 complex subunit 4  Tubulin beta-2A chain  Histidine triad nucleotide-binding protein 1  Profilin-1  Rab11A  Rab6A  Peroxioredoxin-2  Proteasome subunit beta type-6  precursor  Vesicle-associated membrane protein 3  Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7</p>	<p>Tubulin beta-2C chain  Tubulin alpha-1A chain  Tubulin alpha-4A chain  Elongator complex protein 1  WD repeat-containing protein 7  Tubulin beta-5 chain  Dynactin subunit 1  Type II keratin Kb1  Tubulin alpha-4A chain  Heat shock 70kD protein 5  Bromodomain adjacent to zinc finger domain  protein 1B  Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7  AP-2 complex subunit beta-1  AP-2 complex subunit alpha-2  Contactin-1 precursor  Alpha-adducin  AP-2 complex subunit alpha-1</p>
--	---



<p><b>Trafic et remodelage membranaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ADP-ribosylation factor 5</li> <li>-Rab11A</li> <li>-Rab6A</li> <li>-Vesicle-associated membrane protein 3</li> <li>-AP-2 complex subunit beta-1</li> <li>-AP-2 complex subunit alpha-2</li> <li>-AP-2 complex subunit alpha-1</li> <li>-Hsc70</li> </ul> <p><b>Cytosquelette</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Tubulin beta-2A chain</li> <li>-Tubulin beta-2C chain</li> <li>-Tubulin alpha-1A chain</li> <li>-Tubulin alpha-4A chain</li> <li>-Tubulin beta-5 chain</li> <li>-Actin-related protein 2/3 complex subunit 4</li> <li>-Dynactin subunit 1</li> <li>-Profilin-1</li> <li>-Alpha-adducin</li> </ul>	<p><b>Transcription</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Elongator complex protein 1</li> <li>-Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1B</li> </ul> <p><b>Autres</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Contactin-1 precursor</li> <li>-78 kDa glucose-regulated protein precursor</li> <li>-Histidine triad nucleotide-binding protein1</li> <li>-WD repeat-containing protein 7</li> <li>-Peroxioredoxin-2</li> <li>-Proteasome subunit beta type-6 precursor</li> <li>-Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7</li> </ul>
--	--

Les deux tiers des protéines identifiés participent à des processus de trafics vésiculaires, et de remodelages membranaires (33,5%), ou sont des composants (Tubuline) ou des régulateurs (de l'Actine) du cytosquelette (33,5%) (tableau 6). Or CHMP2B a directement été impliqué dans ces différents types de processus (fusion des endosomes tardifs aux lysosomes (Urwin et al., 2010a), déformations membranaires (Article2 de cette thèse), dynamique du centrosome et maintien du fuseau mitotique (Morita et al., 2010) maintenance de l'actine corticale (Vaccari et al., 2009)). Certaines de ces protéines pourraient donc participer à diverses actions de CHMP2B, mais ces interactions devront être confirmées par d'autres approches.



# Discussion

ESCRT-III constitue un système ancestral et original de remodelage membranaire à topologie inversée (à courbure négative). L'utilisation de cet outil s'est diversifiée au cours de l'évolution des eucaryotes, permettant l'apparition de nouveaux processus cellulaires (genèse des CMV, autophagie, dynamique du centrosome...). Par ailleurs, certains pathogènes comme un grand nombre de virus enveloppés ont aussi su tirer profit de cet appareillage pour accomplir leur cycle de multiplication.

Il y a fort à parier que des implications du système ESCRT dans d'autres fonctions cellulaires restent encore à découvrir. Le premier article de cette thèse met en lumière l'implication de la sous-unité CHMP2B dans la morphogénèse neuronale.

## ***1. Les mutants de CHMP2B associés à une démence fronto-temporale altèrent la maturation des épines dendritiques***

CHMP2B est le premier et jusqu'à présent l'unique composant d'ESCRT-III à avoir été décrit comme ayant une responsabilité directe dans la survenue de maladies neurodégénératives.

Dans les neurones pyramidaux d'hippocampe en culture, CHMP2B endogène est distribué de manière homogène et cytoplasmique dans l'axone, les dendrites et les épines dendritiques. En biochimie, l'expression de CHMP2B augmente avec la maturation des ces neurones, ce qui est compatible avec un rôle de CHMP2B dans la biologie des épines.

Lee et collaborateurs ont montré que la surexpression des mutants de CHMP2B reliés à la DFT entraîne une mort rapide et massive des neurones (Lee et al., 2007b). Une telle toxicité aiguë ne semble toutefois pas fournir une explication satisfaisante pour comprendre la survenue d'une maladie qui se déclare aux alentours de 50 ans.

Nous avons montré qu'en diminuant la quantité de protéine exprimée, les neurones peuvent survivre longtemps après la transfection des mutants reliés à la DFT. On observe alors des altérations plus fines de leur physiologie:

Les mutants forment des agrégats de tailles variables, localisés dans le soma et les neurites proximales, qui ne sont pas des endosomes. Dans le cas du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup>, CHMP2B endogène est en partie piégé dans ces agrégats.

L'expression des mutants de CHMP2B n'affecte pas la longueur moyenne des épines. En revanche, ils induisent une augmentation de la densité linéaire et une diminution du diamètre moyen des têtes des épines dendritiques. Le mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> provoque une augmentation du nombre des épines fines et une diminution de la proportion des épines larges de type mushroom. Le mutant CHMP2B<sup>Δ10</sup> quant à lui, provoque une diminution de la densité des épines de type mushroom et stubby.

Conformément à ces observations, les mesures des fréquences et de l'amplitude des mini-courants postsynaptiques excitateurs nous indiquent que l'expression du mutant CHMP2B<sup>Δ10</sup> provoque une diminution des courants de large amplitude ( $i > 20$  pA) et une augmentation des courants de faible amplitude ( $i < 5$  pA). L'expression de ce mutant provoque donc la réduction de la proportion de synapses fortes, au profit de celle des synapses faibles, ce qui corrèle avec les modifications morphologiques observées sur les épines.

L'extinction de CHMP2B provoque des phénotypes comparables aux mutants (augmentation de la densité des épines dendritiques, diminution du diamètre moyen des épines dendritiques). Ces mutants pathogènes de CHMP2B agissent donc comme des dominants négatifs au regard de la fonction de CHMP2B dans la morphogénèse des épines dendritiques.

Ce travail a été mené dans des neurones d'hippocampe en culture, transfectés à 10 jours de vie *in vitro* (DIV) et observés à 15 DIV. C'est à cette période que se produisent la spinogénèse et la synaptogénèse. Il n'est donc pas possible de déterminer si CHMP2B est nécessaire à la mise en place, ou au maintien des épines matures. Une série de mêmes expériences de classification morphologique des épines a été réalisées par Yves Goldberg sur des neurones transfectés après la spinogénèse et la synaptogénèse (15 DIV, observés à 21 DIV). Les mêmes effets ont été observés, ce qui suggère que CHMP2B intervient bien

dans le maintien morphologique des épines ; mais cela n'exclut pas qu'elle ait aussi un rôle dans leur morphogénèse.

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, les premiers signes des DFT provoquées par des mutations de CHMP2B pourraient donc être des altérations morphologiques et fonctionnelles des épines dendritiques. Ces modifications pourraient à terme être délétères pour les neurones et seraient alors au moins en partie responsables de la maladie.

L'altération d'ESCRT induit des dysfonctionnements de l'autophagie. Lee et collaborateurs ont remarqué que, dans leurs conditions, l'expression des mutants de CHMP2B provoque l'accumulation d'autophagosomes. Ils ont aussi montré que l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'autophagie ralentit la mort des neurones dans leur modèle de toxicité aigüe (Lee and Gao, 2009). Nous n'avons pas relevé d'altération massive de l'autophagie dans nos conditions. Il reste toutefois possible qu'il y en ait une qui ne soit pas détectable. Il serait donc intéressant de voir si l'autophagie peut jouer un rôle dans les altérations morphologiques des épines que nous venons de décrire en l'inhibant.

## ***2. Les partenaires potentiels de CHMP2B suggèrent de nouvelles les fonctions pour cette protéine.***

Les expériences de pull down à partir d'un homogénat de cerveau de rat nous a permis d'identifier des partenaires potentiels de CHMP2B. Ces interactions ne sont que des indications et devront être confirmées. Certaines d'entre elles sont toutefois en relation directe avec la morphologie des épines ou des fonctions connues d'ESCRT-III.

### ***2.1. CHMP2B et remodelage du cytosquelette d'actine.***

Les expériences de pull down à partir d'un homogénat de cerveau de rat nous ont permis d'identifier des partenaires potentiels de CHMP2B qui pourraient participer à son action sur les épines dendritiques. La sous-unité 4 du complexe ARP2/3 a été identifiée en complexe avec la partie C-terminale de CHMP2B. ARP2/3 est un complexe formé de 7 sous-

unités, jouant un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actine. ARP2/3 sert de site de nucléation pour les filaments d'actine, il permet l'émergence d'un nouveau filament fils à partir d'un filament père, et ainsi la création d'un réseau branché de filaments d'actine. La formation d'un réseau de filaments d'actine est particulièrement requise pour le grossissement et le maintien des épines dendritiques. Le complexe ARP2/3 joue une rôle clé dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques (Kim et al., 2006b) ; il est notamment nécessaire au grossissement de la tête (Hotulainen et al., 2009). De plus, le phénotype des épines de neurones déficients en ARP2/3 ressemble à celui induit par l'extinction de CHMP2B, ou l'expression de ses mutants. CHMP2B via son interaction avec le complexe ARP2/3, intervient-elle dans la régulation de la nucléation des filaments d'actine ?

De plus, chez la drosophile, le KO de VPS2/CHMP2B déstabilise le réseau d'actine sous-corticale (Vaccari et al., 2009). Dans les cellules Hela surexprimant CHMP2B, on observe fréquemment une réorganisation du cytosquelette d'actine en patch sous la membrane plasmique, aux sites d'émergence des tubes CHMP2B (données non montrées). Que ce soit par l'intermédiaire ou non du complexe ARP2/3, CHMP2B semble donc influencer la polymérisation ou l'organisation du cytosquelette d'actine. CHMP2B pourrait donc jouer un rôle direct sur la plasticité morphologique des épines par son action sur le cytosquelette d'actine.

## **2.2. Implication de CHMP2B dans le recyclage de protéines membranaires**

Notre recherche de partenaires de CHMP2B nous a permis de montrer une possible interaction entre la partie C-terminale de CHMP2B et Rab11a. Cette petite GTPase joue un rôle important dans le trafic des endosomes de recyclage (Saraste and Goud, 2007), notamment au corps intermédiaire lors de la cytokinèse. Ce partenariat pourrait participer à l'action du complexe ESCRT-III lors de la séparation des cellules filles.

D'autre part, dans les neurones, Rab11 est impliquée dans le trafic des endosomes de recyclage au sein même des épines dendritiques et joue un rôle majeur dans le processus de potentialisation à long terme (Brown et al., 2007; Wang et al., 2008). Un article récent montre aussi l'implication d'ESCRT-I et d'ESCRT-III dans le recyclage du récepteur à l'EGF

dans des lignées cellulaires (Baldys and Raymond, 2009). CHMP2B pourrait donc être impliquée dans le tri et le recyclage des protéines membranaires notamment au niveau de l'épine.

### **2.3. CHMP2B et ubiquitine .**

Nous avons identifié USP7 ou HAUSP (Herpes virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease) comme un interacteur potentiel de la partie C-terminale de CHMP2B. Cette désubiquitinyllase régule P53 (protéine majeure de contrôle du cycle cellulaire) et est impliquée dans le cycle du virus de l'Herpes et le virus d'Epstein Barr. Le bourgeonnement de ces virus requiert ESCRT-III, mais le mécanisme de recrutement de ce complexe au site de sortie du virus est encore inconnu. L'interaction entre CHMP2B et USP7 pourrait-elle être impliquée dans ces processus ?

D'autres désubiquitinyllases comme UBPY et AMSH (Associated molecule with the SH3 domain of STAM) sont recrutées par ESCRT-III, et régulent la dégradation du récepteur à l'EGF. De plus AMSH semble pouvoir activer CHMP3 en se liant à l'extrémité C-terminale de ce dernier. USP7 semblant interagir avec la même région de CHMP2B, il serait intéressant de déterminer si elle participe à son activation.

## **3. Implication de CHMP2B dans la dynamique des mitochondries**

Les mitochondries sont des organelles extrêmement dynamiques. Elles se divisent activement (fission), fusionnent avec d'autres mitochondries (fusion) et sont transportées activement dans les axones et les dendrites. Les fissions et fusions mitochondriales sont importantes pour maintenir leurs propriétés électriques et biochimiques, et pour l'intégrité de l'ADN mitochondrial. Des anomalies de cette dynamique ont été impliquées notamment dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson et de nombreuses maladies neurodégénératives (Knott et al., 2008).

Dans les cellules Hela comme dans les neurones d'hippocampe, l'extinction de CHMP2B endogène par sh-RNA provoque une augmentation de la longueur moyenne des mitochondries, qui peut être abolie par l'expression de la forme résistante aux sh-RNA de CHMP2B. Ces résultats suggèrent que CHMP2B inhibe la fusion ou plus probablement favorise la fission des mitochondries. Or, tout comme CHMP2B, la dynamique mitochondriale participe au maintien de l'épine (Li et al., 2004b).

Ainsi, le rôle de CHMP2B dans le maintien des épines dendritiques pourrait impliquer la modulation de l'équilibre entre fission et fusion des mitochondries. Il serait donc intéressant de regarder si l'augmentation de la fission mitochondriale, par exemple par la surexpression de DRP1, peut restaurer la morphologie des épines dans les neurones traités par le sh-RNA de CHMP2B.

Même si l'analyse des cerveaux de souris en microscopie électronique a suggéré la présence de CHMP2B dans les mitochondries, les nombreuses expériences que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de le confirmer, ni de l'infirmier. Le doute persiste donc en ce qui concerne son possible import dans les mitochondries. Les mécanismes reliant CHMP2B et la morphologie mitochondriale sont encore obscurs, et pourraient en fait être indirects. Par exemple les mitochondries sont éliminées par autophagie, et la machinerie de fission mitochondriale est un partenaire important de ce processus (Twig et al., 2008). Il est donc facilement imaginable qu'une altération même minime de l'autophagie par les mutants de CHMP2B provoque une modification de la morphologie des mitochondries.

### ***Formes courtes de CHMP2B et CHMP3.***

Khoury et collaborateurs ont identifié un variant de CHMP3 privé des 66 premiers acides aminés de la protéine (CHMP3 $\beta$ ) (Khoury et al., 2007). L'ARNm codant pour cette protéine est généré par excision de l'exon 2 de CHMP3. Nous avons vérifié l'existence de cet ARN, montré que la protéine est recrutée aux mitochondries et certainement importée à l'intérieur de ces organelles grâce à un peptide signal situé à son extrémité N-terminale. Khoury et collègues ont montré la capacité de CHMP3 $\beta$  à protéger les levures contre la mort induite par BAX, qui est un système artificiel semblable à l'apoptose. Nous avons tenté de savoir si CHMP3 $\beta$  avait un potentiel protecteur dans des cellules de mammifères, et ainsi

d'expliquer sa réelle fonction. Ces expériences préliminaires menées par Chantal Thibert au laboratoire n'ont pas permis de conclure à un effet inhibiteur de la surexpression de CHMP3 $\beta$  sur l'apoptose induite par BAX (données non montrées). Nous n'avons pas non plus observé d'effet massif de sa surexpression sur la morphologie mitochondriale. La fonction de ce variant reste donc encore à confirmer.

En ce qui concerne CHMP2B, nous avons pu montrer la présence dans le cerveau d'ARNm pouvant coder pour un variant court. Ce variant serait lui aussi affecté par les mutations reliées à la DFT. Mais la traduction de cette protéine résultante de l'épissage alternatif reste à confirmer, d'autant plus que cet ARNm est présent dans des proportions infimes par rapport à celui de CHMP2B.

La découverte d'un clivage de CHMP2B au site correspondant au début de CHMP2B $\beta$ MM est intrigante. Ce clivage pourrait démasquer le site cryptique de CHMP2B $\beta$ MM dont la probabilité d'import dans la mitochondrie est estimée à 80%. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de montrer l'import de ce fragment dans les mitochondries de cellules Hela. De plus, CHMP2B $\beta$ MM-mcherry surexprimé dans les cellules Hela présente une distribution cytosolique. D'autres expériences, notamment par purification de mitochondries dans des cellules surexprimant CHMP2Bwt ou les constructions mutées sur le site de clivage (CHMP2B<sup>M49S</sup>) toutes deux taggées en C-terminal, pourraient permettre de montrer cet import.

Mais ce clivage pourrait jouer un tout autre rôle, en déstabilisant CHMP2B. En effet, ce site de coupure se situe au cœur de la structure de la protéine, au niveau de l'épingle à cheveux reliant la première hélice à la deuxième. Il est fortement probable que ce clivage déstabilise la protéine et surtout qu'il abolisse sa capacité à s'intégrer au sein de complexes ESCRT-III. Cette coupure pourrait donc être un moyen de réguler la polymérisation de CHMP2B. L'endo-protéase responsable de ce clivage n'est pas encore identifiée, mais la Calpaïne 7 est un candidat intéressant puisqu'elle est recrutée au complexe ESCRT-III via son domaine MIT, et que son interaction avec IST1 potentialise son activité protéolytique (Osako et al., 2010).

## **4. Remodelage membranaire par des assemblages supramoléculaires de CHMP2B.**

Les études menées chez la levure concernant l'assemblage d'ESCRT-III montrent que le remodelage membranaire exécuté par ce complexe est assuré par Vps32/CHMP4. Vps2 n'est qu'une protéine adaptatrice spécialisée dans le recrutement de Vps4, ne participant apparemment pas directement à la déformation membranaire (Teis et al., 2008; Wollert et al., 2009a). Le deuxième article présenté dans cette thèse montre que la mécanistique des complexes ESCRT-III est différente chez les mammifères. En effet, l'homologue humain de Vps2 (CHMP2B) possède la capacité particulière de se polymériser pour déformer les membranes en longs tubes.

### **4.1. Ultra-structure des tubes composés de CHMP2B.**

L'analyse par microscopie électronique de ces tubes montre que les membranes sont intimement liées à une structure tubulaire sous-jacente fortement enrichie en CHMP2B, qui présente des striations perpendiculaires à l'axe du tube. Cette texture révèle ainsi que ces assemblages sont formés d'un ou plusieurs filaments protéiques qui s'enroulent de manière très régulière pour former une hélice creuse. Ces structures sont très proches de celles que forment CHMP2A en se polymérisant avec CHMP3 *in vitro* (Lata et al., 2008b; Bajorek et al., 2009b) ; les pas des hélices identiques (32 Å), et l'extrémité C-terminale de CHMP2B y est semblablement orientée vers la lumière du tube. Ces cylindres peuvent conserver le même diamètre et rester parfaitement rectiligne sur plusieurs dizaines de microns, ce qui dénote une forte rigidité, confirmée par l'observation de leur dynamique par vidéo-microscopie. D'autre part, contrairement aux structures formées par CHMP2A et CHMP3 *in vitro*, un même tube CHMP2B peut être composé de segments de diamètres différents sans altération visible du pas ou de la structure de l'hélice. Cette observation suggère que ce diamètre n'est pas figé et que d'autres facteurs cellulaires peuvent l'influencer. Cette modification peut être par exemple le fruit d'une composition différente du filament entre les segments, ou de l'action d'un facteur cytosolique capable de modifier la compaction de l'hélice. Dans ce dernier scénario, ces structures pourraient participer à la constriction de membranes indépendamment de la scission. Par exemple, au cours de la cytokinèse, elle

pourrait participer à la diminution du diamètre du corps intermédiaire précédant l'étape de scission.

Dans chaque structure observée, la surface externe des tubes est étroitement liée à la monocouche interne de la membrane. Un des tubes présente même une forte constriction locale, où la membrane y reste associée alors même que le rayon de courbure perpendiculaire à l'axe du tube s'abaisse à environ 10nm. Ces observations démontrent ces structures comportent donc des caractéristiques physiques nécessaires à la fission membranaire, une forte affinité pour les membranes, et une capacité à induire de fortes courbures membranaires.

Le processus par lequel ESCRT-III provoque la fission de membranes est encore inconnu. Un modèle énergétiquement plausible, proposé par Fabrikant et collaborateurs (Fabrikant et al., 2009), implique la formation d'un échafaudage protéique similaire à ceux que nous avons observé se terminant en un hémisphère de forte affinité avec les membranes. La formation de telles structures au niveau du cou de bourgeons membranaires serait suffisante pour induire la fission de la membrane. Nous avons observé des structures semblables recouvertes de membrane à l'extrémité de certains tubes, mais il nous est impossible de déterminer si elles résultent d'une fission de la membrane.

#### **4.2. CHMP2B déforme la membrane plasmique.**

De manière inattendue, les fortes tubulations induites par la surexpression de CHMP2B se forment exclusivement à la membrane plasmique. Aucune des autres études impliquant la surexpression de CHMP2B ou des mutants de cette protéine reliés aux DFT ne mentionne l'apparition de telles structures, ni même le recrutement de ces protéines à la surface de la cellule. Cette différence s'explique par le fait que les protéines exprimées dans ces travaux portent une étiquette à leur extrémité N-terminale. Si ce peptide ne semble pas interférer avec des propriétés de dominant négatif de certains mutants de CHMP2B (sur le trafic endosomal et l'autophagie), elle abolit sa capacité à former des tubes. Comme nous l'avons montré, l'intégrité de la séquence des dix acides aminés qui précèdent la première hélice de CHMP2B est essentielle à sa capacité de former des tubes *in vivo*. L'étude des tubes formés par CHMP2A et CHMP3 suggère que dans ces structures, l'extrémité N-

terminale de CHMP2A est dirigée vers la surface externe du cylindre. Cette portion de la protéine pourrait donc être impliquée dans l'interaction avec les membranes.

Le complexe ESCRT-III permet le bourgeonnement de certains virus, mais n'a pas jusqu'ici été impliqué dans des processus physiologiques de remodelage membranaire à la surface de la cellule. L'extinction de VPS4 A et B qui permet de bloquer le désassemblage d'ESCRT-III nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de CHMP2B endogène à la surface de la cellule. Ces résultats montrent que le recrutement de CHMP2B à la membrane plasmique n'est pas un artéfact de surexpression, mais qu'il y révèle la présence de complexes de type ESCRT-III qui contiennent CHMP2B et sont dissociés par VPS4.

En 2008, Hanson et collaborateurs (Hanson et al., 2008) ont décrit la polymérisation de CHMP4A ou CHMP4B en fins filaments qui s'enroulent en spirale plate sur la face cytosolique de la membrane plasmique. Ils ont aussi montré que la coexpression d'un mutant inactif de VPS4B avec ces protéines induisait la formation de tubes au centre de ces structures qui déformaient la membrane vers l'extérieur de manière semblable aux remodelages induits par la surexpression de CHMP2B. Nos observations en immunofluorescence et en microscopie électronique des tubes CHMP2B indiquent une répartition différentielle de ces différentes protéines, avec CHMP4A à la base, CHMP2 formant la matrice du tube qui concentre VPS4 à l'intérieur. Ces observations nous conduisent donc à proposer le modèle d'assemblage suivant : CHMP4 est recruté à la membrane plasmique par un facteur encore indéterminé. Il se polymérise en spirale qui forme une plateforme chargée du recrutement de CHMP2B, et de sa polymérisation en tubes capables de remodeler la membrane. VPS4 permettrait la dissociation de ce complexe mais pourrait aussi jouer un rôle dans l'assemblage des tubes en activant CHMP2B par sa liaison à l'extrémité C-terminale de cette dernière.

CHMP2B pourrait ainsi participer à différents processus de remodelage de la membrane plasmique, qui n'ont pas encore été reliés à ESCRT-III. Dans le cas où le tube se formeraient au cou d'une membrane en bourgeonnements, ils pourraient participer à des vésiculations de la membrane plasmique (Heijnen et al., 1999; Cocucci et al., 2009). Si ces tubes émergent au niveau d'une membrane plane, ils ne provoqueraient pas de fission mais

pourraient participer à des processus de morphogenèse cellulaire comme celle décrite pour les épines dendritiques dans le premier article de cette thèse.

Jusqu'ici, CHMP2B était considéré comme un parent pauvre des processus de remodelage membranaire générés par le complexe ESCRT-III. Son rôle était alors limité au recyclage des sous-unités de ce complexe par VPS4. La perte de cette propriété d'adaptateur moléculaire entre l'ATPase et son substrat pouvait expliquer l'implication de mutants de CHMP2B dans la démence fronto-temporale et l'amyotrophie latérale spino-cervicale par une altération du trafic endocyttaire, et/ou de l'autophagie. Le travail présenté dans cette thèse a permis de montrer le potentiel morphogène de cette protéine qui semble jouer un rôle fondamental dans la physiologie neuronale:

D'une part CHMP2B est requis pour l'établissement, le maintien et peut être la plasticité des épines dendritiques. Cette propriété pourrait participer à l'apparition des symptômes et à la dégénérescence progressive des neurones, causées par la survenue de mutations dans le gène codant pour cette protéine.

D'autre part, l'augmentation de quantité cytosolique CHMP2B démontre la capacité de cette protéine à former des assemblages supramoléculaires capables de modeler la membrane plasmique.

Le rapport entre ces deux propriétés est encore obscur. La caractérisation de partenaires des complexes formés de cette protéine et la relation avec d'autres facteurs de remodelage membranaire comme ceux que nous avons proposés, semblent indispensables à la compréhension de ce lien.

La participation directe de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans des processus de déformation de la membrane plasmique a été largement sous-estimée. Elle pourrait avoir de nombreuses implications physiologiques comme dans la morphogenèse des épines dendritiques, ou des vésiculations de la surface cellulaires, ou pathologiques expliquant le lien entre CHMP2B et certaines maladies neurodégénératives.





# **Bibliographie**

## A.

- Aboud EKALG (1949) Colorimetric Estimation of Succinic Dehydrogenase by Triphenyltetrazolium Chloride. *Science* 109:144-146.
- Agromayor M, Carlton JG, Phelan JP, Matthews DR, Carlin LM, Ameer-Beg S, Bowers K, Martin-Serrano J (2009) Essential role of hIST1 in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 20:1374-1387.
- Ahmad ST, Sweeney ST, Lee JA, Sweeney NT, Gao FB (2009) Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12168-12173.
- Ahmed S, Goh WI, Bu W I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol* 21:350-356.
- Ahmed S, Goh WI, Bu W (2010) I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol* 21:350-356.
- Ai E, Skop AR (2009) Endosomal recycling regulation during cytokinesis. *Commun Integr Biol* 2:444-447.
- Alam SL, Langelier C, Whitby FG, Koirala S, Robinson H, Hill CP, Sundquist WI (2006) Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol* 13:1029-1030.
- Alam SL, Sun J, Payne M, Welch BD, Blake BK, Davis DR, Meyer HH, Emr SD, Sundquist WI (2004) Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J* 23:1411-1421.
- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2007) Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci* 27:7365-7376.
- Andersen R, Li Y, Resseguie M, Brenman JE (2005) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters structural plasticity and cytoskeletal dynamics in *Drosophila*. *J Neurosci* 25:8878-8888.
- Aniento F, Emans N, Griffiths G, Gruenberg J (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 123:1373-1387.
- Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M (1997) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* 36:4675-4684.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611.
- Arduino DM, Esteves AR, Oliveira CR, Cardoso SM Mitochondrial metabolism modulation: a new therapeutic approach for Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:105-119.
- Arikkath J, Reichardt LF (2008) Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31:487-494.
- Asao H, Sasaki Y, Arita T, Tanaka N, Endo K, Kasai H, Takeshita T, Endo Y, Fujita T, Sugamura K (1997) Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *J Biol Chem* 272:32785-32791.
- Azmi I, Davies B, Dimaano C, Payne J, Eckert D, Babst M, Katzmann DJ (2006) Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J Cell Biol* 172:705-717.
- Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ (2008) ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev Cell* 14:50-61.

## B.

- Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD (2000) Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1:248-258.

- Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD (2002a) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3:283-289.
- Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002b) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3:271-282.
- Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H (2003) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 162:435-442.
- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3272-3277.
- Bajorek M, Morita E, Skalicky JJ, Morham SG, Babst M, Sundquist WI (2009a) Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 20:1360-1373.
- Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, Stubblefield WM, Uter NT, Myszka DG, Hill CP, Sundquist WI (2009b) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 16:754-762.
- Baker M et al. (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442:916-919.
- Baldys A, Raymond JR (2009) Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. *Biochemistry* 48:9321-9323.
- Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS (1992) The acoustic cortex in Alzheimer's disease. *Acta otolaryngologica* 494:1-13.
- Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS (1995) Synaptic alterations in acoustic cortex in Creutzfeldt-Jacob disease. *Acta Otolaryngol* 115:202-205.
- Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS (2001) The acoustic cortex in frontal dementia. *Acta Otolaryngol* 121:289-292.
- Balut CM, Gao Y, Murray SA, Thibodeau PH, Devor DC ESCRT-Dependent targeting of plasma membrane localized KCa3.1 to the lysosomes. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719-734.
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425:821-824.
- Belly A, Bodon G, Blot B, Bouron A, Sadoul R, Goldberg Y (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci* 123:2943-2954.
- Bereiter-Hahn J, Voth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27:198-219.
- Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T, Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* 273:21883-21892.
- Bieniasz PD (2009) The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5:550-558.
- Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 4:534-539.
- Bilodeau PS, Winistorfer SC, Kearney WR, Robertson AD, Piper RC (2003) Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol* 163:237-243.
- Blomberg F, Cohen RS, Siekevitz P (1977) The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. II. Characterization and arrangement of some of the major proteins within the structure. *The Journal of cell biology* 74:204-225.
- Bo H, Zhang Y, Ji LL (2010) Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1201:121-128.
- Boopathi E, Srinivasan S, Fang JK, Avadhani NG (2008) Bimodal protein targeting through activation of cryptic mitochondrial targeting signals by an inducible cytosolic endoprotease. *Mol Cell* 32:32-42.

- Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381-386.
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28:245-259.
- Bronfman FC, Escudero CA, Weis J, Kruttgen A (2007) Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol* 67:1183-1203.
- Brown TC, Correia SS, Petrok CN, Esteban JA (2007) Functional Compartmentalization of Endosomal Trafficking for the Synaptic Delivery of AMPA Receptors during Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 27:13311-13315.
- Brown WJ, Chambers K, Doody A (2003) Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4:214-221.
- Bryant NJ, Stevens TH (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:230-247.
- Burgoyne RD, Barclay JW (2002) Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends Neurosci* 25:176-178.

## C.

- Cajal. Roy (1888) Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Patol*:1–10.
- Campello S, Scorrano L Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep*.
- Campello F, McMahon HT, Kozlov MM (2008) The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys J* 95:2325-2339.
- Carlson LA, Briggs JA, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Muller B, Grunewald K, Krausslich HG (2008) Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* 4:592-599.
- Carlton JG, Martin-Serrano J (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316:1908-1912.
- Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J (2008) Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10541-10546.
- Casas F, Daury L, Grandemange S, Busson M, Seyer P, Hatier R, Carazo A, Cabello G, Wrutniak-Cabello C (2003) Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha1 proteins. *FASEB J* 17:426-436.
- Catala I, Ferrer I, Galofre E, Fabregues I (1988) Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in dementia. A quantitative Golgi study on biopsy samples. *Human neurobiology* 6:255-259.
- Chatellard-Causse C, Blot B, Cristina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R (2002) Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem* 277:29108-29115.
- Chen C, Vincent O, Jin J, Weisz OA, Montelaro RC (2005) Functions of early (AP-2) and late (AIP1/ALIX) endocytic proteins in equine infectious anemia virus budding. *J Biol Chem* 280:40474-40480.
- Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18:R169-176.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72:175-207.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2005) Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* 123:375-382.
- Chernomordik LV, Kozlov MM (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:675-683.
- Chernomordik LV, Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) Membranes of the world unite! *J Cell Biol* 175:201-207.

- Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 325:169-182.
- Cho DH, Nakamura T, Lipton SA Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*.
- Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD (2006) New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol* 175:815-823.
- Chung HY, Morita E, von Schwedler U, Muller B, Krausslich HG, Sundquist WI (2008) NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPYL late domains. *J Virol* 82:4884-4897.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19:43-51.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5401-5404.
- Connell JW, Lindon C, Luzio JP, Reid E (2009) Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* 10:42-56.
- Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci* 22:2215-2224.
- Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF, Heath PR, Higginbottom A, Mortiboys H, Hollinger HC, Hartley JA, Brockington A, Burness CE, Morrison KE, Wharton SB, Grierson AJ, Ince PG, Kirby J, Shaw PJ (2010) Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 5:e9872.
- Cruts M et al. (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442:920-924.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.
- Daleke DL (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem* 282:821-825.
- Dautry-Varsat A (1986) Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie* 68:375-381.

## D.

- de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen* 51:391-405.
- De Roo M, Klauser P, Mendez P, Poglia L, Muller D (2008) Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex* 18:151-161.
- De Ruiter JP, Uylings HB (1987) Morphometric and dendritic analysis of fascia dentata granule cells in human aging and senile dementia. *Brain research* 402:217-229.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464.
- Demirov DG, Freed EO (2004) Retrovirus budding. *Virus Res* 106:87-102.
- Demirov DG, Ono A, Orenstein JM, Freed EO (2002) Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:955-960.
- Dimaano C, Jones CB, Hanono A, Curtiss M, Babst M (2008) Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Mol Biol Cell* 19:465-474.
- Doxsey SJ (2005) Molecular links between centrosome and midbody. *Mol Cell* 20:170-172.
- Doyotte A, Russell MR, Hopkins CR, Woodman PG (2005) Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* 118:3003-3017.

- Dubreuil V, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB, Wilsch-Brauninger M (2007) Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* 176:483-495.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4363-4367.
- Dukes JD, Richardson JD, Simmons R, Whitley P (2008) A dominant-negative ESCRT-III protein perturbs cytokinesis and trafficking to lysosomes. *Biochem J* 411:233-239.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13438-13443.

## E.

- Efrat A, Chernomordik LV, Kozlov MM (2007) Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway. *Biophys J* 92:L61-63.
- Ehrlich I, Malinow R (2004) Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24:916-927.
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4176-4181.
- Einstein G, Buranosky R, Crain BJ (1994) Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. *J Neurosci* 14:5077-5088.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368.
- El Hachimi KH, Foncin JF (1990) [Loss of dendritic spines in Alzheimer's disease]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences* 311:397-402.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Eskelinen EL (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1:1-10.

## F.

- Fabbro M, Zhou BB, Takahashi M, Sarcevic B, Lal P, Graham ME, Gabrielli BG, Robinson PJ, Nigg EA, Ono Y, Khanna KK (2005) Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell* 9:477-488.
- Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JA, Weissenhorn W, Kozlov MM (2009) Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 5:e1000575.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP, Jr. (1991) Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* 11:3877-3887.
- Ferrer I, Gullotta F (1990) Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta neuropathologica* 79:680-685.
- Ferrer I, Roig C, Espino A, Peiro G, Matias Guiu X (1991) Dementia of frontal lobe type and motor neuron disease. A Golgi study of the frontal cortex. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 54:932-934.
- Fiala BA, Joyce JN, Greenough WT (1978) Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats. *Experimental neurology* 59:372-383.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fifkova E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *The Journal of cell biology* 95:345-350.

- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EMC, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007a) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179:485-500.
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007b) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179:485-500.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
- Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP (2007) Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128:841-852.
- Fisher RD, Wang B, Alam SL, Higginson DS, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* 278:28976-28984.
- Fujii K, Hurley JH, Freed EO (2007) Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat Rev Microbiol* 5:912-916.
- Fujii K, Munshi UM, Ablan SD, Demirov DG, Soheilian F, Nagashima K, Stephen AG, Fisher RJ, Freed EO (2009) Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* 391:284-292.

## G.

- Gallop JL, McMahon HT (2005) BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*:223-231.
- Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Freire M (2007) The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in neurobiology* 83:110-130.
- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55-65.
- Gass J et al. (2006) Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet* 15:2988-3001.
- Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394:432-433.
- Gertz HJ, Cervos-Navarro J, Ewald V (1987) The septo-hippocampal pathway in patients suffering from senile dementia of Alzheimer's type. Evidence for neuronal plasticity? *Neurosci Lett* 76:228-232.
- Geuze HJ, Slot JW, Schwartz AL (1987) Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol* 104:1715-1723.
- Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short JM, Pobbati AV, Veprintsev DB, Crowther RA, Emr SD, Egelman EH, Williams RL (2008) Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 16:1345-1356.
- Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams RL (2007) Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J* 26:600-612.
- Gonciarz MD, Whitby FG, Eckert DM, Kieffer C, Heroux A, Sundquist WI, Hill CP (2008) Biochemical and structural studies of yeast Vps4 oligomerization. *J Mol Biol* 384:878-895.
- Graham TR, Kozlov MM (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr Opin Cell Biol* 22:430-436.
- Grant B, Zhang Y, Paupard MC, Lin SX, Hall DH, Hirsh D (2001) Evidence that RME-1, a conserved C. elegans EH-domain protein, functions in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 3:573-579.
- Gray EG (1959) Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183:1592-1593.
- Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM (1973) Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Experimental neurology* 41:371-378.

- Griffiths G, Simons K (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234:438-443.
- Gromley A, Jurczyk A, Sillibourne J, Halilovic E, Mogensen M, Groisman I, Blomberg M, Doxsey S (2003) A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J Cell Biol* 161:535-545.
- Gromley A, Yeaman C, Rosa J, Redick S, Chen CT, Mirabelle S, Guha M, Sillibourne J, Doxsey SJ (2005) Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell* 123:75-87.
- Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M (2000) Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Mol Cell Biol* 20:3125-3136.
- Gruenberg J, Howell KE (1987) An internalized transmembrane protein resides in a fusion-competent endosome for less than 5 minutes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5758-5762.
- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 108:1301-1316.

## H.

- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141:656-667.
- Halpain S (2000) Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci* 23:141-146.
- Hanley JG (2010) Endosomal sorting of AMPA receptors in hippocampal neurons. *Biochem Soc Trans* 38:460-465.
- Hanson PI, Shim S, Merrill SA (2009) Cell biology of the ESCRT machinery. *Curr Opin Cell Biol* 21:568-574.
- Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* 180:389-402.
- Harris K, Stevens J (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685-2705.
- Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP (2000) A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13871-13876.
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Durr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J (1999) Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23:296-303.
- He L, Lu XY, Jolly AF, Eldridge AG, Watson SJ, Jackson PK, Barsh GS, Gunn TM (2003) Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* 299:710-712.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94:3791-3799.
- Helfrich P, Jakobsson E (1990) Calculation of deformation energies and conformations in lipid membranes containing gramicidin channels. *Biophys J* 57:1075-1084.
- Helfrich W (1973) Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch C* 28:693-703.

- Hering H, Lin CC, Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.
- Hewitt EW, Duncan L, Mufti D, Baker J, Stevenson PG, Lehner PJ (2002) Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. *EMBO J* 21:2418-2429.
- Heymann JA, Hinshaw JE (2009) Dynamins at a glance. *J Cell Sci* 122:3427-3431.
- Hicke L (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106:527-530.
- Hierro A, Sun J, Rusnak AS, Kim J, Prag G, Emr SD, Hurley JH (2004) Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* 431:221-225.
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD (1991) Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American journal of medical genetics* 41:289-294.
- Hirano S, Kawasaki M, Ura H, Kato R, Raiborg C, Stenmark H, Wakatsuki S (2006a) Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol Biol* 13:272-277.
- Hirano S, Suzuki N, Slagsvold T, Kawasaki M, Trambaiolo D, Kato R, Stenmark H, Wakatsuki S (2006b) Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol* 13:1031-1032.
- Hobel CF, Albers SV, Driessen AJ, Lupas AN (2008) The *Sulfolobus solfataricus* AAA protein Sso0909, a homologue of the eukaryotic ESCRT Vps4 ATPase. *Biochem Soc Trans* 36:94-98.
- Hofmann K, Falquet L (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26:347-350.
- Holopainen JM, Lehtonen JY, Kinnunen PK (1999) Evidence for the extended phospholipid conformation in membrane fusion and hemifusion. *Biophys J* 76:2111-2120.
- Hopkins CR, Trowbridge IS (1983) Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 97:508-521.
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpaa K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P (2009) Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology* 185:323-339.
- Hughes CA, Byrne PC, Webb S, McMonagle P, Patterson V, Hutchinson M, Parfrey NA (2001) SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q. *Neurology* 56:1230-1233.
- Hurley JH (2010) The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.
- Hurley JH, Hanson PI Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:556-566.
- Hurley JH, Hanson PI (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:556-566.
- Hutchins JR et al. Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 328:593-599.
- Hutton M et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.
- Im YJ, Hurley JH (2008) Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev Cell* 14:902-913.
- Im YJ, Wollert T, Boura E, Hurley JH (2009) Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev Cell* 17:234-243.
- Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170:1021-1027.
- Inoue M, Kamikubo H, Kataoka M, Kato R, Yoshimori T, Wakatsuki S, Kawasaki M (2008) Nucleotide-dependent conformational changes and assembly of the AAA ATPase SKD1/VPS4B. *Traffic* 9:2180-2189.

- Irie T, Inoue M, Sakaguchi T Significance of the YLDL motif in the M protein and Alix/AIP1 for Sendai virus budding in the context of virus infection. *Virology* 405:334-341.
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *American journal of medical genetics* 98:161-167.
- Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Krausslich HG, Eils R, Rohr K, Brauchle C, Muller B, Lamb DC (2009) Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog* 5:e1000652.

## J.

- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-643.
- Jin Y, Mancuso JJ, Uzawa S, Cronembold D, Cande WZ (2005) The fission yeast homolog of the human transcription factor EAP30 blocks meiotic spindle pole body amplification. *Dev Cell* 9:63-73.
- Johnson LM, Bankaitis VA, Emr SD (1987) Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of a yeast vacuolar protease. *Cell* 48:875-885.
- Jourdain A, Martinou JC (2009) Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1884-1889.
- Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM (2008) Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454:236-240.

## K.

- Kang MH, Reynolds CP (2009) Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15:1126-1132.
- Karbowski M (2010) Mitochondria on guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 687:131-142.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368.
- Kato M, Miyazawa K, Kitamura N (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J Biol Chem* 275:37481-37487.
- Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145-155.
- Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD (2003) Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 162:413-423.
- Khoury CM, Yang Z, Ismail S, Greenwood MT (2007) Characterization of a novel alternatively spliced human transcript encoding an N-terminally truncated Vps24 protein that suppresses the effects of Bax in an ESCRT independent manner in yeast. *Gene* 391:233-241.
- Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E, De Domenico I, Ward DM, Kaplan J, Sundquist WI (2008) Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell* 15:62-73.
- Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin LS, Li L (2007) Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* 18:1129-1142.
- Kim J, Sitaraman S, Hierro A, Beach BM, Odorizzi G, Hurley JH (2005) Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell* 8:937-947.
- Kim S, Burette A, Chung HS, Kwon S-K, Woo J, Lee HW, Kim K, Kim H, Weinberg RJ, Kim E (2006a) NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *J Biol Chem* 281:1294-1301.

- Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P (2006b) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442:814-817.
- Klionsky DJ, Banta LM, Emr SD (1988) Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase: proteinase A propeptide contains vacuolar targeting information. *Mol Cell Biol* 8:2105-2116.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9:505-518.
- Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E (2002) Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34:265-273.
- Korobova F, Svitkina T (2010) Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21:165-176.
- Kostelansky MS, Sun J, Lee S, Kim J, Ghirlando R, Hierro A, Emr SD, Hurley JH (2006) Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. *Cell* 125:113-126.
- Kostelansky MS, Schluter C, Tam YY, Lee S, Ghirlando R, Beach B, Conibear E, Hurley JH (2007) Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129:485-498.
- Koufali MM, Moutsatsou P, Sekeris CE, Breen KC (2003) The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 209:51-60.
- Kozlov MM (2001) Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic* 2:51-65.
- Kozlov MM, Chernomordik LV (2002) The protein coat in membrane fusion: lessons from fission. *Traffic* 3:256-267.
- Kozlov MM, McMahon HT, Chernomordik LV (2010) Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem Sci*.
- Krauss M, Jia JY, Roux A, Beck R, Wieland FT, De Camilli P, Haucke V (2008) Arf1-GTP-induced tubule formation suggests a function of Arf family proteins in curvature acquisition at sites of vesicle budding. *J Biol Chem* 283:27717-27723.
- Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, Okabe S (2006) Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci* 26:7693-7706.
- Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, Thery M, Pellman D (2008) Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 22:2189-2203.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.
- Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, Munn AL, Hankamer B (2009) Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure* 17:427-437.
- Langelier C, von Schwedler UK, Fisher RD, De Domenico I, White PL, Hill CP, Kaplan J, Ward D, Sundquist WI (2006) Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol* 80:9465-9480.

## L.

- Lata S, Roessle M, Solomons J, Jamin M, Gottlinger HG, Svergun DI, Weissenhorn W (2008a) Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol* 378:818-827.
- Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W (2008b) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321:1354-1357.
- Lauwers E, Jacob C, Andre B (2009) K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J Cell Biol* 185:493-502.

- Lee HH, Elia N, Ghirlando R, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2008) Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science* 322:576-580.
- Lee J-A, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao F-B (2007a) ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Current Biology* 17:1561-1567.
- Lee JA, Gao FB (2009) Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J Neurosci* 29:8506-8511.
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB (2007b) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17:1561-1567.
- Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R (2005) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 122:605-617.
- Lee S, Joshi A, Nagashima K, Freed EO, Hurley JH (2007c) Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat Struct Mol Biol* 14:194-199.
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42.
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004a) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119:873-887.
- Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M (2004b) The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell* 119:873-887.
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89:799-845.
- Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, Hanson PI (2005) Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem* 280:12799-12809.
- Lindas AC, Karlsson EA, Lindgren MT, Ettema TJ, Bernander R (2008) A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18942-18946.
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 136:61-70.
- Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN (2003) TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7626-7631.
- Lucocq J, Walker D (1997) Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 72:307-313.
- Luzio JP, Parkinson MD, Gray SR, Bright NA (2009a) The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem Soc Trans* 37:1019-1021.
- Luzio JP, Piper SC, Bowers K, Parkinson MD, Lehner PJ, Bright NA (2009b) ESCRT proteins and the regulation of endocytic delivery to lysosomes. *Biochem Soc Trans* 37:178-180.

## M.

- Mahmood Z, Shukla Y Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 316:887-899.
- Makarova KS, Yutin N, Bell SD, Koonin EV (2010) Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea. *Nat Rev Microbiol* 8:731-741.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
- Martens S (2010) Role of C2 domain proteins during synaptic vesicle exocytosis. *Biochem Soc Trans* 38:213-216.
- Martens S, Kozlov MM, McMahon HT (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* 316:1205-1208.
- Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD (2001) HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7:1313-1319.
- Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D, Bieniasz PD (2003) Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12414-12419.

- Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W, Bieniasz PD (2005) HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* 168:89-101.
- Martinez-Garay I, Rustom A, Gerdes HH, Kutsche K (2006) The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody. *Genomics* 87:243-253.
- Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA (1989) Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 103:234-239.
- Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N (2006) Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* 25:2889-2897.
- Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Faure J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303:531-534.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Mattila PK, Pykalainen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen P (2007) Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 176:953-964.
- Matus A, Brinkhaus H, Wagner U (2000) Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus* 10:555-560.
- Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7590-7594.
- McCullough J, Fisher RD, Whitby FG, Sundquist WI, Hill CP (2008) ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7687-7691.
- McCullough J, Row PE, Lorenzo O, Doherty M, Beynon R, Clague MJ, Urbe S (2006) Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* 16:160-165.
- McDermott CJ, Shaw PJ (2008) Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* 336:658-662.
- McDonald B, Martin-Serrano J (2009) No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J Cell Sci* 122:2167-2177.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ (2001) Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology* 58:1803-1809.
- McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438:590-596.
- McMahon HT, Kozlov MM, Martens S (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* 140:601-605.
- Merrill SA, Hanson PI (2010) Activation of human VPS4A by ESCRT-III proteins reveals ability of substrates to relieve enzyme autoinhibition. *J Biol Chem*.
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433-439.
- Misra S, Hurley JH (1999) Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 97:657-666.
- Mizuno E, Kawahata K, Kato M, Kitamura N, Komada M (2003) STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell* 14:3675-3689.
- Montagnac G, Chavrier P (2008) Endosome positioning during cytokinesis. *Biochem Soc Trans* 36:442-443.
- Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzell E, Basanez G, Meda P, Martinou JC (2010) Membrane remodeling

- induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142:889-901.
- Morita E, Sundquist WI (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:395-425.
- Morita E, Sandrin V, Alam SL, Eckert DM, Gygi SP, Sundquist WI (2007a) Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe* 2:41-53.
- Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12889-12894.
- Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI (2007b) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26:4215-4227.
- Munshi UM, Kim J, Nagashima K, Hurley JH, Freed EO (2007) An Alix fragment potently inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPX late domains. *J Biol Chem* 282:3847-3855.
- Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 10:821-830.

## N.

- Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759-767.
- Neumann M, Tolnay M, Mackenzie IR (2009) The molecular basis of frontotemporal dementia. *Expert reviews in molecular medicine* 11:e23.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.
- Nezis IP, Sagona AP, Schink KO, Stenmark H (2010) Divide and Prosper: The emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends Cell Biol.*
- Nickerson DP, West M, Henry R, Odorizzi G (2010) Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. *Mol Biol Cell* 21:1023-1032.
- Nieto-Sampedro M, Bussineau CM, Cotman CW (1981) Optimal concentration of iodonitrotetrazolium for the isolation of junctional fractions from rat brain. *Neurochem Res* 6:307-320.
- Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron* 46:609-622.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.

## O.

- Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD, Williams RL (2007) Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449:735-739.
- Odorizzi G (2006) The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci* 119:3025-3032.
- Okabe S, Miwa A, Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21:6105-6114.
- Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523:171-176.

- Opazo P, Choquet D (2010) A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci*.
- Osako Y, Maemoto Y, Tanaka R, Suzuki H, Shibata H, Maki M (2010) Autolytic activity of human calpain 7 is enhanced by ESCRT-III-related protein IST1 through MIT-MIM interaction. *FEBS J*.
- Ott M, Norberg E, Zhivotovsky B, Orrenius S (2009) Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ* 16:1075-1082.

## P.

- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942-948.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004) Recycling Endosomes Supply AMPA Receptors for LTP. *Science* 305:1972-1975.
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006) Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron* 52:817-830.
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM (2006) ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67:1074-1077.
- Parnass Z, Tashiro A, Yuste R (2000) Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10:561-568.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424:677-681.
- Patt S, Gerhard L (1993) A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. *Neuropathology and applied neurobiology* 19:519-523.
- Patt S, Gertz HJ, Gerhard L, Cervos-Navarro J (1991) Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. *Histology and histopathology* 6:373-380.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495-499.
- Petiot A, Strappazzon F, Chatellard-Cause C, Blot B, Torch S, Verna JM, Sadoul R (2008) Alix differs from ESCRT proteins in the control of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 375:63-68.
- Pincetic A, Medina G, Carter C, Leis J (2008) Avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus, type 1 use different subsets of ESCRT proteins to facilitate the budding process. *J Biol Chem* 283:29822-29830.
- Pineda-Molina E, Belrhali H, Piefer AJ, Akula I, Bates P, Weissenhorn W (2006) The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic* 7:1007-1016.
- Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, Moriscot C, Popov S, Hinz A, Jamin M, Boyer V, Sadoul R, Forest E, Svergun DI, Gottlinger HG, Weissenhorn W (2009) A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17:843-856.
- Popov S, Popova E, Inoue M, Gottlinger HG (2009) Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *J Virol* 83:7185-7193.
- Popov V, Medvedev NI, Davies HA, Stewart MG (2005) Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *J Comp Neurol* 492:50-65.
- Pornillos O, Alam SL, Davis DR, Sundquist WI (2002) Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Biol* 9:812-817.
- Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI (2003) HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 162:425-434.

- Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23:7129-7142.
- Prag G, Watson H, Kim YC, Beach BM, Ghirlando R, Hummer G, Bonifacino JS, Hurley JH (2007) The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev Cell* 12:973-986.
- Prange O, Murphy TH (2001) Modular transport of postsynaptic density-95 clusters and association with stable spine precursors during early development of cortical neurons. *J Neurosci* 21:9325-9333.

## R.

- Rachidi M, Lopes C (2008) Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur J Paediatr Neurol* 12:168-182.
- Raiborg C, Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458:445-452.
- Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H (2001a) Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J* 20:5008-5021.
- Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H (2001b) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* 114:2255-2263.
- Ramachandran R, Pucadyil TJ, Liu YW, Acharya S, Leonard M, Lukiyanchuk V, Schmid SL (2009) Membrane insertion of the pleckstrin homology domain variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission. *Mol Biol Cell* 20:4630-4639.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12:747-757.
- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* 3:1389-1402.
- Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, Sanderson CM (2005) The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet* 14:19-38.
- Ren X, Hurley JH (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J* 29:1045-1054.
- Ren X, Kloer DP, Kim YC, Ghirlando R, Saidi LF, Hummer G, Hurley JH (2009) Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Structure* 17:406-416.
- Renner M, Choquet D, Triller A (2009) Control of the postsynaptic membrane viscosity. *J Neurosci* 29:2926-2937.
- Renvoise B, Parker RL, Yang D, Bakowska JC, Hurley JH, Blackstone C (2010) SPG20 protein spartin is recruited to midbodies by ESCRT-III protein Ist1 and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 21:3293-3303.
- Ringholz GM, Greene SR (2006) The relationship between amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Current neurology and neuroscience reports* 6:387-392.
- Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grovdal L, Willumsen BM, van Deurs B (2009) Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic* 10:1115-1127.
- Rohrer JD, Ahsan RL, Isaacs AM, Nielsen JE, Ostergaard L, Scahill R, Warren JD, Rossor MN, Fox NC, Johannsen P (2009) Presymptomatic generalized brain atrophy in frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27:182-186.
- Romer W, Pontani LL, Sorre B, Rentero C, Berland L, Chambon V, Lamaze C, Bassereau P, Sykes C, Gaus K, Johannes L (2010) Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell* 140:540-553.

- Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA (2010) Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* 142:902-913.
- Rostaing P, Real E, Siksou L, Lechaire JP, Boudier T, Boeckers TM, Gertler F, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2006) Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *The European journal of neuroscience* 24:3463-3474.
- Rothman JH, Stevens TH (1986) Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* 47:1041-1051.
- Roucou X, Rostovtseva T, Montessuit S, Martinou JC, Antonsson B (2002) Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem J* 363:547-552.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441:528-531.
- Roux A, Koster G, Lenz M, Sorre B, Manneville JB, Nassoy P, Bassereau P (2010) Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4141-4146.
- Roxrud I, Stenmark H, Malerod L (2010) ESCRT & Co. *Biol Cell* 102:293-318.
- Rubinsztein DC (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443:780-786.
- Rue SM, Mattei S, Saksena S, Emr SD (2008) Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Mol Biol Cell* 19:475-484.
- Rusten TE, Filimonenko M, Rodahl LM, Stenmark H, Simonsen A (2007a) ESCRTing autophagic clearance of aggregating proteins. *Autophagy* 4.
- Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H (2007b) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 17:1817-1825.

## S.

- Sachse M, Strous GJ, Klumperman J (2004) ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles. *J Cell Sci* 117:1699-1708.
- Sack GH, Jr. Mitochondrial matters in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr* 42:189-191.
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset MC, Valnegri P, Thoumine O, Beretta F, Fagni L, Choquet D, Sala C, Sheng M, Passafaro M (2007) Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54:461-477.
- Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestol K, Poulton J, Rusten TE, Skotheim RI, Raiborg C, Stenmark H (2010) PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol* 12:362-371.
- Saksena S, Sun J, Chu T, Emr SD (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* 32:561-573.
- Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136:97-109.
- Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001) Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. *Neuron* 31:115-130.
- Sala C, Futai K, Yamamoto K, Worley PF, Hayashi Y, Sheng M (2003) Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *J Neurosci* 23:6327-6337.
- Samson RY, Obita T, Freund SM, Williams RL, Bell SD (2008) A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* 322:1710-1713.
- Santel A, Frank S (2008) Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60:448-455.
- Saraste J, Goud B (2007) Functional symmetry of endomembranes. *Mol Biol Cell* 18:1430-1436.
- Schauer I, Emr S, Gross C, Schekman R (1985) Invertase signal and mature sequence substitutions that delay intercompartmental transport of active enzyme. *J Cell Biol* 100:1664-1675.

- Scheff SW, Price DA (1993) Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33:190-199.
- Scheff SW, DeKosky ST, Price DA (1990) Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11:29-37.
- Scheibel AB (1979) Dendritic changes in senile and presenile dementias. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 57:107-124.
- Schikorski T, Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4107-4112.
- Schmidt MH, Dikic I, Bogler O (2005) Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem* 280:3414-3425.
- Scott A, Gaspar J, Stuchell-Brereton MD, Alam SL, Skalicky JJ, Sundquist WI (2005a) Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13813-13818.
- Scott A, Chung HY, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, Holton JM, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill CP, Sundquist WI (2005b) Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J* 24:3658-3669.
- Sette P, Jadwin JA, Dussupt V, Bello NF, Bouamr F (2010) The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL domain motif. *J Virol* 84:8181-8192.
- Shen H, Pan Y, Han Z, Hong L, Liu N, Han S, Yao L, Xie H, Zhaxi C, Shi Y, Fan D (2004) Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by downregulation of TSG101 with TSG101siRNA. *Cancer Biol Ther* 3:561-565.
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual review of biochemistry* 76:823-847.
- Shestakova A, Hanono A, Drosner S, Curtiss M, Davies BA, Katzmann DJ, Babst M (2010) Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol Biol Cell* 21:1059-1071.
- Shi A, Pant S, Balklava Z, Chen CC, Figueroa V, Grant BD (2007) A novel requirement for *C. elegans* Alix/ALX-1 in RME-1-mediated membrane transport. *Curr Biol* 17:1913-1924.
- Shi X, Opi S, Lugari A, Restouin A, Coursindel T, Parrot I, Perez J, Madore E, Zimmermann P, Corbeil J, Huang M, Arold ST, Collette Y, Morelli X (2010) Identification and biophysical assessment of the molecular recognition mechanisms between the human haemopoietic cell kinase Src homology domain 3 and ALG-2-interacting protein X. *Biochem J* 431:93-102.
- Shibata Y, Hu J, Kozlov MM, Rapoport TA (2009) Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:329-354.
- Shields SB, Oestreich AJ, Winistorfer S, Nguyen D, Payne JA, Katzmann DJ, Piper R (2009) ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J Cell Biol* 185:213-224.
- Shiflett SL, Ward DM, Huynh D, Vaughn MB, Simmons JC, Kaplan J (2004) Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279:10982-10990.
- Shih SC, Katzmann DJ, Schnell JD, Sutanto M, Emr SD, Hicke L (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 4:389-393.
- Shim S, Kimpler LA, Hanson PI (2007) Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8:1068-1079.
- Shirk AJ, Anderson SK, Hashemi SH, Chance PF, Bennett CL (2005) SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurosci Res* 82:43-50.
- Sims NR, Anderson MF (2008) Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* 3:1228-1239.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005a) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *37:806-808*.

- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005b) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37:806-808.
- Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, Bache KG, Raiborg C, Trambaiolo D, Wakatsuki S, Stenmark H (2005) Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem* 280:19600-19606.
- Smirnova YG, Marrink SJ, Lipowsky R, Knecht V (2010) Solvent-exposed tails as prestalk transition states for membrane fusion at low hydration. *J Am Chem Soc* 132:6710-6718.
- Soderling SH, Guire ES, Kaech S, White J, Zhang F, Schutz K, Langeberg LK, Banker G, Raber J, Scott JD (2007) A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci* 27:355-365.
- Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.
- Stahelin RV, Long F, Diraviyam K, Bruzik KS, Murray D, Cho W (2002) Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem* 277:26379-26388.
- Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R (2009) Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460:525-528.
- Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* 2:284-291.
- Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 117:1201-1210.
- Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT (1999) Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* 1:27-32.
- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114:689-699.
- Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S, Sundquist WI (2007) ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449:740-744.
- Stuffers S, Brech A, Stenmark H (2009) ESCRT proteins in physiology and disease. *Experimental cell research* 315:1619-1626.
- Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:135-142.
- Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y (2010) Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol* 21:340-349.
- Sundquist WI, Schubert HL, Kelly BN, Hill GC, Holton JM, Hill CP (2004) Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol Cell* 13:783-789.
- Suzuki H, Kawasaki M, Inuzuka T, Okumura M, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M (2008) Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex: Ca<sup>2+</sup>/EF3-driven arginine switch mechanism. *Structure* 16:1562-1573.
- Swanson KA, Kang RS, Stamenova SD, Hicke L, Radhakrishnan I (2003) Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J* 22:4597-4606.

## T.

- Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23:6586-6595.

- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain research* 225:1-21.
- Takata H, Kato M, Denda K, Kitamura N (2000) A hrs binding protein having a Src homology 3 domain is involved in intracellular degradation of growth factors and their receptors. *Genes Cells* 5:57-69.
- Tamai K, Tanaka N, Nara A, Yamamoto A, Nakagawa I, Yoshimori T, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K (2007) Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 360:721-727.
- Tamai K, Toyoshima M, Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, Yaegashi N, Watanabe M, Sugamura K (2008) Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am J Pathol* 173:1806-1817.
- Tashiro A, Yuste R (2003) Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histol Histopathol* 18:617-634.
- Teis D, Saksena S, Emr SD (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* 15:578-589.
- Teis D, Saksena S, Judson BL, Emr SD (2010) ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J* 29:871-883.
- Teo H, Veprintsev DB, Williams RL (2004a) Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* 279:28689-28696.
- Teo H, Perisic O, Gonzalez B, Williams RL (2004b) ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* 7:559-569.
- Teo H, Gill DJ, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Vallis Y, Emr SD, Williams RL (2006) ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125:99-111.
- ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1096-1100.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Theos AC, Truschel ST, Tenza D, Hurbain I, Harper DC, Berson JF, Thomas PC, Raposo G, Marks MS (2006) A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell* 10:343-354.
- Timmins J, Schoehn G, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Ruigrok RW, Weissenhorn W (2003) Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* 326:493-502.
- Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:3-13.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-1247.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645:63-70.
- Tsang HT, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM (2006) A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* 88:333-346.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27:433-446.

## U.

Ultanir SK, Kim JE, Hall BJ, Deerinck T, Ellisman M, Ghosh A (2007) Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19553-19558.

Urbe S, Sachse M, Row PE, Preisinger C, Barr FA, Strous G, Klumperman J, Clague MJ (2003) The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation. *J Cell Sci* 116:4169-4179.

Urwin H, Authier A, Nielsen JE, Metcalf D, Powell C, Froud K, Malcolm DS, Holm I, Johannsen P, Brown J, Fisher EM, van der Zee J, Bruyland M, Van Broeckhoven C, Collinge J, Brandner S, Futter C, Isaacs AM (2010a) Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet* 19:2228-2238.

Urwin H et al. (2010b) FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 120:33-41.

Usami Y, Popov S, Gottlinger HG (2007) Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J Virol* 81:6614-6622.

Usami Y, Popov S, Popova E, Gottlinger HG (2008) Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J Virol* 82:4898-4907.

## V.

Vaccari T, Rusten TE, Menut L, Nezis IP, Brech A, Stenmark H, Bilder D (2009) Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J Cell Sci* 122:2413-2423.

Valls LA, Hunter CP, Rothman JH, Stevens TH (1987) Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* 48:887-897.

Valverde F (1967) Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung* 3:337-352.

Valverde F (1971) Rate and extent of recovery from dark rearing in the visual cortex of the mouse. *Brain research* 33:1-11.

Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W (2008) Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol* 181:37-41.

van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM, Van Broeckhoven C (2008) CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Human molecular genetics* 17:313-322.

van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.

VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, Carter CA (2001) Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7724-7729.

## W.

Wallace W, Bear MF (2004) A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. *J Neurosci* 24:6928-6938.

- Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9090-9103.
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA, Ehlers MD (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135:535-548.
- Ward DM, Vaughn MB, Shiflett SL, White PL, Pollock AL, Hill J, Schnegelberger R, Sundquist WI, Kaplan J (2005) The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *J Biol Chem* 280:10548-10555.
- Webster JC, Klingman JD (1979) Isolation of synaptic junction-enriched fraction from the forebrain of day-old chickens. Preparation and characterization of chick forebrain subcellular fractions. *Neurochem Res* 4:137-153.
- Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ (2008) N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem* 283:15912-15920.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.
- Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464:864-869.
- Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2009a) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458:172-177.
- Wollert T, Yang D, Ren X, Lee HH, Im YJ, Hurley JH (2009b) The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 122:2163-2166.
- Woodman PG, Futter CE (2008) Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* 20:408-414.

## X.

- Xiao J, Xia H, Zhou J, Azmi IF, Davies BA, Katzmann DJ, Xu Z (2008) Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway. *Dev Cell* 14:37-49.
- Xie W, Li L, Cohen SN (1998) Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1595-1600.

## Y.

- Yamazaki Y, Takahashi T, Hiji M, Kurashige T, Izumi Y, Yamawaki T, Matsumoto M (2010) Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer's disease hippocampus. *Neurosci Lett*.
- Yang D, Rismanchi N, Renvoise B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, Hurley JH (2008) Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat Struct Mol Biol* 15:1278-1286.
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23:5409-5420.
- Yorikawa C, Shibata H, Waguri S, Hatta K, Horii M, Katoh K, Kobayashi T, Uchiyama Y, Maki M (2005) Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem J* 387:17-26.
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.
- Young KW, Bampton ET, Pinon L, Bano D, Nicotera P (2008) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signalling in hippocampal neurons. *Cell Calcium* 43:296-306.

- Yu Z, Gonciarz MD, Sundquist WI, Hill CP, Jensen GJ (2008) Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J Mol Biol* 377:364-377.
- Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1793:1496-1507.

## Z.

- Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky SR, Popova E, Palu G, Gottlinger H (2006) Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19140-19145.
- Zhai Q, Fisher RD, Chung HY, Myszka DG, Sundquist WI, Hill CP (2008) Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol* 15:43-49.
- Zhao WM, Seki A, Fang G (2006) Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol Biol Cell* 17:3881-3896.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749-757.
- Zhou X, Pan S, Sun L, Corvera J, Lin SH, Kuang J (2008) The HIV-1 p6/EIAV p9 docking site in Alix is autoinhibited as revealed by a conformation-sensitive anti-Alix monoclonal antibody. *Biochem J* 414:215-220.
- Zhou X, Pan S, Sun L, Corvera J, Lee YC, Lin SH, Kuang J (2009) The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem J* 418:277-284.
- Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9-19.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.
- Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB (2005a) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46:181-189.
- Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB (2005b) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436:261-265.