HAL open science

Déubiquitinations dans la voie de signalisation Notch

Julien Moretti

To cite this version:

Julien Moretti. Déubiquitinations dans la voie de signalisation Notch. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . tel-00726110

HAL Id: tel-00726110

https://theses.hal.science/tel-00726110v1

Submitted on 28 Aug 2012

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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

M. JULIEN MORETTI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la Thèse

DEUBIQUITINATIONS DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

Soutenue le 22 septembre 2011, devant le jury constitué de :

Pr. Thierry DARRIBÈRE, Président du Jury

Dr. Rosine HAGUENAUER-TSAPIS et **Dr. Roland LE BORGNE**, Rapporteurs

Dr. Françoise PFLUMIO, Examinatrice

Dr. Christel BROU, Directrice de Thèse

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

M. JULIEN MORETTI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la Thèse

DEUBIQUITINATIONS DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

Soutenue le 22 septembre 2011, devant le jury constitué de :

Pr. Thierry DARRIBÈRE, Président du Jury

Dr. Rosine HAGUENAUER-TSAPIS et **Dr. Roland LE BORGNE**, Rapporteurs

Dr. Françoise PFLUMIO, Examinatrice

Dr. Christel BROU, Directrice de Thèse

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données

15 rue de l'école de médecine

Escalier G, 2ème étage

75270 PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35

Fax : 01 42 34 68 40

Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54

Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41

Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51

E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Thèse de Doctorat effectuée sous la direction de Christel Brou
dans l'unité dirigée par Alain Israël :

SIGNALISATION MOLÉCULAIRE ET ACTIVATION CELLULAIRE

Institut Pasteur

25 rue du Docteur Roux

75015 PARIS

Tél. 01 40 61 30 41

Fax : 01 40 60 30 40

E-mail : christel.brou@pasteur.fr

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier **Rosine HAGUENAUER-TSAPIS** ainsi que **Roland LE BORGNE** pour avoir accepté avec enthousiasme d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également **Françoise PFLUMIO** et **Thierry DARRIBERE** pour avoir examiné avec la même ferveur mon travail de thèse.

Merci aussi à **Alain ISRAËL** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces quatre ans.

Ces quelques années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans la présence, au laboratoire, de plusieurs personnes qui m'ont accompagné.

En premier lieu, je remercie de tout cœur **Christel BROU**, ma directrice de thèse, à qui je dois énormément et grâce à qui j'ai beaucoup appris. Merci de m'avoir accueilli de façon si agréable dès mon stage de Master… Merci de m'avoir encadré, formé et soutenu, toujours avec efficacité, gentillesse et humour !

Je remercie aussi chaleureusement **Patricia CHASTAGNER** pour son aide, sa bonne humeur perpétuelle, nos chamailleries factices et tout le reste ! Même dans les moments les plus difficiles, j'ai toujours pris beaucoup de plaisir à travailler à leurs côtés.

Je souhaite remercier tout particulièrement **David KACHANER**, qui m'a beaucoup apporté depuis son arrivée. Merci pour son amitié, son soutien dans les périodes compliquées, son humour infaillible, sa bonne humeur permanente et nos échanges Notch-NRP !

Je remercie affectueusement **Frédérique LOGEAT** pour tous les moments agréables passés à discuter de science ou d'autres choses, pour ses conseils, son humour…

Un très grand merci à **Sara ORTICA** et sa sensibilité, **Elodie AUTRUSSEAU** et sa vivacité, ainsi que **Sara HEUSS** et sa folie douce pour les très bons moments passés ensemble, et pour le soutien qu'elles m'ont apporté quand le besoin se faisait sentir. Je reste très nostalgique de l'époque où, avec David, nous formions cette joyeuse bande !

Je remercie aussi **Nassima MESSALI**, entre autres choses pour nos discussions philosophiques en langue anglaise. Merci également à **Josina FILIPE**, ma première voisine de bureau, pour avoir amplement participé à mon épanouissement dans le laboratoire.

Je n'oublie pas **Dominique AYTAC**, **Nadine TARANTINO**, **Frédérique CUVELIER** et **Neetu GUPTA-ROSSI** pour leur sympathie et leur disponibilité tout au long de ces années, ainsi que les autres membres du laboratoire.

RESUME

La signalisation Notch est une voie extrêmement conservée depuis *Caenorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères en passant par *Drosophila melanogaster*. Elle est requise dès le développement embryonnaire et contrôle de nombreux processus comme la différenciation et le choix du destin cellulaire, la prolifération, ou encore le maintien de stocks de cellules souches et l'apoptose.

La voie est basée sur l'activité du récepteur Notch, un hétérodimère transmembranaire qui est activé lors de contacts intercellulaires par la liaison de ses ligands qui sont également des protéines transmembranaires. Suite à cette activation, le récepteur subit une série de deux clivages protéolytiques internes, respectivement catalysés par une métalloprotéase ADAM et par le complexe multi-protéique γ-secrétase. Ce dernier clivage libère le domaine intracellulaire de Notch dans le cytoplasme, cette forme étant ensuite transportée dans le noyau où elle active directement la transcription des gènes cibles de la voie Notch en se liant à ses co-facteurs de transcription, CSL et Mastermind.

Le récepteur Notch est régulé à diverses étapes par des processus d'ubiquitination : la monoubiquitination du récepteur Notch activé contrôle son clivage γ-secrétase, la polyubiquitination du récepteur Notch non activé et endocytosé contrôle sa dégradation dans les lysosomes. Les processus d'ubiquitination sont réversiblement contrôlés par la déubiquitination. Or, aucune déubiquitination n'a été identifiée dans la voie de signalisation Notch. Mon projet consistait à identifier les déubiquitinases – les enzymes responsables de la déubiquitination – impliquées dans les deux processus d'ubiquitination décrits précédemment. Nous avons pour cela mis au point deux cribles en immunofluorescence permettant de tester une banque de shRNA qui cible l'expression des 91 déubiquitinases connues ou putatives du génome humain.

Le premier crible m'a permis d'identifier eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3, comme une nouvelle protéine portant une activité déubiquitinase. eIF3f est recrutée au récepteur Notch via l'E3 ubiquitine ligase Deltex, et régule positivement la voie de signalisation Notch en déubiquitinant le récepteur Notch activé avant le clivage γ-secrétase, favorisant ainsi la production de la forme transcriptionnellement active de Notch.
Par ailleurs, le deuxième crible a identifié plusieurs déubiquitinases candidates, dont le rôle dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé est en cours de validation.

SUMMARY

Notch signaling is a highly conserved pathway from *Caenorhabditis elegans* to *Drosophila melanogaster* or mammals. It is absolutely required from embryonic development, and it controls many different processes such as cell differentiation, cell fate decision, cell proliferation, stem cells maintenance or apoptosis.

The signaling is based on the activity of Notch receptor, which is expressed as an heterodimeric transmembrane protein, and which is activated during intercellular contacts by the binding of its transmembrane ligands expressed by neighboring cells. Consequently to this activation, Notch undergoes two successive proteolytic cleavages, respectively catalyzed by an ADAM metalloprotease and the γ-secretase complex. This last cleavage releases Notch intracellular domain in the cytoplasm, then this activated form is translocated to the nucleus where it finally directly promotes Notch target genes transcription by binding its transcription co-factors CSL and Mastermind.

Notch receptor is regulated at several steps by ubiquitination processes : activated Notch monoubiquitination controls its γ-secretase cleavage, non-activated Notch polyubiquitination controls its lysosomal degradation.

Ubiquitination processes are reversed by deubiquitination events. No deubiquitination step has been highlighted in Notch signaling yet. My thesis project consisted in identifying the deubiquitinating enzymes – the enzymes responsible for deubiquitination – involved in both ubiquitination processes previously described. To this end, we set up two immunofluorescence screens to test an shRNA library targeting each one of the 91 known or putative deubiquitinating enzymes of the human genome.

The first screen allowed me to identify eIF3f, known so far as a subunit of the translation initiation factor 3, as a new protein carrying a deubiquitinating activity. eIF3f is recruited to activated Notch via the E3 ubiquitin ligase Deltex, and eventually enhances Notch signaling by deubiquitinating the activated receptor before the γ-secretase cleavage, thus triggering the production of transcriptionally active Notch.

In addition, the second screen identified several candidate deubiquitinating enzymes, whose role in non-activated Notch intracellular trafficking is being validated.

TABLE DES MATIERES

RESUME / SUMMARY 9/10

INDEX DES FIGURES 21

INTRODUCTION

---

1. Introduction générale 29

2. La voie Notch et ses mécanismes d'action sont conservés 35
I. La découverte du gène *notch* 37
II. Les acteurs de la voie Notch sont conservés au cours de l'évolution 37
III. La voie Notch est activée lors de contacts intercellulaires 39
IV. Les effets de la voie Notch sont basés sur des mécanismes d'action conservés 39
1. L'inhibition latérale 41
a. Le rôle de la voie Notch au cours de la neurogenèse de la drosophile
b. Le rôle de la voie Notch dans la formation des organes sensoriels externes de la drosophile
2. La signalisation inductive ou instructive 47

3. Les rôles physiologiques et pathologiques de la voie Notch chez les mammifères 49
I. Invalidation des gènes de la voie Notch 51
1. Invalidation des gènes codant pour les récepteurs Notch 51
2. Invalidation des gènes codant pour les ligands Delta et Jagged 53
II. Quelques exemples du rôle physiologique de la voie Notch chez les mammifères 53
1. La voie de signalisation Notch dans la neurogenèse 53
a. La neurogenèse chez les mammifères
b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans la neurogenèse
2. La voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde 57
a. L'hématopoïèse et le lignage lymphoïde chez les mammifères
b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde
Engagement vers la voie lymphoïde T et inhibition lymphoïde B
Autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques
3. La voie de signalisation Notch dans la différenciation de l'épiderme 63
a. L'épiderme chez les mammifères
b. Rôles de la voie Notch dans l'épiderme
III. Quelques exemples de pathologies associées à la voie Notch chez les mammifères 67
1. La voie de signalisation Notch est impliquée dans les cancers 69
a. Notch est un oncogène : exemple des Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T
b. Notch est un suppresseur de tumeurs : exemple des cancers de la peau
2. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome CADASIL 75
3. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome d'Alagille 77

4. Relation structure – fonction des récepteurs et ligands de la voie Notch 79
I. Le récepteur Notch chez les mammifères 81
1. Synthèse, maturation et adressage à la membrane du récepteur Notch 81
2. Structure et fonctions de la région extracellulaire du récepteur 83
3. Structure et fonctions de la région intracellulaire du récepteur 83
4. Glycosylation du récepteur Notch 85
II. Les ligands DSL chez les mammifères 87
1. Structure et fonctions de la région extracellulaire des ligands 87
2. Structure et fonctions de la région intracellulaire des ligands 87
3. Glycosylation des ligands 89

5. Activation du récepteur Notch et transduction du signal 91
I. L'interaction ligand – récepteur 93
II. Premier clivage protéolytique par une métalloprotéase de la famille ADAM 93
III. Deuxième clivage protéolytique par le complexe γ-secrétase 95
IV. Activation transcriptionnelle par le domaine intracellulaire de Notch 99
1. Les partenaires nucléaires de Notch : CSL et MAM 99
2. D'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription 101
3. Les gènes cibles de la voie Notch 103
a. Les cibles directes de Notch
b. Les cibles indirectes de la voie Notch
V. Conclusion : de la diversité des effets de la voie Notch 107

6. Ubiquitine, ubiquitination et déubiquitination 113
I. L'ubiquitination 117
1. La molécule d'ubiquitine et les protéines ubiquitin-like 117
2. L'ubiquitination 117
3. Les enzymes catalysant l'ubiquitination 119
a. La cascade enzymatique
b. Les différentes E3 ubiquitine ligases
Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT
Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING
Les E3 ubiquitine ligases de type SCF (Skp-1 / Cullin / F-box)
4. Les rôles de l'ubiquitination 125
a. La polyubiquitination K48 et la dégradation des protéines par le protéasome
b. L'ubiquitination et les interactions entre protéines
c. La monoubiquitination, la multiubiquitination et l'endocytose des protéines membranaires
d. L'ubiquitination et la régulation de la transcription ou de la réparation de l'ADN
II. La déubiquitination 129
1. Les différentes Déubiquitinases 131
a. Les Déubiquitinases de la classe des cystéine protéases
Mécanisme catalytique des DUBs cystéine protéases
Les Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs)
Les Ubiquitin Specific Proteases (USPs)
Les Machado-Joseph Disease Protein Domain Proteases (MJDs)
Les Ovarian Tumor Proteases (OTUs)
b. Les Déubiquitinases de la classe des métalloprotéases
Mécanisme catalytique des DUBs métalloprotéases
Les DUBs métalloprotéases : JAMM Protéases

2. Les rôles de la Déubiquitination 137
a. La Déubiquitination et la dégradation des protéines par le protéasome
b. La Déubiquitination et le destin des protéines membranaires endocytosées
c. La Déubiquitination et la maturation de l'ubiquitine
d. La Déubiquitination et le recyclage de l'ubiquitine
3. La spécificité de la Déubiquitination 143
III. Quelques exemples de voies de signalisation régulées par l'ubiquitination et la déubiquitination 145
1. p53 est régulé par Mdm2, USP2a et HAUSP / USP7 145
2. cMyc est régulé par Sel-10 / Fbw7 et USP28 147

7. L'ubiquitination régule la voie de signalisation Notch 151
I. Ubiquitination des ligands DSL 153
1. L'E3 ubiquitine ligase Neuralized 153
2. L'E3 ubiquitine ligase Mind bomb 155
II. Ubiquitination du récepteur Notch 157
1. Ubiquitinations du récepteur Notch en absence d'activation : dégradation du récepteur 157
a. L'E3 ubiquitine ligase Su(dx)/Itch/AIP4
b. L'E3 ubiquitine ligase Nedd4
2. Ubiquitinations du récepteur Notch activé : dégradation ou activation 161
a. L'E3 ubiquitine ligase Sel-10, dégradation de Notch activé nucléaire et fin du signal
b. L'E3 ubiquitine ligase c-Cbl, dégradation de Notch activé encore ancré à la membrane
c. Monoubiquitination et endocytose du récepteur Notch activé et clivage par la γ-secrétase
3. Le cas de l'E3 ubiquitine ligase Deltex 165
a. Un régulateur positif de la voie Notch
b. Un régulateur négatif de la voie Notch
III. Ubiquitination de régulateurs de la voie Notch 171

8. eIF3f, une sous-unité d'un facteur d'initiation de la traduction qui possède un domaine JAMM / MPN 173
I. eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3 175
1. L'initiation de la traduction chez les Eucaryotes et rôle d'eIF3 175
2. Les sous-unités du complexe eIF3 177
3. Les différents rôles d'eIF3f 179
II. eIF3, un complexe de la famille PCI dont les sous-unités eIF3f et eIF3h possèdent un domaine JAMM / MPN 181
1. eIF3f possède un domaine JAMM / MPN 181
2. Le complexe eIF3 appartient à la famille des Zomes ou PCI 181

OBJECTIFS DE LA THESE

Hypothèse générale et Objectifs 187
Outils 187
Projet 189

I. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch activé et régulant la voie d'activation Notch 189

II. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch non activé et régulant le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé 191

RESULTATS

1. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch activé et régulant la voie d'activation Notch 195
I. Identification d'eIF3f 199
II. eIF3f est impliqué dans la déubiquitination du récepteur Notch activé 201
III. eIF3f a une activité déubiquitinase 203
IV. eIF3f est recruté à Notch activé via l'E3 ubiquitine ligase Deltex1 205
V. eIF3f agit sur une forme de Notch activée avant la coupure γ-secrétase 207
VI. eIF3f est un régulateur positif de la voie Notch 209
VII. Conclusion 211
2. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch non activé et régulant la voie de dégradation lysosomiale du récepteur Notch 239
I. Identification des déubiquitinases candidates 243
1. Crible en immunofluorescence et identification des DUBs candidates 243
2. Quelques données sur les DUBs candidates 245
II. Etude préliminaire de l'effet des déubiquitinases sur Notch-FL non activé 247
III. Etude du rôle d'USP12 sur Notch-FL non activé 247
1. Effet d'USP12 sur la déubiquitination de Notch-FL 247
2. Interaction entre USP12 et Notch 249
3. Conclusions sur USP12 251

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. De la nécessité de l'ubiquitination et de la déubiquitination dans la voie de signalisation Notch 259

2. eIF3f, une déubiquitinase régulant la voie d'activation Notch 267
I. eIF3f a une activité déubiquitinase intrinsèque 269
II. eIF3f agit sur l'activation du récepteur Notch avant le clivage γ-secrétase 275
1. eIF3f agit sur le récepteur Notch non clivé par le complexe γ-secrétase 275
2. eIF3f est un régulateur positif de la voie de signalisation Notch 277
III. eIF3f est recruté à Notch activé via Deltex1 279
IV. Le rôle physiologique d'eIF3f 283
V. Le complexe eIF3 est un Zome à part entière 285

VI. eIF3f agit-il au sein ou en dehors du complexe eIF3 ? 287
VII. eIF3f agit-il sur d'autres subtrats ? 289

3. Les déubiquitinases régulant le trafic intracellulaire de Notch non activé 291
I. Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs fonctions dans le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé ? 293
1. Des déubiquitinases généralement impliquées dans le trafic intracellulaire ? 295
2. Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs ubiquitinations de Notch ? 295
3. Des déubiquitinases agissant directement ou indirectement sur le récepteur Notch ? 297
II. USP12, une déubiquitinase agissant sur le récepteur Notch non activé ? 299
1. USP12 est impliqué dans la déubiquitination de Notch 299
2. Interaction entre USP12 et Notch 301
3. A quel stade a lieu la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ? 305
4. Quelles sont les conséquences de la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ? 305
III. USP8, AMSH et USP14 : des déubiquitinases impliquées dans la voie Notch ? 307

4. La banque shDUB et les cribles choisis pour identifier les déubiquitinases impliquées dans la voie Notch 311
I. La banque shDUB 313
II. Les cribles en immunofluorescence 315

5. Bilan Général 319

BIBLIOGRAPHIE 325

ANNEXE – ARTICLE SUPPLEMENTAIRE 351

INDEX DES FIGURES

Figure 1 – Phénotype d'une aile de drosophile avec une perte de fonction partielle du gène notch 38

Figure 2 – L'inhibition latérale au cours de la neurogenèse de la drosophile 40

Figure 3 – L'inhibition latérale au cours de la formation des organes sensoriels externes de la drosophile 44

Figure 4 – La signalisation inductive au cours du développement de l'aile de drosophile : formation d'une frontière dorso-ventrale dans le disque imaginal 46

Figure 5 – Neurogenèse et formation du tube neural chez les mammifères 54

Figure 6 – L'hématopoïèse dans la moelle osseuse, le thymus et à la périphérie 56

Figure 7 – Structure de l'épiderme des mammifères : représentation schématique et coupe tissulaire 64

Figure 8 – L'activation de Notch et la différenciation des cellules souches de l'épiderme 66

Figure 9 – Mutations et rôle oncogénique de Notch1 dans les Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T 68

Figure 10 – Structure des récepteurs Notch chez la drosophile et les mammifères 84

Figure 11 – Structure des ligands de Notch chez la drosophile et les mammifères 86

Figure 12 – La voie d'activation du récepteur Notch et la transduction du signal 96

Figure 13 – Formation du complexe activateur de la transcription CSL / NICD / MAM 100

Figure 14 – NICD et le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription des gènes cibles de la voie Notch 102

Figure 15 – Les différents modes de répression de la transcription des gènes cibles indirectes de Notch par les cibles directes des familles HES et HERP 104

Figure 16 – Les différents types d'ubiquitinations 118

Figure 17 – Les étapes du processus d'ubiquitination avec les E3 ubiquitine ligases des familles RING et HECT 120

Figure 18 – Processus d'ubiquitination par les E3 ubiquitine ligases SCF (Skp-1/Cullin/Fbox) 122

Figure 19 – Les différents rôles de la déubiquitination 140

Figure 20 – Régulation de la voie p53 par l'ubiquitination et la déubiquitination 144

Figure 21 – Régulation de cMyc par l'ubiquitination et la déubiquitination 148

Figure 22 – Structure des E3 ubiquitine ligases agissant sur les ligands de Notch chez les mammifères 154

Figure 23 – Structure des E3 ubiquitine ligases agissant sur le récepteur Notch chez les mammifères 162

Figure 24 – Les différentes étapes de l'initiation de la traduction 176

Figure 25 – Alignement des séquences du domaine MPN des sous-unités des Zomes et de celui de la déubiquitinase AMSH 180

Figure 26 – Les trois complexes de la famille PCI : les Zomes 182

Figure 27 – Principe du crible en immunofluorescence de la banque shDUB sur la voie d'activation Notch 188

Figure 28 – Dégradation lysosomiale du récepteur Notch non activé 190

Figure 29 – Principe du crible en immunofluorescence de la banque shDUB sur le trafic intracellulaire de Notch non activé 192

Figure 30 – Rôle d'eIF3f dans la voie Notch : déubiquitination du récepteur Notch activé 212

Figure 31 – Structure des déubiquitinases candidates pour la régulation du trafic intracellulaire de Notch-FL : AMSH, USP8/UBPY, USP12 et USP14 244

FIGURES D'ARTICLE

Article - Figure 1 – Identification d'eIF3f 198

Article - Figure 2 – eIF3f est impliqué dans la déubiquitination de Notch activé 200

Article - Figure 3 – eIF3f porte une activité déubiquitinase intrinsèque 202

Article - Figure 4 – Colocalisation eIF3f / Deltex1 / Notch 204

Article - Figure 5 – Interactions eIF3f / Deltex1 206

Article - Figure 6 – Interactions eIF3f / Deltex1 / Notch 208

Article - Figure 7 – eIF3f est un régulateur positif de la voie Notch 210

Article - Figure Complémentaire – eIF3f endogène est retrouvé à l'intérieur et hors du complexe eIF3 212

Article - Figure S1 – shRNAs affecting eIF3f level inhibit translation 233

Article - Figure S2 – sh eIF3f #3 does not affect Ndfip2 ubiquitination 234

Article - Figure S3 – eIF3f does interact with Deltex but not with Itch/AIP4 235

Article - Figure S4 – A chimera between ubiquitin and NotchIC is partially located outside of the nucleus and presents a transcriptional activity defect 236

Article - Figure S5 – shRNAs targeting eIF3f have no effect on NotchIC-mediated transcriptional activation 237

FIGURES NON PUBLIEES

Résultats non publiés - Figure 1 – Crible en immunofluorescence de la banque shDUB sur le trafic intracellulaire de Notch non activé et identification des quatre DUBs candidates 242

Résultats non publiés - Figure 2 – Des shRNAs ciblant le complexe USP12 / UAF1 et la surexpression d'USP12 affectent l'ubiquitination de Notch non activé 246

Résultats non publiés - Figure 3 – Un siRNA ciblant USP12 et la surexpression d'une forme catalytiquement inactive d'USP12 affectent l'ubiquitination de Notch non activé 248

Résultats non publiés - Figure 4 – Co-immunoprécipitation entre USP12 et les E3 ubiquitine ligases Itch et Deltex1 250

INTRODUCTION

1

INTRODUCTION GENERALE

1

INTRODUCTION GENERALE

Dans l'organisme, la communication entre les cellules est essentielle, notamment dès les premiers stades embryonnaires pluricellulaires pour assurer un développement normal.

La voie de signalisation Notch est un de ces systèmes de communication intercellulaire qui contrôlent de nombreux processus dès le développement embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte. Selon le contexte cellulaire impliqué, la voie Notch a des effets variés et parfois antagonistes. Elle contrôle la différenciation et la spécification du destin cellulaire ou bien l'homéostasie et le maintien de cellules souches dans un état indifférencié. Elle agit également sur la prolifération cellulaire tout comme sur l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

En conséquence, il n'est pas étonnant de constater que des altérations et dérégulations de la voie Notch sont impliquées dans diverses pathologies affectant le développement tout comme la physiologie de tissus adultes (Hansson et al., 2004). En particulier, Notch est impliqué dans plusieurs cancers où il apparaît tantôt comme un oncogène, tantôt comme un suppresseur de tumeur (Radtke and Raj, 2003).

Comme la majorité des signalisations, la voie Notch est basée sur l'activité d'un récepteur sensible à un ligand spécifique. Les récepteurs de la famille Notch et leurs ligands appartenant à la famille DSL (pour Delta, Serrate, Lag-2 ; Delta-like et Jagged sont les ligands chez les mammifères) sont des protéines transmembranaires (Bray, 2006).

La voie Notch présente donc la première originalité d'être activée lors de contacts intercellulaires mettant en jeu une interaction entre un ligand DSL exprimé par une cellule dite émettrice et un récepteur Notch exprimé par la cellule réceptrice.

La signalisation intracellulaire induite par cette activation n'en est pas moins originale puisque, contrairement à la grande majorité des signalisations issues d'un récepteur membranaire, la voie Notch ne fait pas intervenir une cascade de recrutement de protéines adaptatrices puis effectrices qui aboutiront finalement à un effet cellulaire.

Le récepteur Notch activé, lui, subit une série de deux clivages protéolytiques, le premier dans son domaine extracellulaire effectué par une métalloprotéase de la famille ADAM, le

deuxième dans son domaine transmembranaire catalysé par le complexe γ-secrétase, qui permettent de libérer dans le cytoplasme le domaine intracellulaire du récepteur (Brou et al., 2000; De Strooper et al., 1999; Mumm et al., 2000). Ce domaine, forme active de Notch, sera ensuite transporté dans le noyau où il régulera lui-même, en se liant à des co-facteurs de transcription, l'expression des gènes cibles de la voie Notch.

La voie de signalisation Notch est très régulée par les voies d'endocytose et les processus d'ubiquitination et déubiquitination, aussi bien dans les cellules émettrices que réceptrices (Bray, 2006; Le Borgne, 2006; Le Bras et al., 2011).

Le laboratoire a ainsi montré que le récepteur Notch activé est endocytosé et monoubiquitiné préalablement à la coupure par la γ-secrétase (Gupta-Rossi et al., 2004), ces deux événements étant requis pour les étapes finales de la voie Notch.

Par ailleurs, le laboratoire a également montré que le récepteur Notch non activé est soumis à une endocytose et à une polyubiquitination par une E3 ubiquitine ligase (nom des enzymes qui conjuguent l'ubiquitine à un substrat) appelée Itch/AIP4, ce qui le mène à une dégradation finale dans les lysosomes et qui régule la quantité de récepteur potentiellement activable exprimé à la surface des cellules (Chastagner et al., 2006; Chastagner et al., 2008).

Comprendre comment ces processus d'ubiquitination de Notch sont régulés permettra certainement d'en savoir davantage sur la régulation fine de la voie Notch, et de mettre en évidence de nouveaux points de contrôle des différentes étapes de la signalisation.

L'ubiquitination étant un processus réversible, c'est ainsi qu'est née l'idée d'identifier les déubiquitinases (ou DUB, les enzymes qui catalysent la déubiquitination) impliquées dans la voie de signalisation Notch, qui pourraient agir sur le récepteur Notch qu'il soit activé ou non.

2

LA VOIE NOTCH ET SES MECANISMES D'ACTION SONT CONSERVES

I. La découverte du gène *notch*

II. Les acteurs de la voie Notch sont conservés au cours de l'évolution

III. La voie Notch est activée lors de contacts intercellulaires

IV. Les effets de la voie Notch sont basés sur des mécanismes d'action conservés

- **1. L'inhibition latérale**
  - **a. Le rôle de la voie Notch au cours de la neurogenèse de la drosophile**
  - **b. Le rôle de la voie Notch dans la formation des organes sensoriels externes de la drosophile**
- **2. La signalisation inductive ou instructive**

LA VOIE NOTCH ET SES MECANISMES D'ACTION SONT CONSERVES

I. La découverte du gène *notch :*

Le premier phénotype associé à une mutation spontanée du gène *notch* a été identifié chez *Drosophila melanogaster* en 1914 par Dexter, qui décrivait des encoches (*notches* en anglais) au bout des ailes. Ce même phénotype fut rapporté à plusieurs reprises, notamment par Thomas Hunt Morgan qui identifiait ce « facteur responsable » de la mutation *notch* comme étant « lié au sexe, dominant pour le caractère de l'aile, mais récessif pour son effet létal » (Morgan, 1917 ; Morgan, 1919).

Dès la fin des années 30, Poulson montrait que la perte totale de *notch* était responsable d'un phénotype dit neurogénique chez la drosophile, caratérisé par une différenciation massive de cellules de l'ectoderme dorsal en précurseurs neuronaux, résultant en une surproduction de neurones au détriment des cellules épidermiques (Poulson, 1937).
D'autres gènes furent identifiés comme étant responsables d'un phénotype neurogénique : *delta*, *mastermind*, *neuralized*, *enhancer of split* et *big brain*, qui sont appelés, tout comme *notch*, des gènes neurogéniques (Lehmann et al., 1983).

Depuis, l'analyse des phénotypes des différents allèles de *notch* n'a cessé d'apporter des informations sur ses diverses fonctions et ses modes d'action.

II. Les acteurs de la voie Notch sont conservés au cours de l'évolution :

La voie de signalisation Notch comme la plupart de ses acteurs sont très conservés chez tous les métazoaires où ils ont été identifiés, depuis les nématodes jusqu'aux mammifères.

La famille du récepteur Notch est constituée de la protéine Lin-12, chez *Caenorhabditis elegans,* et des protéines Notch (un gène chez la drosophile codant pour la protéine Notch ; quatre chez les mammifères codant pour les protéines Notch 1 à 4).

Leurs ligands appartiennent à la famille DSL (Delta, Serrate, Lag-2). Lag-2 est un des ligands de Lin-12 chez *Caenorhabditis elegans*. Delta et Serrate sont les ligands exprimés chez la drosophile. Et il existe cinq ligands chez les mammifères qui peuvent être divisés en deux sous-classes selon leur degré d'homologie avec les ligands de drosophile Delta et Serrate :

- Delta-like 1, 3 et 4 qui sont très homologues à Delta

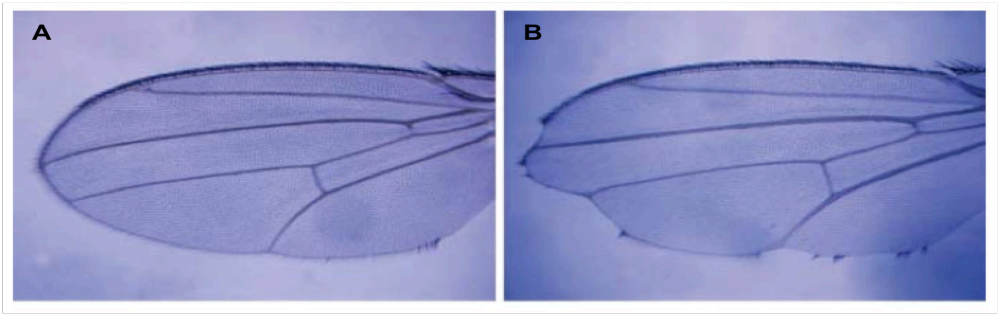


Figure 1 : Phénotype d'une aile de drosophile avec une perte de fonction partielle du gène *notch* (d'après Radtke and Raj, 2003) : A : Aile sauvage ; B : Aile du mutant *notch*

- Jagged 1 et 2, très homologues à Serrate

Notons que si la plupart des acteurs de la voie Notch, y compris récepteurs et ligands, sont conservés au cours de l'Evolution, certains autres qui sont exprimés chez la drosophile n'ont pas d'homologues identifiés, pour l'instant, chez les mammifères : c'est le cas des gènes des familles *hairless* ou *bearded* (Bardin and Schweisguth, 2006; Maier, 2006).

III. La voie Notch est activée lors de contacts intercellulaires :

L'une des originalités de la voie Notch est que les récepteurs et les ligands mis en jeu sont tous des protéines transmembranaires de type I.
L'activation de Notch se limite donc à des contacts intercellulaires établis entre deux cellules adjacentes, dont l'une est dite émettrice – celle qui exprime des ligands fonctionnels – et l'autre réceptrice – qui exprime des récepteurs fonctionnels interagissant avec les ligands de la cellules émettrice (Bray, 2006).

La voie de signalisation Notch est en conséquence une voie de communication intercellulaire dont les mécanismes d'activation sont conservés.

IV. Les effets de la voie Notch sont basés sur des mécanismes d'action conservés :

Le développement des métazoaires repose sur de nombreux événements de communication intercellulaire et de signalisation permettant de contrôler le devenir des cellules. Une cellule donnée peut rester dans un état quiescent, un état réplicatif, mais peut aussi être engagée dans un processus de différenciation, ou encore déclencher sa propre mort cellulaire. Le devenir des cellules est contrôlé par deux mécanismes distincts :

- une inhibition latérale, ou spécification latérale, qui permet l'émergence de deux types cellulaires à partir de cellules initialement identiques.
- une signalisation inductive ou instructive, qui permet la spécification d'un type cellulaire donné au sein de cellules initialement différentes.

Je m'appuierai particulièrement sur trois processus développementaux chez la drosophile, très étudiés et bien décrits, qui sont les plus adaptés à la compréhension de ces deux mécanismes d'action.

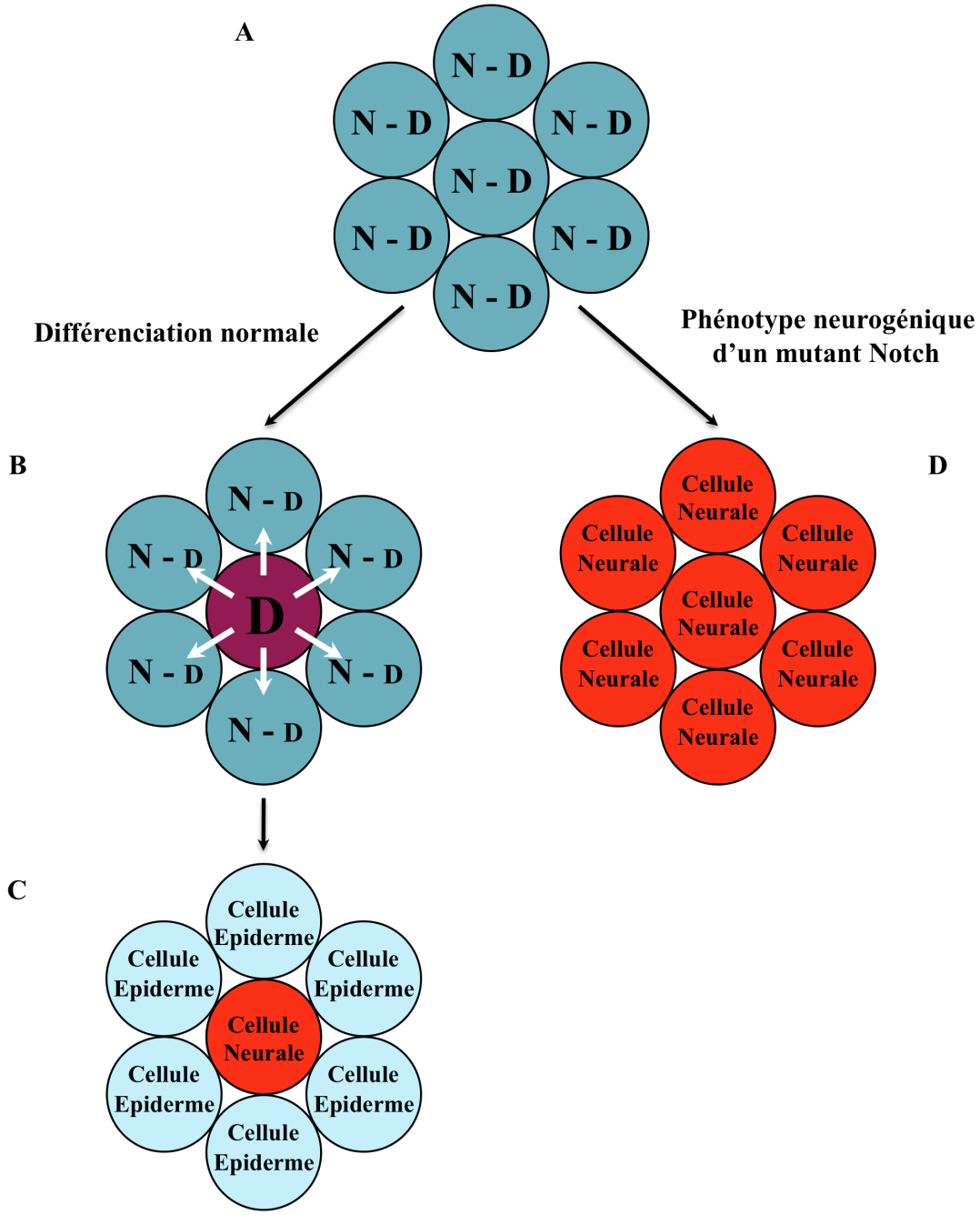


Figure 2 : L'inhibition latérale au cours de la neurogenèse de la drosophile
A : Au sein du neuro-ectoderme, toutes les cellules expriment Notch (N) et Delta (D) et possèdent la même potentialité neurale.
B : A la suite d'un événement stochastique, certaines cellules expriment davantage de ligand Delta (D) et activent le récepteur Notch exprimé par leurs cellules adjacentes.
C : Les cellules Delta gardent leur potentiel neural et se différencient en neuroblastes précurseurs des cellules neurales. Au contraire, l'activation de la signalisation Notch dans leurs cellules adjacentes inhibe la différenciation neurale, ces cellules se différencient en dermoblastes précurseurs des cellules épidermiques.
D : Dans le cas d'une perte de fonction Notch, l'ensemble des cellules se différencient en neuroblastes, c'est ce que l'on appelle le phénotype neurogénique

1. L'inhibition latérale :

Ce premier type de signalisation permet l'émergence de deux types cellulaires distincts au sein d'un groupe de cellules homogènes, d'où le terme de spécification latérale également employé pour désigner ce mécanisme. C'est l'étude des organismes modèles comme *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans* qui a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette ségrégation (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Greenwald, 1998).

a. Le rôle de la voie Notch au cours de la neurogenèse de la drosophile :

La neurogenèse chez la drosophile est initiée, au sein du territoire neuro-ectodermique, par la séparation entre des précurseurs neuraux (nommés neuroblastes) et une couche de précurseurs épidermiques (appelés dermoblastes).
Le neuro-ectoderme est un épithélium homogène, composé d'environ 1800 cellules, chacune exprimant des quantités équivalentes de récepteur Notch et de ligand Delta (Kooh et al., 1993), s'envoyant donc mutuellement des signaux inhibiteurs de différenciation semblables. Chacune des cellules exprime également les gènes proneuraux *achaete-scute* (*ac/sc*) codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement du système nerveux, ce qui leur confère un potentiel de différenciation neurale comparable.

Pourtant, par le biais d'un événement stochastique – ou peut-être d'une signalisation intrinsèque ou extrinsèque – certaines des cellules vont exprimer un peu plus de ligands Delta, émettant alors des signaux inhibiteurs de différenciation un peu plus forts à leurs cellules adjacentes, cellules réceptrices.
Le récepteur Notch des cellules réceptrices est alors activé, et sa signalisation inhibe l'expression des gènes proneuraux *ac/sc*, réprimant ainsi le destin neural de ces cellules et favorisant leur différenciation en dermoblastes, précurseurs de cellules épidermiques.
Au contraire, les cellules émettrices continuent d'exprimer les gènes *ac/sc* et s'engagent dans une différenciation en neuroblastes, précurseurs des cellules neurales.

Ce biais est par ailleurs amplifié par la signalisation Notch qui, dans les cellules réceptrices, inhibe l'expression du ligand Delta (via l'inhibition de l'expression d'*ac/sc*). Cette perte d'expression de Delta diminue ainsi l'intensité du signal inhibiteur de différenciation envoyé aux cellules émettrices, favorisant le caractère émetteur ou récepteur

de chacun des deux pools de cellules, et scellant leurs devenirs respectifs (Heitzler et al., 1996).

Ce mécanisme d'inhibition latérale permet donc de contrôler précisément le nombre des deux types de cellules ségrégées à partir du neuro-ectoderme : un quart de neuroblastes et trois quarts de dermoblastes.
Les cellules qui s'engagent dans une voie de différenciation neurale empêchent leurs voisines de suivre la même voie en activant la voie Notch qui les mènent vers une différenciation épidermique.
Rappelons que la voie Notch est essentielle à ce processus puisque, si elle n'est pas activée, toutes les cellules du neuro-ectoderme, qui expriment les gènes *ac/sc*, se différencient en cellules neurales, menant au phénotype neurogénique décrit précédemment.

On retrouve également ce mécanisme chez les vertébrés, par exemple dans le développement de l'oreille interne. Dans ce cas, les précurseurs sensoriels qui expriment davantage de ligands Dll1 et Jagged2 vont se différencier en cellules sensorielles ciliées, tout en inhibant cette différenciation dans leurs cellules voisines, où Notch est activé, qui deviendront des cellules de soutien (Bryant et al., 2002).

b. Le rôle de la voie Notch dans la formation des organes sensoriels externes de la drosophile :

Le mécanisme d'inhibition latérale intervient à plusieurs reprises durant la formation des organes sensoriels chez la drosophile.
Les organes sensoriels externes de la drosophile sont constitués de quatre cellules : cellule socle, cellule soie, cellule gaine et neurone. L'ensemble de ces cellules provient d'une même cellule précurseur, la cellule SOP (Sensory Organ Precursor) appelée également pI (Posakony, 1994), qui va subir quatre divisions asymétriques successives.

Tout d'abord, la voie de signalisation Notch permet de contrôler le nombre de cellules SOP au sein d'un épithélium grâce à un mécanisme d'inhibition latérale. Les cellules émettrices d'un signal deviendront des SOP, alors que les cellules où la voie Notch est activée suivront un destin différent.

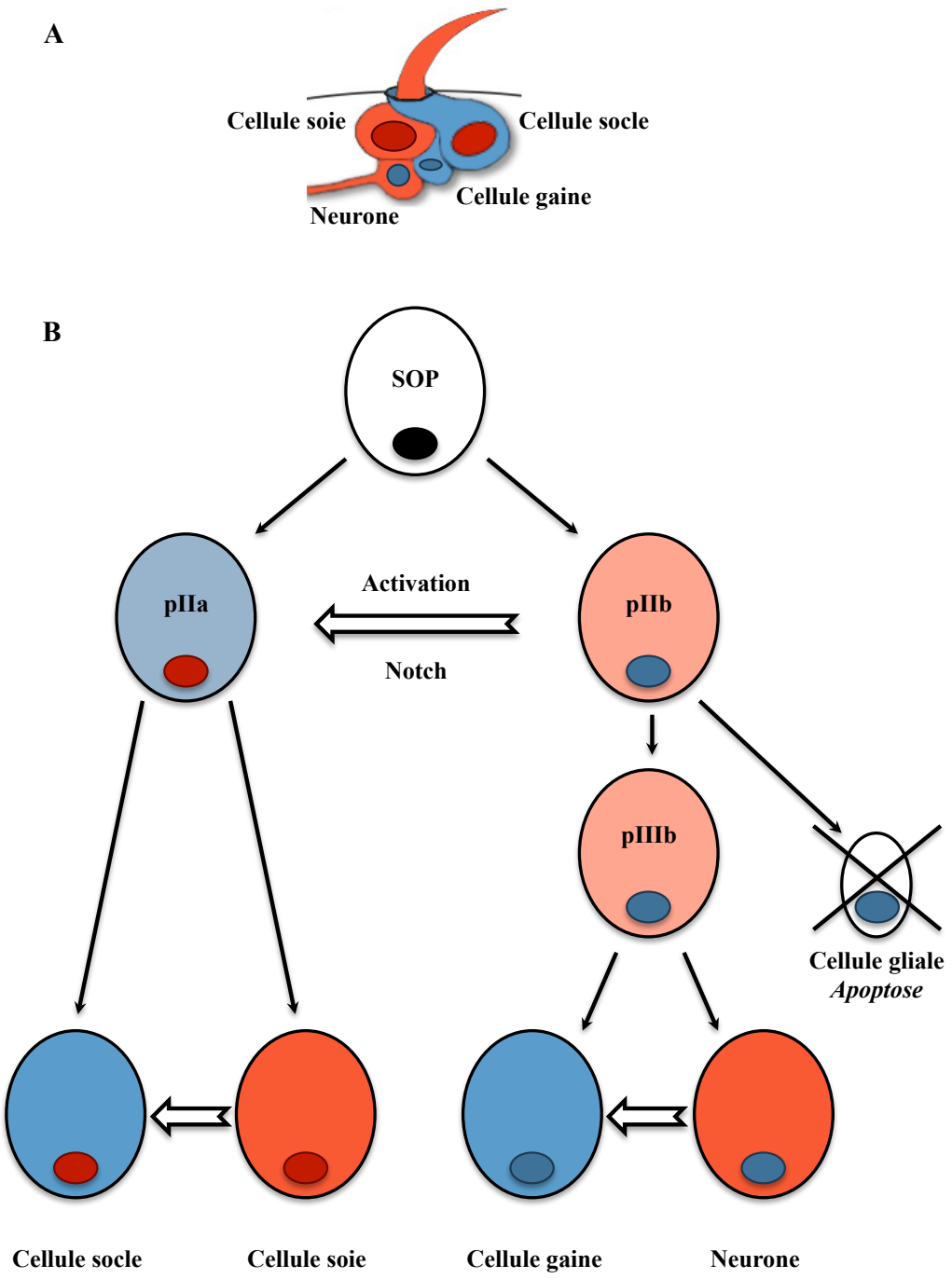


Figure 3 : L'inhibition latérale au cours de la formation des organes sensoriels externes de la drosophile. A : Schéma d'un organe sensoriel externe de drosophile (d'après Fürthaeur and González-Gaitán, 2009).
B : Schéma du lignage cellulaire à partir d'une cellule SOP. La cellule SOP se divise de façon asymétrique générant une cellule fille pIIb qui active la signalisation Notch dans l'autre cellule fille pIIa. Par une division asymétrique, la cellule pIIa donne naissance aux cellules soie et socle, la cellule soie activant Notch dans la cellule socle. De la même manière, la cellule pIIIb, issue de la cellule pIIb, se divise asymétriquement en un neurone et une cellule gaine, le neurone activant Notch dans la cellule gaine. La cellule gliale issue de la cellule pIIb meurt par apoptose (Gho et al., 1999).

Une fois les cellules SOP déterminées, celles-ci se divisent de façon asymétrique pour donner naissance à deux cellules filles appelées pIIa et pIIb.
La division asymétrique est basée sur la distribution inégale, au cours de la mitose, d'un déterminant qui va définir une différence d'identité entre les deux cellules filles.
Dans le cas des cellules SOP, les deux cellules filles possèdent une quantité comparable de récepteur Notch et de ligand Delta.

Pourtant, certains déterminants cellulaires vont être ségrégés asymétriquement : c'est le cas de Numb, un inhibiteur de la voie Notch dont le mécanisme d'action est encore incompris (Gulino et al., 2010). Numb est déjà localisé de façon asymétrique dans les cellules SOP, et n'est retrouvé après la mitose que dans les cellules pIIb (Rhyu et al. 1994). En conséquence de cette répartition déséquilibrée de Numb, les cellules pIIb, émettrices, envoient un signal qui active le récepteur Notch exprimé dans les cellules pIIa, ce qui crée deux identités cellulaires distinctes :

- les cellules pIIb deviendront des cellules « internes », donnant naissance au neurone et à la cellule gaine.
- les cellules pIIa deviendront des cellules « externes », donnant naissance aux cellules soie et socle.

Au cours de ce processus, le mécanisme d'inhibition latérale n'amplifie donc pas un biais apparu de manière stochastique comme pendant la neurogenèse, mais un biais introduit par division asymétrique.

Dans le cas d'une perte de fonction Notch, la cellule SOP génère deux cellules pIIb, et à l'inverse, dans le cas d'un gain de fonction Notch, elle produit deux cellules pIIa. L'activité du récepteur Notch est donc indispensable pour la décision binaire pIIa / pIIb par inhibition latérale (Coumailleau et al., 2009; Schweisguth et al., 1996).

A leur tour, les cellules pIIa et pIIb vont se diviser de façon asymétrique, et encore une fois Notch interviendra pour la décision binaire cellule socle / cellule soie issues de pIIa ou cellule gaine / neurone issus de pIIb, permettant à chaque type cellulaire d'être correctement spécifié.

Ainsi, au cours du développement des organes sensoriels externes de drosophile, chaque division repose sur une décision binaire, à partir d'un précurseur qui permet de générer deux cellules distinctes, qui se décompose en deux étapes successives :

- une division asymétrique engendrant la répartition inégale d'un déterminant cytoplasmique.

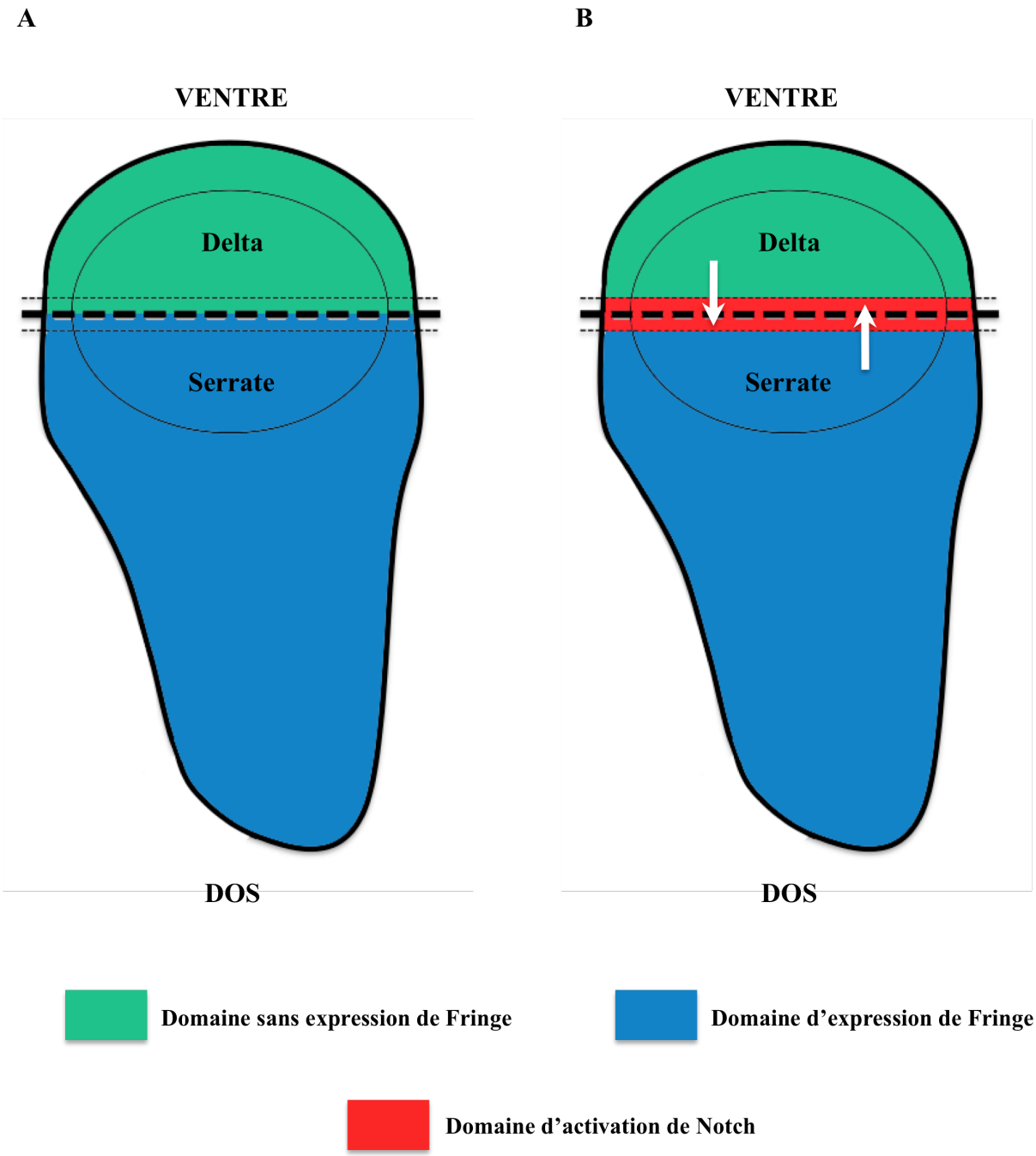


Figure 4 : La signalisation inductive au cours du développement de l'aile de drosophile : formation d'une frontière dorso-ventrale dans le disque imaginal

A : Régionalisation de l'expression des ligands de Notch (Delta et Serrate) ainsi que de l'enzyme Fringe. Notch est exprimé dans toutes les cellules du disque imaginal.

B : Notch est activé dans deux couches de cellules à la frontière dorso-ventrale où il va permettre l'expression des gènes *wingless*, *cut* et *vestigial* qui participent à la formation de l'aile.

- une communication intercellulaire de type inhibition latérale par la voie de signalisation Notch.

2. La signalisation inductive ou instructive :

Ce deuxième type de communication intercellulaire met en jeu deux types cellulaires distincts qui expriment notamment des répertoires de ligands et de récepteurs différents. Dans ce cas, la signalisation Notch va permettre d'induire (ou d'instruire) la différenciation vers un type de cellules donné.
C'est via ce mécanisme que la voie de signalisation Notch va participer à la définition d'une frontière entre deux populations de cellules distinctes.

Un exemple de ce type de signalisation se produit lors du développement de l'aile de drosophile. En effet, au cours du stade larvaire de la drosophile, la voie Notch participe à la régionalisation d'une zone particulière au sein du disque imaginal, zone qui forme une frontière frontale (ou dorso-ventrale) et qui conduit finalement à la formation d'une aile.

Lors du développement de ce tissu, le récepteur Notch et le ligand Delta sont exprimés dans toutes les cellules du disque imaginal.
Par contre, l'expression du ligand Serrate et de l'enzyme glycosyltransférase Fringe est restreinte à la partie dorsale (Irvine and Vogt, 1997).
Fringe inhibe l'activation de Notch par Serrate, donc Serrate active uniquement le récepteur Notch exprimé par la couche de cellules ventrales limitrophe de la frontière entre les deux compartiments (dorsal et ventral).
A l'inverse, lorsque Fringe est co-exprimée avec Notch, elle stimule son activation par le ligand Delta. Notch va donc être activé par Delta uniquement dans la couche de cellules dorsales adjacente à la frontière des deux compartiments (Irvine, 1999; Irvine and Vogt, 1997).

Au final, la voie Notch n'est activée que dans deux couches de cellules situées de part et d'autre de l'interface dorso-ventral. En conséquence de cette signalisation croisée, ces cellules expriment des gènes spécifiques tels que *wingless*, *cut*, et *vestigial* qui participeront à former dans cette zone le centre organisateur du développement et de la croissance coordonnée de l'aile selon l'axe antéro-postérieur.

3

LES ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA VOIE NOTCH CHEZ LES MAMMIFERES

I. Invalidation des gènes de la voie Notch

1. Invalidation des gènes codant pour les récepteurs Notch

2. Invalidation des gènes codant pour les ligands Delta et Jagged

II. Quelques exemples du rôle physiologique de la voie Notch chez les mammifères

1. La voie de signalisation Notch dans la neurogenèse

a. La neurogenèse chez les mammifères

b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans la neurogenèse

2. La voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde

a. L'hématopoïèse et le lignage lymphoïde chez les mammifères

b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde

Engagement vers la voie lymphoïde T et inhibition lymphoïde B

Autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

3. La voie de signalisation Notch dans la différenciation de l'épiderme

a. L'épiderme chez les mammifères

b. Rôles de la voie Notch dans l'épiderme

III. Quelques exemples de pathologies associées à la voie Notch chez les mammifères

1. La voie de signalisation Notch est impliquée dans les cancers

a. Notch est un oncogène : exemple des Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T

b. Notch est un suppresseur de tumeurs : exemple des cancers de la peau

2. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome CADASIL

3. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome d'Alagille

LES ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA VOIE NOTCH CHEZ LES MAMMIFERES

Afin de décrire les mécanismes d'action de la voie Notch, nous venons d'aborder plusieurs processus développementaux chez la drosophile dans lesquels la voie de signalisation Notch intervient de façon nécessaire : la différenciation des cellules neurales et épidermiques, le développement des organes sensoriels externes et celui de l'aile.

Chez les mammifères, Notch intervient dans bien d'autres processus physiologiques et est impliqué dans diverses pathologies. Je m'appuierai sur les effets observés lors d'invalidations de Notch chez les mammifères pour développer quelques exemples du rôle physiologique et des dérégulations pathologiques de la voie Notch.

I. Invalidation des gènes de la voie Notch :

De nombreuses expériences de manipulations génétiques ont été réalisées chez la souris, permettant l'étude des fonctions de la voie Notch *in vivo*.

1. Invalidation des gènes codant pour les récepteurs Notch :

L'invalidation des gènes *notch1* et *notch2* mène à une létalité embryonnaire observée à 11,5 jours de développement (Hamada et al., 1999; Swiatek et al., 1994), ce qui montre que la voie Notch est indispensable au développement post-implantatoire.

Les embryons invalidés pour *notch1* présentent des défauts de somitogenèse et de vascularisation (Conlon et al., 1995; Krebs et al., 2000), alors que l'invalidation de *notch2* engendre une forte augmentation de l'apoptose dans les tissus neuraux (Hamada et al., 1999).

Les souris invalidées pour les gènes *notch3* et *notch4* sont viables et ne présentent pas d'anomalie remarquable (Krebs et al., 2003a; Krebs et al., 2004).

Toutefois des souris double mutantes pour *notch1* et *notch4* présentent un phénotype aggravé quant aux défauts de vascularisation observés avec la seule invalidation de *notch1*, mettant en évidence non seulement le rôle de Notch4 dans la vascularisation, mais aussi une certaine redondance fonctionnelle.

Cette redondance reste cependant limitée puisque la perte de *notch1* ou *notch 2* ne peut absolument pas être compensée par l'expression d'un des trois autres gènes Notch.

Pour s'affranchir de la mort précoce des embryons invalidés pour le gène *notch1*, diverses invalidations conditionnelles, spécifiques de tissus, ont par exemple été réalisées :

- dans le neuro-épithélium, montrant un rôle de Notch1 dans la neurogenèse et la gliogenèse (Lutolf et al., 2002)
- dans le système lymphoïde, déterminant le rôle de Notch1 dans le lignage des lymphocytes T au détriment des lymphocytes B (Radtke et al., 1999)
- dans l'épiderme, mettant en évidence le rôle de Notch1 dans la différenciation des cellules épidermiques (Nicolas et al., 2003)

2. Invalidation des gènes codant pour les ligands Delta et Jagged :

L'invalidation des ligands de Notch mène à des dysfonctionnements des processus développementaux semblables à ceux observés en cas d'absence de récepteurs fonctionnels. L'invalidation de *dll1* ou de *dll3* perturbe la somitogenèse (Hrabe de Angelis et al., 1997; Kusumi et al., 1998), alors que celle de *dll4* ou *jagged1* aboutit à des défauts de vascularisation (Duarte et al., 2004; Xue et al., 1999). L'invalidation de *jagged2* provoque des anomalies cranofaciales et une syndactylie (Jiang et al., 1998).

L'ensemble de ces données démontre l'importance de la voie de signalisation Notch chez les mammifères. Elle est nécessaire dès le développement post-implantatoire et est essentielle au bon déroulement de la neurogenèse, de la somitogenèse et de la vascularisation. Plus tardivement, elle est indispensable à la différenciation du système nerveux, de l'épiderme et du système hématopoïétique, que je vais maintenant vous décrire.

II. Quelques exemples du rôle physiologique de la voie Notch chez les mammifères :

1. La voie de signalisation Notch dans la neurogenèse :

a. La neurogenèse chez les mammifères :

La neurogenèse est initiée au cours du développement embryonnaire par le processus d'induction neurale. Suite à la formation des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme), le feuillet mésodermique envoie des signaux vers l'ectoderme qui

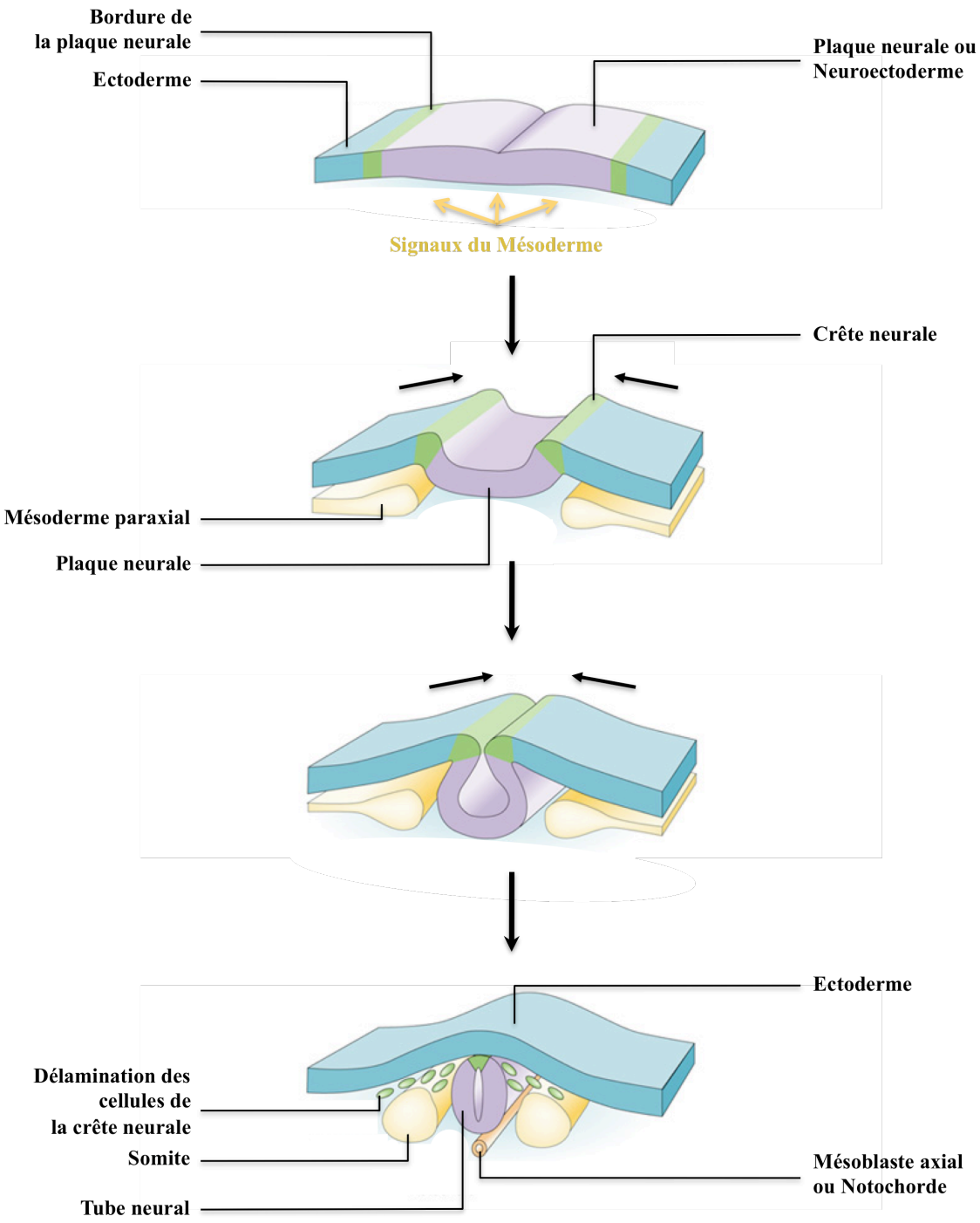


Figure 5 : Neurogenèse et formation du tube neural chez les mammifères

induisent alors la formation de la plaque neurale, appelée encore neuro-ectoderme. La plaque neurale va ensuite se replier pour former le tube neural.
Parallèlement, il se forme de part et d'autre du tube neural une région appelée crête neurale caractéristique des vertébrés. Une fois le tube neural replié et fermé, les cellules de la crête neurale, localisées dans la partie dorsale du tube, commencent à délaminer et à migrer (Huang and Saint-Jeannet, 2004).

Il existe deux types de cellules souches neurales :

- les cellules souches du système nerveux central (SNC), issues du tube neural, qui ont la capacité de donner naissance aux neurones, aux astrocytes et aux oligodendrocytes.
- les cellules souches de la crête neurale (CSNC), qui migrent depuis la partie dorsale du tube neural et s'agrègent pour former les ganglions du système nerveux périphérique, pouvant donner naissance aux neurones et aux cellules gliales périphériques.

b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans la neurogenèse :

Comme nous l'avons vu chez la drosophile, la voie de signalisation Notch est intimement liée à la régulation de la neurogenèse, une mutation perte de fonction du gène *notch* induisant un phénotype neurogénique. Cette fonction d'inhibition de la neurogenèse a été conservée au cours de l'Evolution et vérifiée chez les amphibiens, les oiseaux, ainsi que chez les mammifères grâce à l'analyse de souris invalidées de façon conditionnelle pour *notch1* (Lutolf et al., 2002).

Au niveau du tube neural, au cours de l'embryogenèse, l'activation du récepteur Notch permet de maintenir la pluripotence des cellules souches neurales et inhibe l'engagement des cellules dans une voie de différenciation en neurones (de la Pompa et al., 1997). Un modèle d'inhibition latérale a d'ailleurs été proposé, analogue à celui établi dans la neurogenèse chez la drosophile.

Au cours de la neurogenèse plus tardive, le rôle de la voie Notch a été étudié sur des cultures *in vitro* de cellules souches CSCN en présence de ligands Delta1.
L'activation de Notch induit la différenciation de ces cellules souches en cellules gliales – de type cellules de Schwann – au détriment de la différenciation neurale (Morrison et al., 2000).

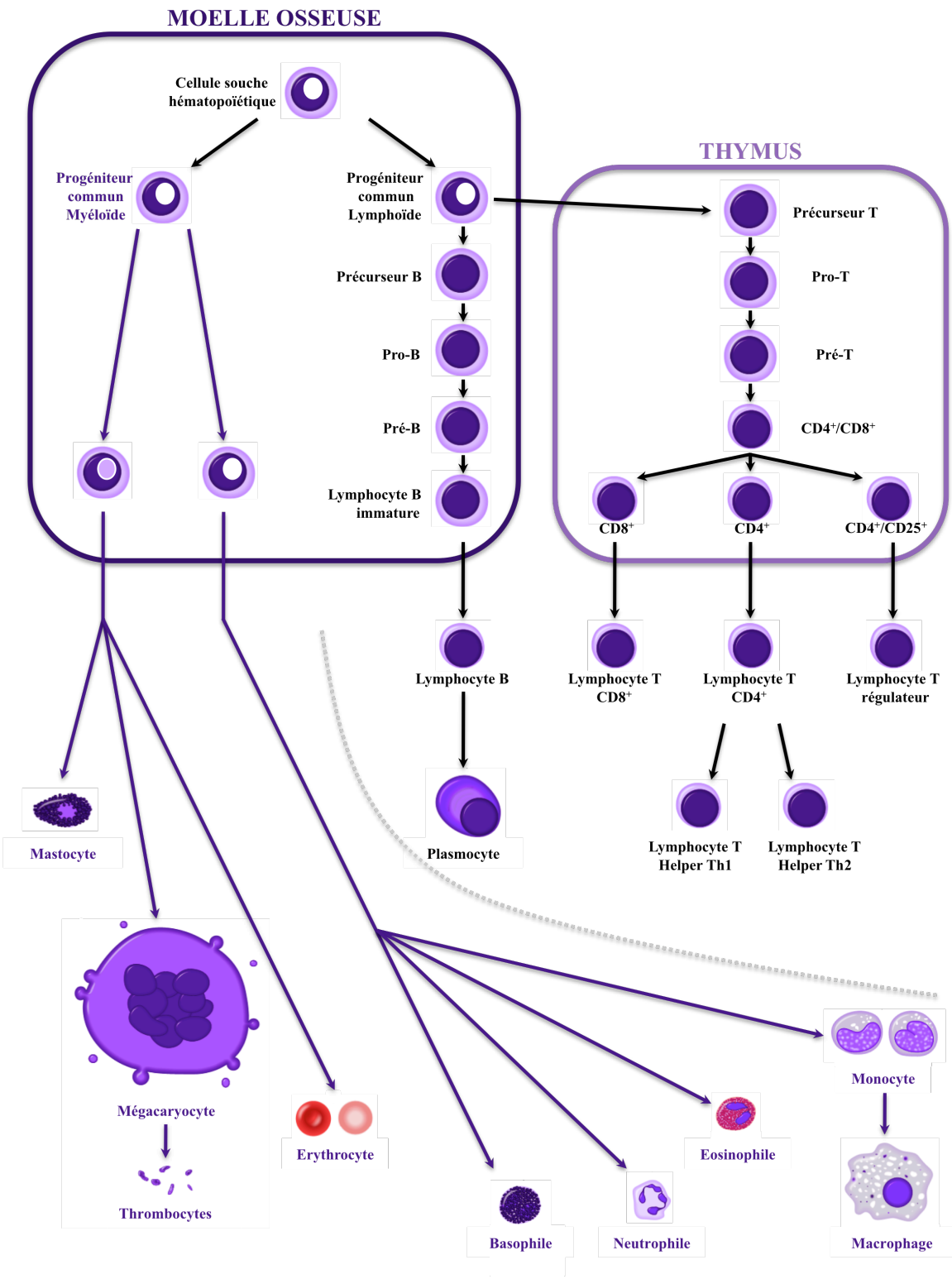


Figure 6 : L'hématopoïèse dans la moelle osseuse, le thymus et à la périphérie

Notch inhibe en fait l'expression de gènes proneuraux tels que la Neurogénine ou Mash-1, l'orthologue des gènes *achaete-scute* de drosophile (Morrison et al., 2000).
Et, parallèlement, Notch induit l'expression de gènes gliaux, comme la protéine acide fibrillaire gliale.

Ainsi la voie de signalisation Notch joue-t-elle initialement un rôle dans le maintien de cellules souches neurales multipotentes, avant d'induire, lors de stades plus tardifs, la gliogenèse en inhibant la neurogenèse à partir d'un progéniteur CSNC bipotentiel.

2. La voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde :

a. L'hématopoïèse et le lignage lymphoïde chez les mammifères :

L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les lignées de cellules sanguines sont générées durant la vie embryonnaire, fœtale et adulte.
Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'origine de ce processus sont générées à l'extérieur de l'embryon, dans le sac vitellin, et dans une zone intra-embryonnaire proche de l'aorte-gonades-mésonéphros (AGM) (Godin and Cumano, 2007). Puis elles colonisent le foie fœtal et finalement la moelle osseuse qui constitue l'unique source de CSH à l'âge adulte.

La cellule souche hématopoïétique est multipotente et a le choix entre quiescence, division à des fins d'autorenouvellement, ou encore engagement et différenciation dans un lignage sanguin donné.
Lors d'un engagement vers une différenciation, la CSH génère alors des populations intermédiaires de pré-progéniteurs, puis de progéniteurs et finalement de précurseurs dont les potentiels de prolifération et de différenciation sont de plus en plus limités, aboutissant à la production de cellules matures spécialisées (Metcalf, 1989).

Le maintien à l'état multipotent de progéniteurs, la génération constante de cellules matures et l'homéostasie des différentes populations hématopoïétiques requièrent un réseau de régulations complexes faisant intervenir signaux extrinsèques – microenvironnement et interactions cellules-cellules – ou intrinsèques – médiés par des facteurs de transcription.

Dans la suite de la présentation, je me restreindrai à la description et au rôle de la voie Notch dans le lignage lymphoïde.

Les progéniteurs lymphoïdes apparaissent dans la moelle osseuse où ils peuvent suivre deux engagements distincts :

- une différenciation lymphoïde B
- une migration dans le thymus où ils s'engagent dans une différenciation lymphoïde T

Les lymphocytes B et T migrent ensuite vers les organes lymphoïdes périphériques, comme la rate, où ils subissent des étapes de maturations générant des lymphocytes fonctionnels.

b. Rôles de la voie de signalisation Notch dans l'hématopoïèse et le lignage lymphoïde :

Depuis la première démonstration de l'implication du récepteur Notch1 dans la leucémie lymphoblastique aigüe de type T, sur laquelle je reviendrai un peu plus tard (Ellisen et al., 1991), de nombreux travaux basés sur des invalidations conditionnelles du récepteur Notch ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie Notch dans la régulation du destin cellulaire et dans l'autorenouvellement des progéniteurs, et cela à différentes étapes de l'hématopoïèse.

Je limiterai toutefois ma description aux étapes précoces de l'hématopoïèse, sans aborder les étapes de maturation des lymphocytes T et B dans lesquelles Notch intervient aussi.

Engagement vers la voie lymphoïde T et inhibition lymphoïde B

Le récepteur Notch1 est exprimé dans les précurseurs hématopoïétiques normaux de la moelle osseuse (Milner et al., 1994).

L'invalidation conditionnelle du récepteur Notch1 engendre un blocage complet de la différenciation lymphoïde T et un développement ectopique de lymphocytes B dans le thymus (Radtke et al., 1999; Wilson et al., 2001), ce qui suggère que la signalisation Notch joue un rôle fondamental dans l'induction de la différenciation des lymphocytes T et l'inhibition du développement des cellules B.

Les récepteurs Notch2 et Notch3 sont également exprimés dans les précurseurs hématopoïétiques. Pourtant, leur invalidation conditionnelle n'a pas de conséquence sur le système hématopoïétique lymphoïde (Krebs et al., 2003b; Saito et al., 2003) ce qui suggère que Notch1 est bien responsable de l'engagement des progéniteurs vers la différenciation lymphoïde T sans redondance avec les autres récepteurs.

Inversement, des expériences gain de fonction avec Notch1-ICD ou le ligand Delta4 induisent un développement ectopique de lymphocytes T dans la moelle osseuse et une inhibition du développement lymphoïde B.

En conclusion, le récepteur Notch envoie aux progéniteurs lymphoïdes communs un signal induisant leur engagement vers le lignage lymphoïde T au détriment du lignage lymphoïde B.

En absence de signalisation Notch, ces progéniteurs bipotentiels se développent donc en lymphocytes B, comme c'est le cas lors de l'invalidation du récepteur Notch, ou comme c'est le cas si les progéniteurs lymphoïdes restent dans le microenvironnement normal de la moelle osseuse où la signalisation Notch est probablement inhibée pour permettre le développement des lymphocytes B.

Quels sont les mécanismes moléculaires contrôlés par Notch et responsables de cette induction du lignage T ?

Le rôle du facteur de transcription Pax5 dans le contrôle de l'engagement des CSH dans la voie lymphoïde B est clairement établi (Nutt et al., 1999).

Les souris invalidées pour Pax5 sont caractérisées par un blocage de la lymphopoïèse B au stade Pro-B (deuxième stade après le progéniteur lymphoïde B). A l'inverse, la surexpression de Pax5 dans les CSH engendre une augmentation de la lymphopoïèse B et un blocage du développement des lymphocytes T, un phénotype qui est donc inverse à celui obtenu par la surexpression de Notch dont on sait que sa signalisation est inhibée par Pax5 (Souabni et al., 2002). Ces observations peuvent suggérer que Notch1 régule, de façon réciproque, le facteur de transcription Pax5.

Grâce à un système de coculture entre des cellules stromales de moelle osseuse exprimant stablement le ligand Delta1 (appelée OP9-Dll1) et des cellules CSH, il a été montré que l'activation du récepteur Notch des cellules CSH entraîne une diminution de l'expression de Pax5 ainsi que, comme attendu, une induction du lignage T parallèle à l'inhibition du lignage B (Hoflinger et al., 2004). La répression du gène cible Pax5 pourrait donc constituer une étape cruciale dans l'inhibition du développement B par la voie de signalisation Notch.

L'activation de Notch dans les progéniteurs engendre l'inhibition de l'expression d'autres gènes impliqués dans la différenciation lymphoïde B comme EBF (Early B cell Factor), Pax 5 et λ5 ; alors que des gènes impliqués dans la différenciation lymphoïde T sont au contraire activés, comme pré-Tα, CD3, GATA3 ou TCF1 (Hoflinger et al., 2004).

Dans la moelle osseuse, le microenvironnement des CSH est constitué de cellules stromales exprimant plusieurs des ligands de Notch : Delta1, Delta4 et Jagged1.
De façon intéressante, si l'effet de Delta1 et Delta4 est similaire et médie l'inhibition du lignage B et l'induction de la différenciation lymphoïde T (Hozumi et al., 2004), l'effet de Jagged1 peut être semblable ou bien inverse à certains stades du développement, montrant que la dynamique spatio-temporelle de l'expression des ligands de Notch a toute son importance dans la lymphopoïèse.

Autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

L'autorenouvellement des CSH est un processus fondamental qui permet le maintien de cette population multipotente au cours du temps. Il nécessite une régulation fine afin d'atteindre un équilibre nécessaire entre autorenouvellement et différenciation cellulaire.

En plus de son rôle dans la différenciation lymphoïde T, bien caractérisé, la voie de signalisation Notch a également un rôle dans l'autorenouvellement des CSH. Les ligands Delta1, Delta4 et Jagged1 favorisent effectivement le maintien et la prolifération des CSH *in vitro* (Liu et al., 2010).
Par ailleurs, Notch-ICD est capable d'immortaliser des progéniteurs hématopoïétiques qui conservent alors des caractéristiques de cellules pluripotentes et sont par la suite capables de donner naissance aux progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes. Notch-ICD agirait en inhibant la différenciation des cellules souches plutôt qu'en induisant directement leur prolifération (Liu et al., 2010).

Ainsi Notch favorise-t-il l'autorenouvellement des CSH multipotentielles, participant au maintien à l'état basal de cette population de cellules souches (Liu et al., 2010).

3. La voie de signalisation Notch dans la différenciation de l'épiderme :

a. L'épiderme chez les mammifères :

Les mammifères possèdent comme tous les vertébrés un épiderme pluristratifié qui est constitué de 5 couches de kératinocytes (de l'intérieur vers l'extérieur) :

- la couche basale (stratum germinativum), avec une assise de cellules reposant sur une lame basale qui sépare l'épiderme du derme

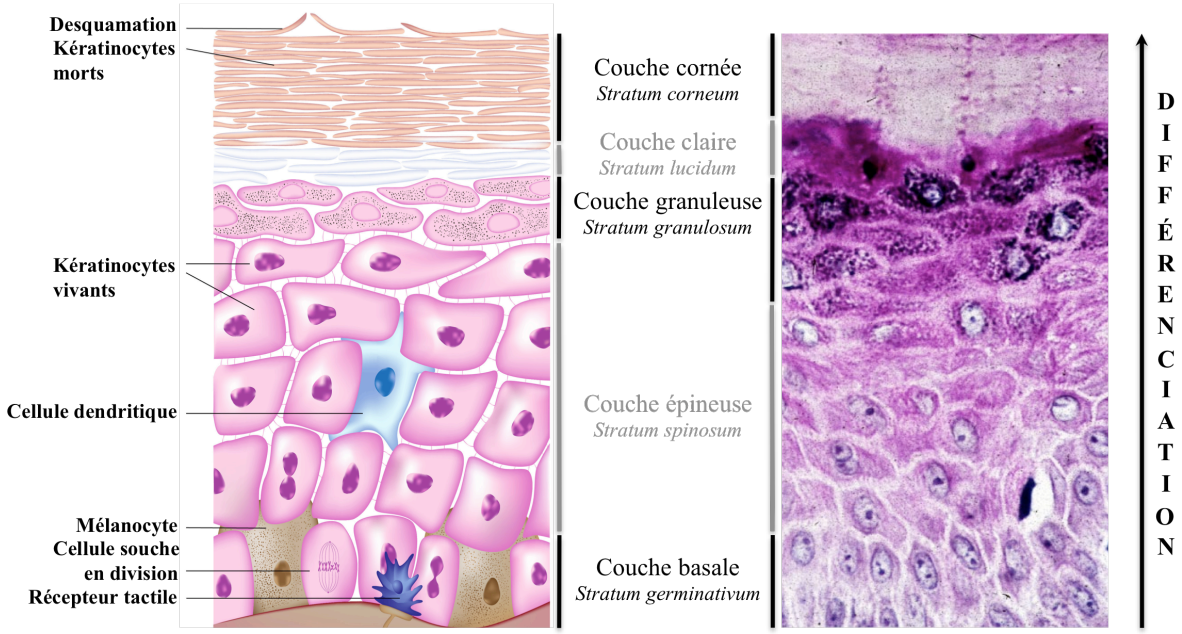


Figure 7 : Structure de l'épiderme des mammifères : représentation schématique et coupe tissulaire

- la couche épineuse (stratum spinosum) ou couche de Malpighi, avec plusieurs assises de cellules
- la couche granuleuse (stratum granulosum) composée de 3 à 4 assises cellulaires
- la couche claire (stratum lucidum), couche de cellules mortes sans noyau
- la couche cornée (stratum corneum) avec des cellules mortes et remplies de kératine

Chaque type de cellules exprime des marqueurs moléculaires différents et caractéristiques.

La peau est l'objet d'un renouvellement incessant de ses cellules tout au long de la vie. Effectivement, les cellules de la peau se différencient sans cesse depuis la couche basale jusqu'à la couche cornée, et le pool de cellules indifférenciées doit être maintenu.
De plus, des altérations de la différenciation des cellules de la peau peuvent engendrer des déshydratations, des infections, voire même des cancers (Demehri et al., 2009).

A l'âge adulte, on retrouve des cellules souches dans deux zones distinctes de la peau. Une première population de cellules souches unipotentes et prolifératives constitue la totalité de la couche germinative basale de l'épiderme. Lorsque ces cellules s'engagent dans la différenciation, elles se détachent de la couche basale et migrent vers l'extérieur (Blanpain and Fuchs, 2009).
Une autre population distincte de cellules souches multipotentes se situe dans le renflement du follicule pileux (Blanpain and Fuchs, 2006; Li and Clevers, 2010). Ces cellules sont quiescentes, mais peuvent entrer en prolifération en réponse à une blessure de la peau ou au cours du cycle normal de croissance du poil, puisqu'elles ont effectivement la capacité de se différencier en cellules épidermiques ou en cellules du follicule pileux (Blanpain and Fuchs, 2009).

b. Rôles de la voie Notch dans l'épiderme :

La voie de signalisation joue deux rôles dans l'épiderme, puisqu'elle contrôle à la fois la différenciation et la prolifération des cellules souches de l'épiderme adulte.

Des expériences d'invalidation conditionnelle de Notch1, ou à l'inverse la surexpression de Notch1-ICD dans la peau ont permis de montrer que la voie de signalisation Notch active le départ des cellules souches basales de leur niche ainsi que leur différenciation terminale en cellules spineuses (Blanpain et al., 2006; Rangarajan et al., 2001), la différenciation terminale étant accompagnée d'un arrêt de la prolifération des cellules.

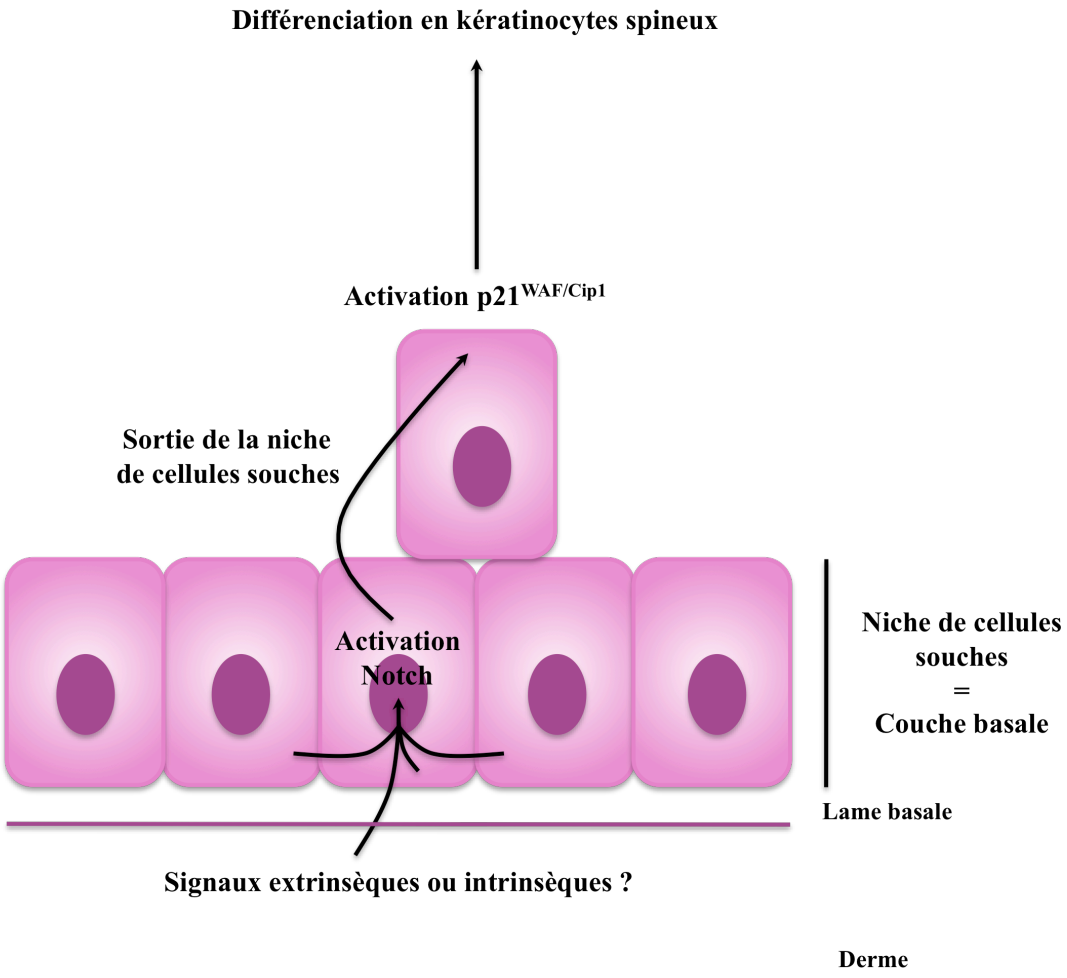


Figure 8 : L'activation de Notch et la différenciation des cellules souches de l'épiderme

Certains des mécanismes moléculaires par lesquels Notch agit dans l'épiderme ont été élucidés. On sait par exemple qu'une activation de Notch dans les kératinocytes augmente l'expression du marqueur précoce de différenciation des kératinocytes $p21^{WAF/Cip1}$, à la fois par une régulation directe et indirecte de sa transcription (Liu et al., 2010).

On ne sait par contre pas expliquer ce qui détermine lesquelles des cellules souches basales vont quitter cette niche de cellules souches et se différencier sous l'influence de Notch. Cela résulte certainement d'événements extrinsèques et intrinsèques encore indéterminés (Liu et al., 2010).

En ce qui concerne la population de cellules souches quiescentes du follicule pileux, il n'y a pour l'instant pas de preuve d'un rôle spécifique de la voie Notch dans la maintenance ou la différenciation de ces cellules souches.
Toutefois, quelques données montrent qu'en absence de Notch, ces cellules souches peuvent se différencier en cellules de l'épiderme ou en cellules du follicule pileux, alors qu'en présence de Notch, seule la différenciation folliculaire est engagée (Demehri and Kopan, 2009).

Nous venons de voir que la voie de signalisation Notch joue des rôles divers et variés, majoritairement dans la prolifération, la différenciation ou le maintien de cellules souches même à l'âge adulte. Il est cependant impossible de généraliser ces effets à tous les tissus, tant ces rôles sont complexes et dépendent du contexte. Impossible de généraliser non plus au sein d'un même tissu, puisque les rôles de Notch sont très spécifiques d'un type cellulaire donné.

III. Quelques exemples de pathologies associées à la voie Notch chez les mammifères :

Puisqu'elle est essentielle au développement de nombreux tissus, il n'est pas étonnant de retrouver des dérégulations de la voie de signalisation Notch associées à ou responsables d'un certain nombre de pathologies.

La voie Notch est par exemple impliquée dans plusieurs processus tumoraux, où elle apparaît tantôt comme un oncogène, tantôt comme un suppresseur de tumeurs.

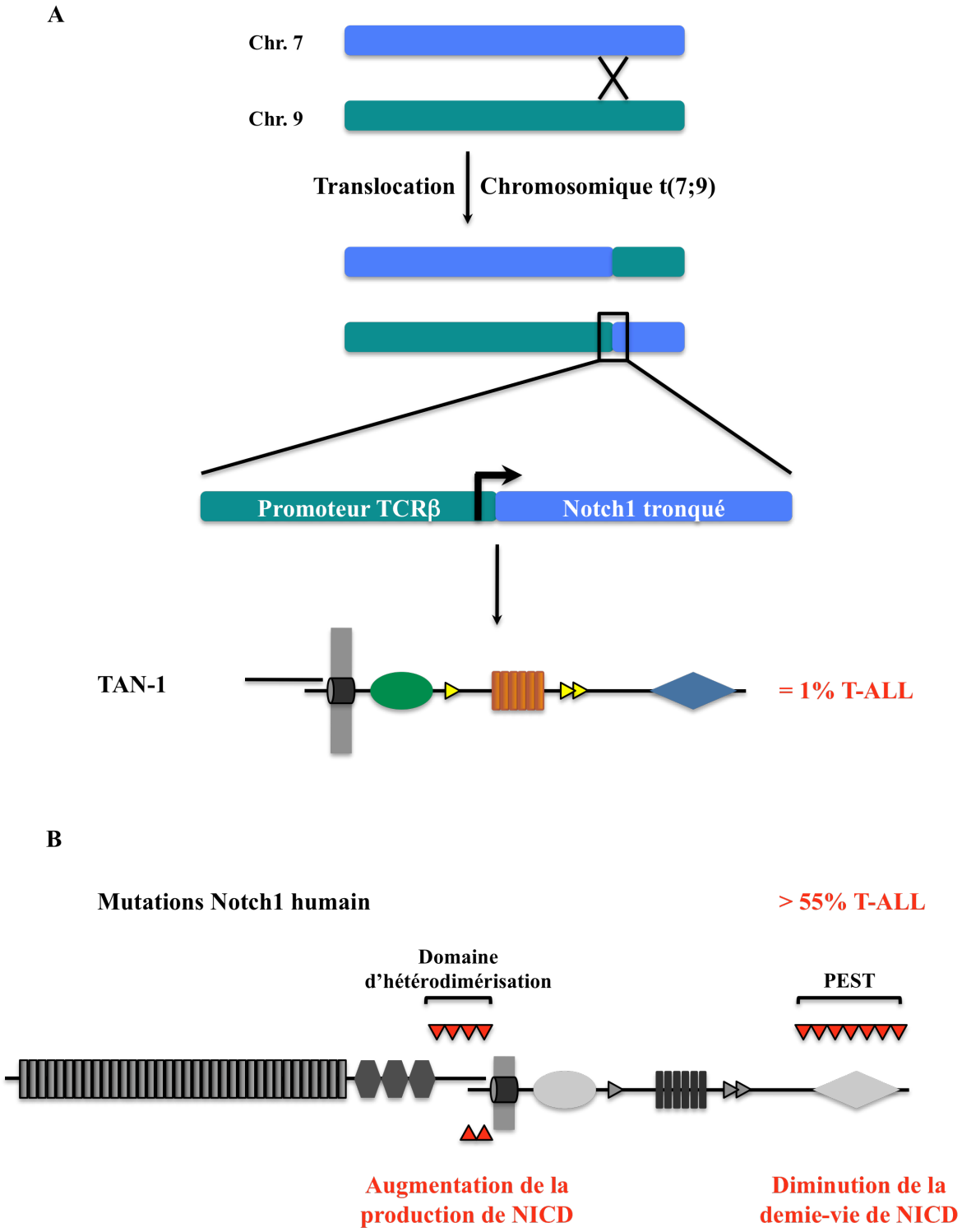


Figure 9 : Mutations et rôle oncogénique de Notch1 dans les Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T. A : Translocation chromosomique et production d'une forme TAN-1 constitutivement active. **B :** Mutations ponctuelles affectant les domaines d'hétérodimérisation et PEST de Notch1 (▲)

Mais des altérations affectant le récepteur Notch ou ses ligands sont retrouvées dans plusieurs autres pathologies dont je décrirai certains exemples.

1. La voie de signalisation Notch est impliquée dans les cancers :

a. Notch est un oncogène : exemple des Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T

Nous avons précédemment vu que la voie Notch est nécessaire au cours de l'hématopoïèse pour le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, mais aussi, et c'est ce qui nous intéresse ici, pour la différenciation lymphoïde T.

Notch fut impliqué pour la première fois dans un cancer humain au début des années 90. En effet, environ 1% des Leucémies Aigües Lymphoblastiques de type T (LAL-T ou T-ALL pour T cell Acute Lymphoblastic Leukemia) ont été associées à une translocation chromosomique t(7;9)(q34;q34.3).

Le clonage et le séquençage de cette translocation chromosomique ont permis d'identifier le premier homologue de Notch chez l'Homme, Notch1.
En effet, cette translocation juxtapose le promoteur de la chaîne β du récepteur à l'antigène des cellules T (TCRβ) et une forme tronquée de Notch1, aboutissant à l'expression d'une forme constitutivement active de Notch1, appelée à l'époque TAN-1 (Translocation-Associated with Notch homologue), qui ressemble au produit de coupure par la métalloprotéase de la famille ADAM (Ellisen et al., 1991).

Des études plus récentes et encore plus probantes ont montré que deux autres types de mutations activatrices de Notch1 étaient liées au T-ALL, dont au moins une est retrouvée dans 55 à 60% et les deux associées dans 10 à 20% des T-ALL humains (Weng et al., 2004).
Ces mutations touchent particulièrement deux domaines de Notch :

- le domaine d'hétérodimérisation
- le domaine PEST

Les mutations affectant le domaine d'hétérodimérisation empêchent la plupart du temps la formation de l'hétérodimère Notch et résultent en la production d'une forme constitutivement active du récepteur, ressemblant au produit de clivage par la métalloprotéase ADAM, forme qui est constitutivement clivée par le complexe γ-secrétase.

Les mutations affectant le domaine PEST sont pour la plupart des mutations non-sens produisant une forme de Notch délétées de leur domaine PEST, domaine qui est normalement impliqué dans la dégradation de Notch par le protéasome.

La conséquence de ces deux types de mutations est la production de formes de Notch soit qui peuvent être constitutivement actives et produire de façon accrue une forme NICD active dans le noyau, soit qui peuvent produire une forme NICD dont la demie-vie est augmentée par son absence de dégradation dans le protéasome (Paganin and Ferrando, 2011; Weng et al., 2004).

Dans tous les cas cas, les mutations de Notch mènent à une activation incontrôlée des gènes cibles de la voie Notch.
Une des cibles directes de Notch les plus modulées dans les T-ALL est l'oncogène Myc, qui est surexprimé sous l'action de Notch, et qui va lui-même agir sur des cibles indirectes de Notch impliquées dans la prolifération cellulaire ou le métabolisme.
Parmi les autres cibles de Notch, on retrouve une augmentation de l'expression :

- de certains acteurs de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR, voie impliquée dans la prolifération et le métabolisme
- de certains effecteurs du cycle cellulaire tels que CCND3 ou CDK4 qui participent à la transition de phase G1/S
- de NF-κB lui même ou d'acteurs essentiels de la voie de signalisation NF-κB, comme les sous-unités du complexe IKK, entraînant une augmentation de l'expression et de la translocation nucléaire de NF-κB et finalement une activation de la survie cellulaire (Ferrando, 2009; Paganin and Ferrando, 2011; Weng et al., 2004)

La voie de signalisation Notch ayant un rôle central dans le développement des T-ALL, l'espoir est né de pouvoir cibler de façon thérapeutique cette signalisation.
La stratégie la plus envisagée, et déjà amplement testée, reste l'inhibition du complexe γ-secrétase, qui clive Notch et génère sa forme transcriptionnellement active, avec des petites molécules inhibitrices appelée GSI (gamma-secretase inhibitors). Ce traitement ne montre pas, pour l'instant, même en complément d'autres chimiothérapies, les résultats escomptés.
Une autre stratégie, qui fait l'objet de récentes recherches pharmaceutiques, serait l'utilisation de peptides synthétiques bloquant l'activité du complexe activateur transcriptionnel contenant

Notch. Ou encore l'utilisation d'anticorps spécifiques ciblant les récepteurs Notch à la surface des cellules et empêchant leur activation (Paganin and Ferrando, 2011).

b. Notch est un suppresseur de tumeurs : exemple des cancers de la peau

Nous avons précédemment décrit le rôle de la voie Notch dans le contrôle du renouvellement et de la différenciation des cellules souches de l'épiderme.

Dans le cas d'une perte de signalisation Notch1 dès le développement embryonnaire, la peau compense, après la naissance, par une hyperplasie, c'est à dire une prolifération aberrante des kératinocytes, créant un environnement favorable au développement de tumeurs (Demehri et al., 2008), suggérant un rôle de suppresseur de tumeurs pour Notch.
D'ailleurs, une réduction modérée de la signalisation Notch dans la peau augmente la susceptibilité de développer un cancer de façon dose-dépendante (Liu et al., 2010).
Inversement, l'expression d'une forme activée de Notch1 dans les kératinocytes entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'expression de marqueurs précoces de différenciation.

Certains des mécanismes moléculaires par lesquels une absence de signalisation Notch induit le développement de tumeurs dans la peau commencent à être élucidés.
On a pu montrer par exemple que p63, un facteur de transcription qui est important dans l'autorenouvellement et la stratification des kératinocytes, est souvent surexprimé dans les tumeurs épithéliales de la peau où la signalisation Notch est, elle, réduite (Lefort and Dotto, 2004). p63 est normalement exprimé dans la couche de cellules prolifératives, puis son expression est inhibée dès que les cellules basales entrent dans une voie de différenciation, parallèlement à l'activation de Notch. L'expression de p63 est inhibée par Notch, certes, mais l'expression de Notch est également inhibée par p63, ce qui, dans la couche basale de cellules souches, permet une balance entre l'auto-renouvellement et la différenciation en kératinocytes (Koch and Radtke, 2010).

Selon le contexte, Notch influence différemment l'homéostasie des différents tissus. Il peut alors se comporter comme un suppresseur de tumeur ou comme un oncogène.
Dans le système hématopoïétique où Notch contrôle le destin cellulaire des précurseurs lymphoïdes, l'activation anormale de la voie mène à un effet oncogénique.
En revanche, dans l'épiderme où Notch induit les étapes terminales de la différenciation, Notch activé semble être un suppresseur de tumeurs.

Ce contraste remarquable n'est que l'amplification pathologique des rôles variés de Notch selon les types et le contexte cellulaires.

2. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome CADASIL :

Le syndrome de CADASIL (Carebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) est une maladie vasculaire dégénérative à transmission autosomique dominante. Cette pathologie atteint en premier lieu les petits vaisseaux sanguins du cerveau, et plus particulièrement les cellules musculaires lisses de ces vaisseaux qui hyperprolifèrent et s'accumule dans l'intima, provoquant ainsi des perturbations de la circulation sanguine. Les personnes atteintes de ce syndrome présentent de multiples symptômes dont des accidents vasculaires cérébraux fréquents et des migraines.

L'importance de la signalisation Notch dans le système vasculaire fut démontrée par la découverte de mutations dans le gène codant pour le récepteur Notch3, mutations responsables de ce syndrome (Joutel et al., 1996).
La majorité de ces mutations touchent le domaine extracellulaire de Notch3. Plus particulièrement, elles résultent d'un gain ou d'une perte d'un résidu cystéine dans l'une des 34 répétitions EGF du domaine extracellulaire, ce qui modifie la structure tridimensionnelle de ce domaine extracellulaire du récepteur Notch3 exprimé à la surface des cellules musculaires lisses. Ces mutations n'affectent pas la localisation membranaire de Notch3, ni sa capacité à interagir avec ses ligands.
En revanche, on observe une accumulation du domaine extracellulaire de Notch3 à la surface des cellules musculaires lisses, domaine qui n'est pas lié au domaine intracellulaire et transmembranaire du récepteur auquel il est normalement associé, suggérant que l'élimination du domaine extracellulaire est défectueuse (Joutel et al., 2000). Ces domaines extracellulaires mutés semblent former des agrégats entre eux mais également avec les domaines extracellulaires de Notch3 sauvages (Gridley, 2010).

Les mécanismes par lesquels cette accumulation engendre une dégénérescence vasculaire restent inconnus, même si quelques hypothèses sont avancées :

- la présence en trop grande quantité de Notch3 à la surface des cellules pourrait empêcher une signalisation efficace

- l'accumulation du domaine extracellulaire de Notch3 pourrait avoir un effet dominant négatif sur la signalisation Notch3
- cette accumulation pourrait avoir un effet toxique sur les cellules concernées

Les nombreuses études, utilisant notamment des souris transgéniques exprimant la forme mutante de Notch3 dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Ruchoux et al., 2003), concluent des résultats contradictoires et ne parviennent toujours pas à déterminer si les mutations CADASIL de Notch3 mènent à une perte de fonction du récepteur ou, au contraire, à l'acquisition de nouvelles fonctions (Gridley, 2010).

3. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le syndrome d'Alagille :

Le syndrome d'Alagille est une maladie autosomale dominante caractérisée par des anomalies dans le développement du foie, du cœur, des yeux et du squelette.

Des mutations dans le gène codant pour le ligand Jagged1 ont été recensées dans plus de 70% des patients atteints de ce syndrome (Spinner et al., 2001). La majorité d'entre elles sont des mutations non-sens enraînant l'apparition de codons STOP.

De façon intéressante, le syndrome d'Alagille présente une expressivité variable, puisque des patients d'une même famille, porteurs de la même mutation, ne présentent pas les mêmes atteintes (Emerick et al., 1999). Cela suggère donc que le phénotype observé dépend de facteurs génétiques multiples ou environnementaux.

Si le syndrome est bien décrit, le rôle de Jagged1 et les mécanismes menant au développement de la maladie sont encore inconnus.

La voie de signalisation Notch joue donc un rôle important dans diverses pathologies, en particulier dans les cancers dont je n'ai donné ici que deux exemples.

La diversité et l'antagonisme des rôles normaux de la voie Notch dans les différents tissus rend difficile l'appréhension des mécanismes par lesquels les altérations de cette voie de signalisation développent ces pathologies, c'est pourquoi les connaissances quant à leur physiopathologie sont souvent peu précises.

4

RELATION STRUCTURE – FONCTION DES RECEPTEURS ET LIGANDS DE LA VOIE NOTCH

I. Le récepteur Notch chez les mammifères

1. **Synthèse, maturation et adressage à la membrane du récepteur Notch**
2. **Structure et fonctions de la région extracellulaire du récepteur**
3. **Structure et fonctions de la région intracellulaire du récepteur**
4. **Glycosylation du récepteur Notch**

II. Les ligands DSL chez les mammifères

1. **Structure et fonctions de la région extracellulaire des ligands**
2. **Structure et fonctions de la région intracellulaire des ligands**
3. **Glycosylation des ligands**

RELATION STRUCTURE – FONCTION DES RECEPTEURS ET LIGANDS DE LA VOIE NOTCH

I. Le récepteur Notch chez les mammifères :

Les mammifères possèdent quatre orthologues du gène *notch* de drosophile, codant chacun pour une protéine différente : Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4. Ces quatre protéines transmembranaires de type I ont une relation structure/fonction très semblable à celle du récepteur Notch de drosophile.

1. Synthèse, maturation et adressage à la membrane du récepteur Notch :

Les récepteurs Notch sont synthétisés sous la forme d'une protéine précurseur de 300 à 350 kDa. Au cours de leur transit vers la membrane plasmique, ces précurseurs sont clivés par une convertase de la famille des furines. Ce clivage se produit dans le domaine extracellulaire juxtamembranaire - 70 acides aminés en amont du domaine transmembranaire - au niveau du site S1 caractérisé par la séquence RQRR (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Chez les mammifères, cette protéolyse est nécessaire pour l'expression à la membrane d'un récepteur actif à la surface des cellules (Logeat et al., 1998), ce qui ne semble pas être le cas chez la drosophile (Kidd and Lieber, 2002).

Les deux fragments protéiques résultant du clivage furine restent associés, conduisant à la formation d'un récepteur Notch hétérodimérique qui sera finalement exprimé à la membrane plasmique des cellules, avec :

- un domaine extracellulaire (NECD, Notch ExtraCellular Domain)
- un domaine intracellulaire ancré à la membrane (NTMIC, Notch TransMembrane and IntraCellular Domain)

Ces deux fragments s'associent au niveau d'un domaine d'hétérodimérisation constitué de la région C-Terminale du domaine NECD et de la région N-Terminale du domaine NTMIC (Gordon et al., 2007). Cette association non covalente entre les deux fragments dépend d'un ion calcium, ce qui explique qu'un traitement avec un chélateur de cations divalent (comme l'EDTA) dissocie l'hétérodimère Notch (Rand et al., 2000).

2. Structure et fonctions de la région extracellulaire du récepteur :

Cette région, très conservée au cours de l'Evolution, possède un nombre variable - entre 29 et 36 - de répétitions de type EGF, ainsi que trois domaines LNR (Lin-12 Notch Region).

Les répétitions de type EGF sont généralement connues pour intervenir dans les interactions entre protéines. C'est également le cas pour le récepteur Notch. On sait par exemple que les répétitions EGF 11 et 12 du récepteur Notch de drosophile sont nécessaires et suffisantes pour l'interaction avec ses ligands Delta et Serrate (Rebay et al., 1991).
Le rôle des autres répétitions EGF est moins défini. Elles sont toutefois la cible de modifications post-traductionnelles de glycosylation - catalysées par des glycosyltransférases de la famille Fringe - dont l'activation du récepteur Notch par ses ligands semble dépendre.

Les domaines LNR ne sont trouvés qu'au sein de la famille des récepteurs Notch. Les trois répétitions LNR forment, avec l'extrêmité N-Terminale du domain NTMIC, la région d'hétérodimérisation du récepteur Notch (Gordon et al., 2007).
Par ailleurs, ils régulent négativement l'activation du récepteur Notch car ils adoptent une conformation dite « en sandwich » qui masque le site S2 de coupure par les métalloproteases de la famille ADAM (Gordon et al., 2007). C'est pourquoi des mutations de ces domaines LNR se comportent comme des gains de fonction *notch* en produisant un récepteur constitutivement actif (Greenwald, 1994).

3. Structure et fonctions de la région intracellulaire du récepteur :

La région intracellulaire des récepteurs est composée d'environ 1000 acides aminés et contient plusieurs domaines conservés : un domaine RAM (RBP-Jk Associated Molecule), des répétitions ankyrines, des séquences de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequence), et un domaine PEST riche en résidus Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T).

Le domaine RAM, juxtamembranaire, participe à l'interaction entre Notch et son co-facteur de transcription CSL (CBF1, Supressor of Hairless, Lag1) (Honjo, 1996; Tamura et al., 1995).
C'est également le cas des six répétitions ankyrines (Kato et al., 1997), qui sont nécessaires à la formation d'un complexe transcriptionnel actif et à l'expression des gènes cibles de Notch

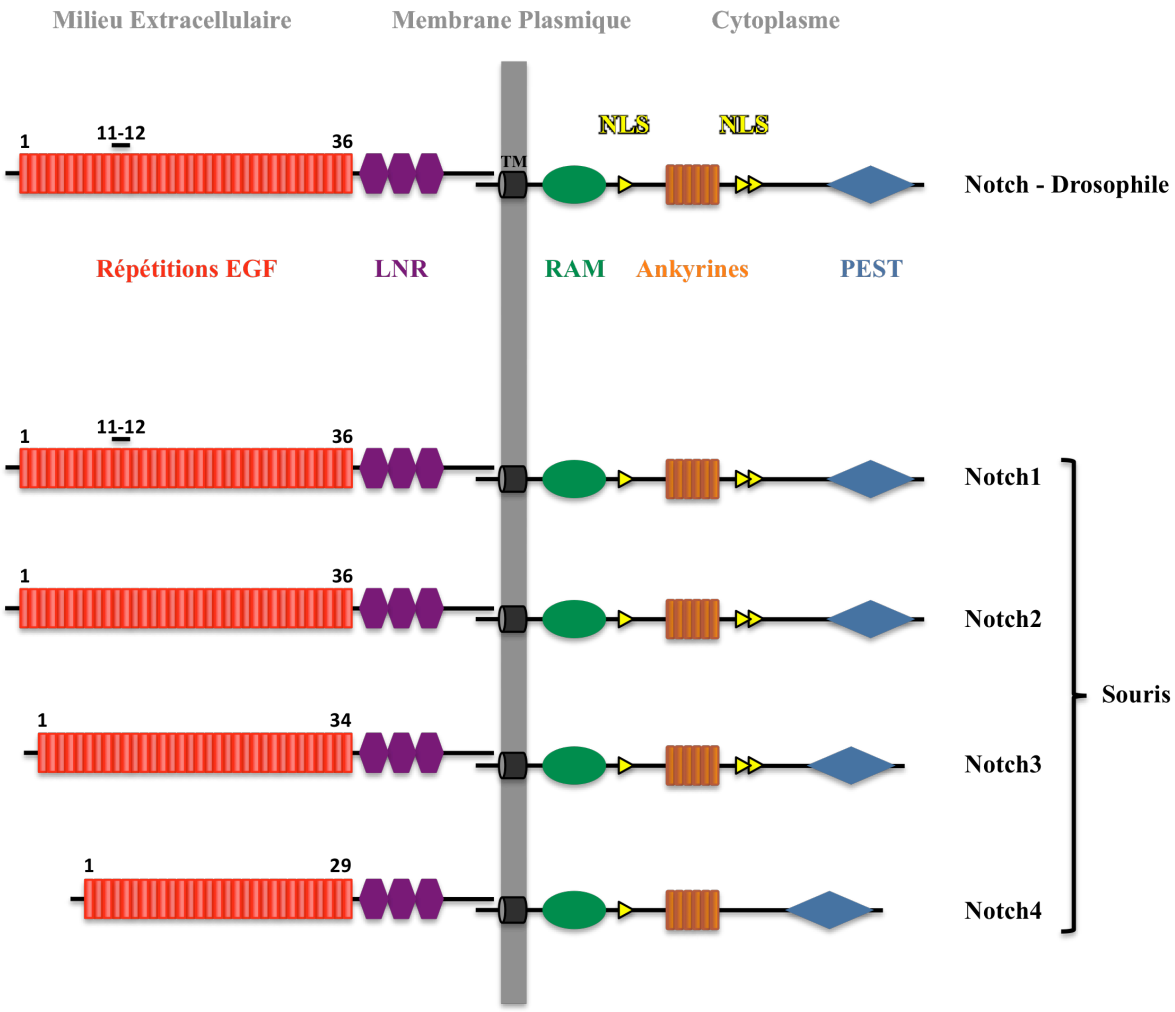


Figure 10 : Structure des récepteurs Notch chez la drosophile et les mammifères
EGF : Epidermal Growth Factor ; LNR : Lin-12 Notch Region ; RAM : RBP-Jk Associated Molecule ; PEST : Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T)

(Lieber et al., 1993), en recrutant, en plus de CSL, un autre co-facteur de transcription : Mastermind (MAM) (Wu et al., 2000).

Trois séquences de localisation nucléaires NLS, plus ou moins conservées dans les différents récepteurs Notch, entourent les six répétitions ankyrines (une en amont, deux en aval) et sont responsables du transport de la forme intracellulaire de Notch (NICD) dans le noyau (Honjo, 1996; Lieber et al., 1993).

La région intracellulaire de Notch possède aussi un domaine PEST (riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) à son extrêmité C-Terminale qui, comme le font généralement les motifs PEST, régule la dégradation de NICD via le protéasome. Effectivement, suite à la phosphorylation de trois sérines du domaine PEST par la kinase CycC/CDK8, NICD recrute et est polyubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase Sel10, ce qui induit finalement sa dégradation par le protéasome (Fryer et al., 2004; Gupta-Rossi et al., 2001; Wu et al., 2001).

La région intracellulaire de Notch est également impliquée dans l'interaction avec de nombreux autres régulateurs de la voie Notch, qui vont contrôler son trafic intracellulaire (Bray, 2006; Brou, 2009).

4. Glycosylation du récepteur Notch

Comme je le précisais un peu plus tôt, certaines des répétitions EGF de la région extracellulaire de Notch sont soumises à des modifications post-traductionnelles de glycosylation. Un modèle propose que certaines de ces répétitions sont sujettes à une première étape d'O-fucosylation effectuée par une fucosyl-transférase appelée Ofut1, ou PoFut1 (Vodovar and Schweisguth, 2008), suite à laquelle l'ajout de sucres supplémentaires peut se produire par O-glycosylations catalysées par une glycosyl-transférase de la famille Fringe (Haines and Irvine, 2003).

A priori, un grand nombre de récepteurs Notch différemment glycosylés peuvent ainsi êtré produits. De façon intéressante, la glycosylation par les enzymes de la famille Fringe modifie l'affinité du récepteur Notch pour ses ligands. Chez les mammifères, le récepteur Notch1 glycosylé est ainsi davantage activable par Delta1 et moins sensible à une activation par Jagged1 (Moloney et al., 2000).

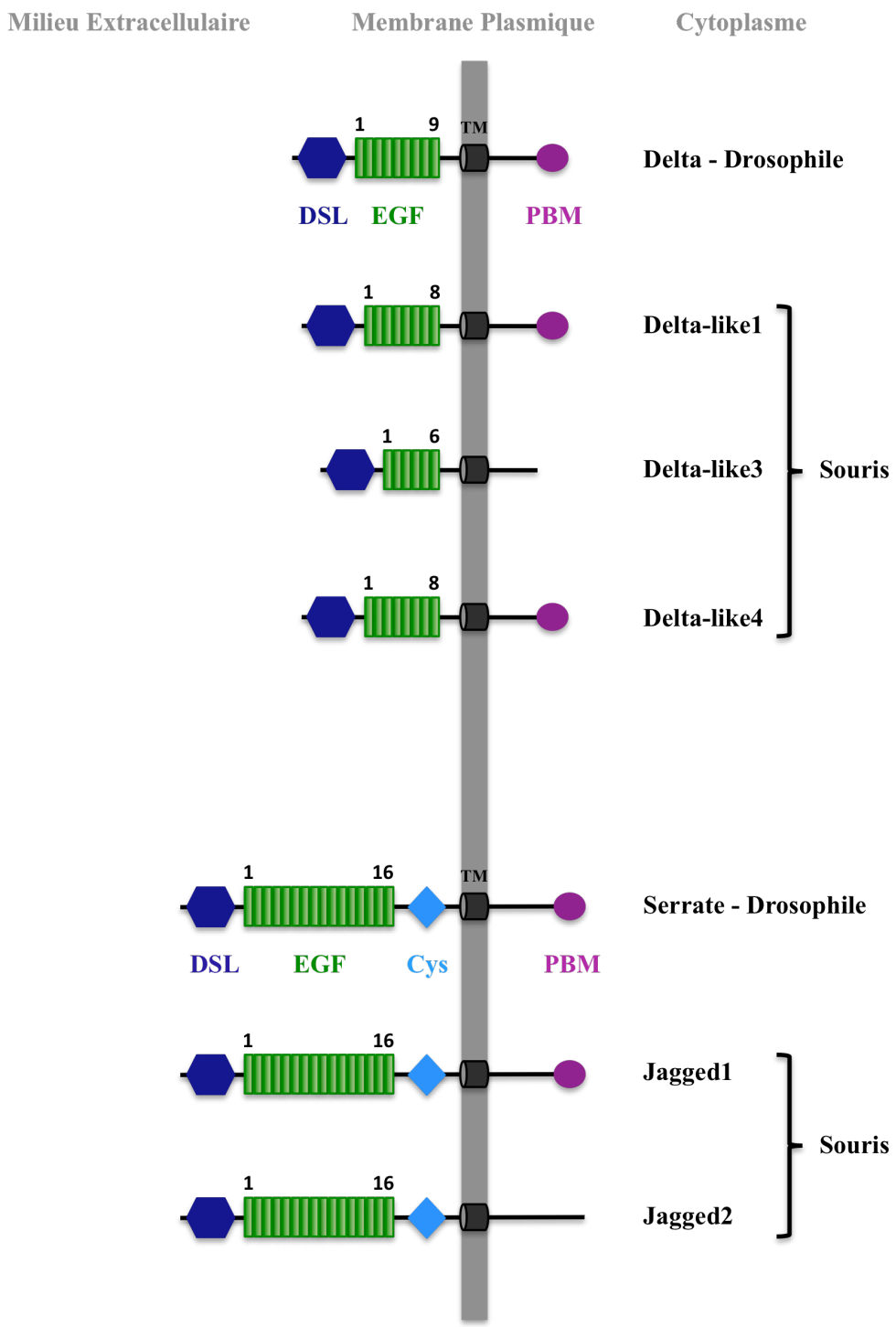


Figure 11 : Structure des ligands de Notch chez la drosophile et les mammifères
DSL : Delta, Serrate, Lag-2 ; EGF : Epidermal Growth Factor ; Cys : Cystéine ; PBM : PDZ Binding Motif

Une autre O-glycosyl-transférase a été identifiée chez la drosophile, il s'agit de Rumi qui agit sur les répétitions EGF et dont l'action sur Notch est nécessaire à son bon repliement et sa signalisation (Acar et al., 2008).

II. Les ligands DSL chez les mammifères :

Le ligand Delta possède trois homologues chez les mammifères : Delta-like1, Delta-like3 et Delta-like4 (Dll1, 3, 4), alors que le ligand Serrate en possède deux : Jagged1 et Jagged2. Ces cinq ligands DSL sont des protéines transmembranaires de type I, et sont les principaux ligands du récepteur Notch, bien qu'il existe d'autres ligands moins étudiés que je n'aborderai pas (D'souza et al., 2008).

1. Structure et fonctions de la région extracellulaire des ligands :

La région extracellulaire des ligands, très conservée, possède comme les récepteurs un nombre variable de répétitions EGF, mais elle se distingue par un domaine DSL caractéristique (Delta, Serrate, Lag-2).

Les répétitions EGF sont au nombre de 6 à 9 dans les ligands Dll, alors qu'elles sont presque deux fois plus nombreuses dans les ligands Jagged. Comme pour les récepteurs, elles peuvent être fucosylées avant d'être glycosylées par Fringe, ce qui pourrait moduler l'interaction des ligands avec les récepteurs Notch (D'souza et al., 2008).

Le domaine DSL, propre aux ligands de la voie Notch, est localisé dans la partie N-Terminale de la région extracellulaire, et est nécessaire à l'interaction avec les récepteurs (Tax et al., 1994).

Par ailleurs, même si son rôle reste inconnu, notons qu'une région riche en résidus cystéine située entre les répétitions EGF et le domaine transmembranaire se retrouve dans les ligands Serrate et Jagged (Lindsell et al., 1995).

2. Structure et fonctions de la région intracellulaire des ligands :

Contrairement à celle des récepteurs, la région intracellulaire des ligands est courte et ne présente pas de domaine particulièrement conservé.

On retrouve toutefois dans la plupart des ligands (Dll1, Dll4 et Jagged1) une extrêmité C-terminale se terminant par un résidu Valine qui, avec les trois acides aminés en amont, forme un motif PBM (PDZ Binding Motif) qui lie les domaines PDZ (PSD-95, Dlg1, ZO-1). Ce domaine PBM ne semble pas indispensable à l'activité des ligands sur le récepteur Notch. Il est cependant capable de recruter des protéines à domaines PDZ comme celles de la famille MAGUK (concernant Dll1) ou comme AF6 (concernant Jagged1) (Ascano et al., 2003; Six et al., 2004). Ces interactions confèrent ainsi aux ligands de la voie Notch des fonctions autonomes liées à la formation de complexes multiprotéiques capables de moduler la dynamique de la membrane plasmique (Six et al., 2004; Wright et al., 2004).

3. Glycosylation des ligands :

Tout comme les récepteurs, les ligands peuvent être O-fucosylés puis O-glycosylés sur certaines répétitions EGF de leur région extracellulaire, par action successive de la fucosyl-transférase Ofut1 puis de glycosyl-transférase de la famille Fringe (Panin et al., 2002), ce qui pourrait modifier leur capacité d'interaction avec le récepteur Notch.

5

ACTIVATION DU RECEPTEUR NOTCH ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

I. L'interaction ligand – récepteur

II. Premier clivage protéolytique par une métalloprotéase de la famille ADAM

III. Deuxième clivage protéolytique par le complexe γ-secrétase

IV. Activation transcriptionnelle par le domaine intracellulaire de Notch

1. **Les partenaires nucléaires de Notch : CSL et MAM**
2. **D'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription**
3. **Les gènes cibles de la voie Notch**
   a. **Les cibles directes de Notch**
   b. **Les cibles indirectes de la voie Notch**

V. Conclusion : de la diversité des effets de la voie Notch

ACTIVATION DU RECEPTEUR NOTCH ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

L'activation du récepteur transmembranaire Notch se produit lors de contacts intercellulaires par la liaison de ses ligands Delta et Jagged exprimés à la membrane plasmique des cellules adjacentes.
Cette association extracellulaire ne déclenche pas un mécanisme de transduction du signal classique, avec cascade de réactions enzymatiques et recrutement ou activation de protéines effectrices qui aboutissent à la régulation de l'expression des gènes cibles de la voie.
Non, Notch se comporte en récepteur original puisqu'il est lui-même effecteur de sa signalisation en modulant directement, dans le noyau, la transcription de ses gènes cibles.

Comment expliquer cette double localisation inattendue du récepteur (membranaire et nucléaire) ? L'idée de l'intervention de coupure(s) protéolytique(s) avancée dès le début des années 1990 (Lieber et al., 1993) était évidemment très controversée.
C'est pourtant cette hypothèse que les travaux de diverses équipes ont fini par confirmer, dessinant au fil du temps un modèle presque complet de la voie de signalisation Notch que je vais maintenant décrire.

I. L'interaction ligand – récepteur :

Nous avons vu précédemment que ligands et récepteurs interagissent respectivement par leur domaine DSL et les répétitions EGF (les répétitions 11 et 12 étant nécessaires et suffisantes à cette interaction).

Des modifications post-traductionnelles de fucosylation suivies de glycosylation (faisant intervenir les enzymes de la famille Fringe) régulent l'interaction ligand – récepteur. C'est le cas pour Notch1 glycosylé par Fringe qui est alors plus sensible à une activation par Dll1 et moins sensible à Jagged1 (Hicks et al., 2000).

II. Premier clivage protéolytique par une métalloprotéase de la famille ADAM :

L'interaction du récepteur Notch1 avec le ligand provoque un clivage protéolytique dans le domaine extracellulaire, 13 acides aminés en amont de la région transmembranaire, au niveau du site S2 caractérisé par la séquence AV (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000).

Chez les mammifères, ce clivage est catalysé par TACE/ADAM17 (Brou et al., 2000), une métalloprotéase de la famille ADAM (A Desintegrin And Metalloprotease domain) connue également pour son action sur d'autres protéines transmembranaires, comme le TNF-α, dont elle permet la libération du domaine extracellulaire dans le milieu extracellulaire (TACE pour TNF-alpha Converting Enzyme).
D'autres travaux montrent que c'est une autre métalloprotéase, ADAM10, qui clive le récepteur Notch chez les mammifères (van Tetering et al., 2009; Weber et al., 2011).
Chez les invertébrés, c'est cette même métalloprotéase Kuzbanian/ADAM10 qui semble être impliquée dans ce clivage (Wu et al., 1997).

Dans les deux cas, les métalloprotéases sont constitutivement actives dans les cellules. Cette spécificité des métalloprotéases pour le récepteur activé par la liaison du ligand laisse penser que l'activation de Notch induit un changement conformationnel du récepteur qui libère le site de coupure S2 initialement masqué et permet le clivage protéolytique.

Dans le même esprit, un modèle d'activation de la voie Notch propose que la région extracellulaire des récepteurs, toujours liée au ligand, doit être être transendocytosée dans la cellule émettrice avec le ligand pour fournir une force mécanique suffisante au démasquage du site S2 et permettre le clivage par la métalloprotéase. Ce modèle est basé sur des observations *in vivo* et *ex-vivo* de co-internalisation du récepteur Notch avec Delta dans les cellules émettrices (Klueg and Muskavitch, 1999; Parks et al., 2000), cette transendocytose de Notch étant nécessaire à son activation (Nichols et al., 2007).

Il résulte de ce premier clivage protéolytique la libération de la quasi-totalité de la région extracellulaire de Notch dans le milieu extracellulaire, laissant à la surface de la cellule un récepteur Notch composé de 13 acides aminés extracellulaires, et de ses domaines transmembranaire et intracellulaire.

III. Deuxième clivage protéolytique par le complexe γ-secrétase :

L'utilisation d'une forme artificielle de Notch, délétée de la majorité de son domaine extracellulaire, nommée Notch-ΔE, et quasiment semblable au produit de coupure ADAM, a permis de mettre en évidence une coupure intramembranaire du récepteur Notch (Schroeter et al., 1998).
Ce deuxième clivage protéolytique se produit au niveau du résidu V1744 appelé site S3, au sein du domaine transmembranaire de Notch. D'ailleurs la mutation de cette valine 1744 en

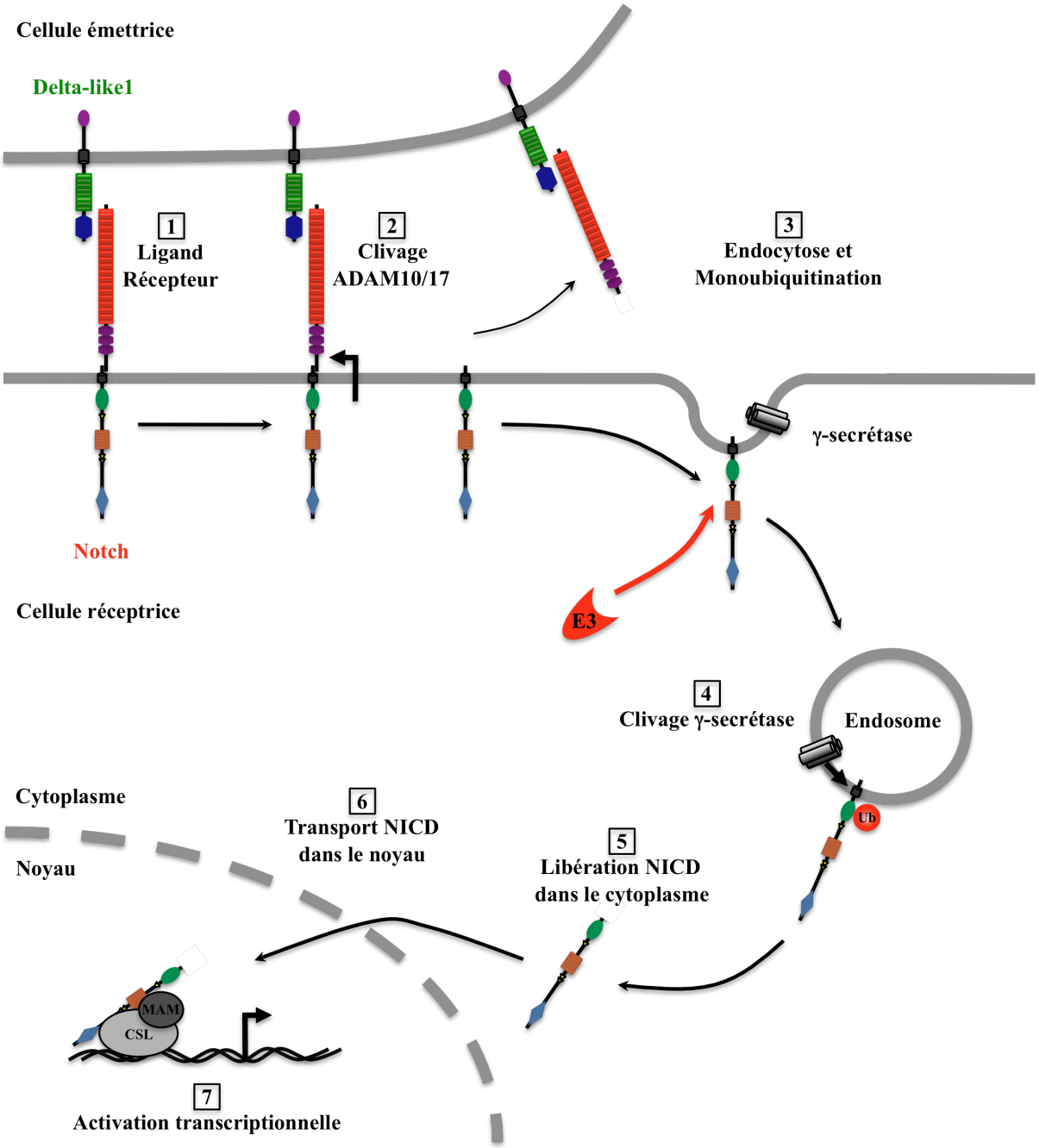


Figure 12 : La voie d'activation du récepteur Notch et la transduction du signal

résidu glycine abolit ce clivage protéolytique (Schroeter et al., 1998) et, lorsqu'elle est introduite dans le locus *notch* chez la souris, provoque une létalité embryonnaire similaire à celle obtenue chez les souris déficientes pour Notch (Huppert et al., 2000), montrant que ce clivage au site S3 est indispensable pour la voie de signalisation Notch.

La conséquence de cette coupure est la libération dans le cytoplasme de la forme NICD (Notch IntraCellular Domain) qui, rappelons-le, porte trois séquences NLS et va être transportée dans le noyau (Jarriault et al., 1995).

La démonstration de l'existence de cette coupure protéolytique, confirmée également *in vivo* chez la drosophile (Kidd et al., 1998; Lecourtois and Schweisguth, 1998), met fin à la controverse sur la localisation nucléaire de Notch en construisant un modèle de translocation du récepteur depuis la membrane jusqu'au noyau.

Parallèlement à ces observations, des cribles génétiques chez *C. elegans* identifient le gène *sel-12* comme régulateur positif de la voie Notch/Lin-12 (Baumeister et al., 1997; Levitan and Greenwald, 1995). Ces résultats sont confirmés chez des souris invalidées pour les deux gènes orthologues de *sel-12* chez les mammifères – *Préséniline1* et *Préséniline2* – souris qui présentent des signes caractéristiques d'une déficience Notch (Donoviel et al., 1999).

Les Présénilines 1 et 2 ont été initialement identifiées en raison de leurs mutations dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer.

Cette maladie est caractérisée par une neurodégénérescence associée à l'accumulation aberrante de peptides amyloïdes (Aβ) provenant de la protéolyse de la protéine transmembranaire de type I APP (β-Amyloid Precursor Protein). APP subit un premier clivage extracellulaire, puis un deuxième clivage intramembranaire catalysé par le complexe γ-secrétase qui va libérer les peptides (Aβ). Les perturbations de ces coupures sont responsables de l'accumulation pathogénique de peptides (Aβ) qui vont participer à la formation de plaques amyloïdes. Les Présenilines 1 et 2 (PS1 et PS2) sont impliquées dans le clivage intramembranaire d'APP par le complexe γ-secrétase (De Strooper et al., 1998).

Un parallèle évident entre le clivage protéolytique intramembranaire de Notch et celui d'APP a ainsi conduit à démontrer l'implication d'une activité γ-secrétase dépendante des présénilines dans le clivage de Notch activé (De Strooper et al., 1999).

Le complexe membranaire γ-secrétase contient quatre protéines majeures : Préseniline, Nicastrine , Aph1 et Pen2 (De Strooper, 2003).

Un peu plus récemment, notre laboratoire a montré que l'endocytose et la monoubiquitination du récepteur Notch activé constituent deux étapes requises pour son clivage par le complexe γ-secrétase et pour les étapes finales de la voie (Gupta-Rossi et al., 2004). Je reviendrai plus en détails sur ces aspects un peu plus tard.

IV. Activation transcriptionnelle par le domaine intracellulaire de Notch :

Après le clivage par le complexe γ-secrétase, la forme NICD est libérée dans le cytoplasme puis transportée dans le noyau où elle va former un complexe macromoléculaire avec des co-facteurs de transcription et finalement activer la transcription des gènes cibles de la voie Notch.

1. Les partenaires nucléaires de Notch : CSL et MAM :

NICD est capable d'interagir avec CSL, comme ce fut montré *in vitro* (Jarriault et al., 1995). Notch contient deux régions capables d'interagir avec la protéine CSL (CBF-1 chez les mammifères, Su(H) chez la drosophile et Lag-1 chez *C.elegans*) : son domaine RAM et ses répétitions ankyrines (Kato et al., 1997; Tamura et al., 1995). La protéine CSL est un facteur de transcription qui contient un domaine unique de liaison à l'ADN, caractérisé par la séquence YRTGDGAD (Lecourtois and Schweisguth, 1995; Tun et al., 1994). L'analyse de la structure du complexe CSL – ADN a permis de mettre en évidence trois domaines fonctionnels de CSL (Kovall and Hendrickson, 2004) :

- un domaine RHR-N (Rel-Homology Region N-terminal)
- un domaine RHR-C (Rel-Homology Region C-terminal), tous deux homologues aux domaines Rel de la famille des facteurs de transcription NF-κB, et séparés par
- un domaine BT (Beta-Trefoil)

Les domaines RHR-N et BT participent à l'interface CSL – ADN.

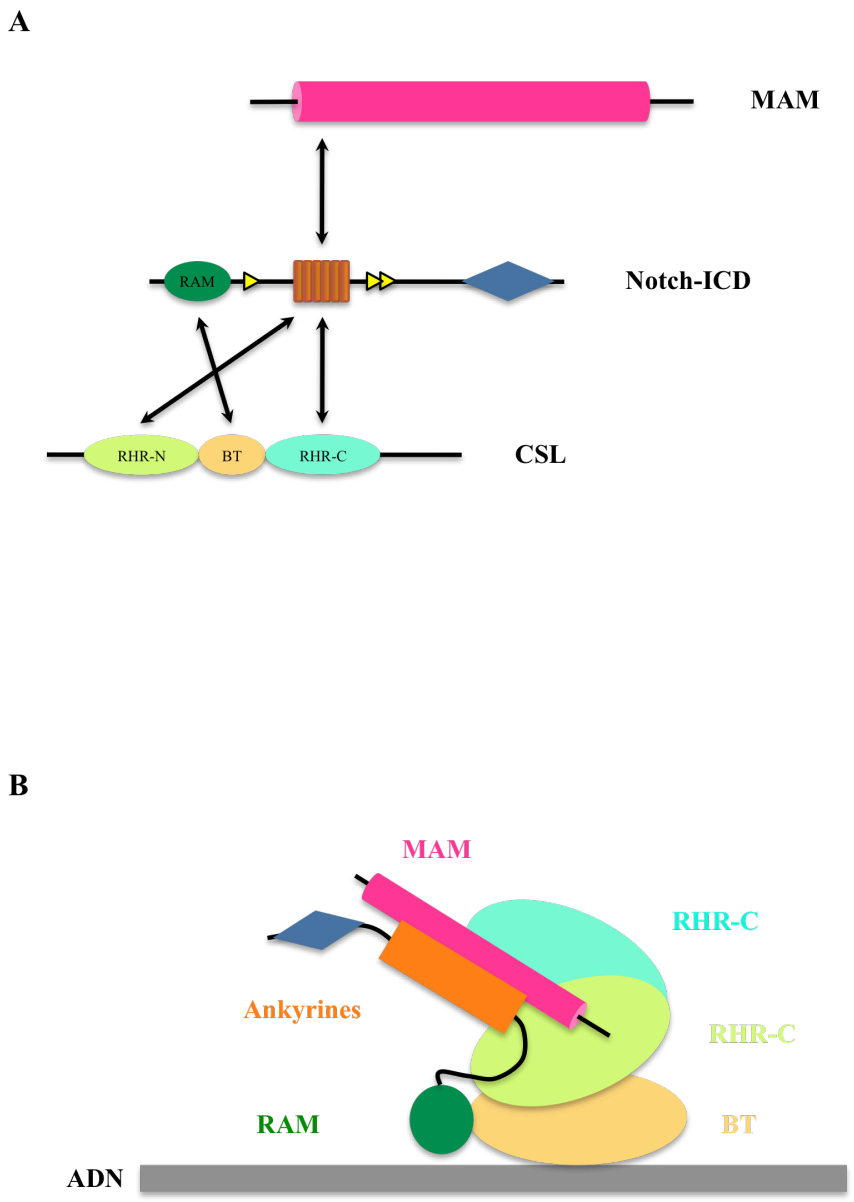


Figure 13 : Formation du complexe activateur de la transcription CSL / NICD / MAM :
A : Représentation des intéractions protéine-protéine entre NICD et ses deux partenaires nucléaires, CSL et MAM
B : Représentation schématique du complexe CSL / NICD / MAM lié à l'ADN
MAM : Mastermind ; Notch-ICD : Notch IntraCellular Domain ; RAM : RBP-Jk Associated Molecule ; CSL : CBF1, Supressor of Hairless, Lag1 ; RHR-N : Rel-Homology Region N-terminal ; BT : Beta-Trefoil ; RHR-C : Rel-Homology Region C-terminal

NICD est également capable d'interagir directement avec la protéine Mastermind (MAM), initialement identifiée chez la drosophile pour son interaction génétique avec le locus *notch* (Smoller et al., 1990; Xu et al., 1990). L'interaction se produit entre les répétitions ankyrines de NICD et les 70 acides aminés N-Terminaux de MAM (Fryer et al., 2002; Wu et al., 2000).

Des expériences *in vitro* ont identifié l'existence d'un complexe ternaire NICD/CSL/MAM lié à l'ADN, complexe qui semble former l'unité fonctionnelle minimale nécessaire à l'activation transcriptionnelle de Notch (Fryer et al., 2002).

Les données actuelles de cristallographie sur la structure de ce complexe montrent que le domaine RAM de NICD interagit avec le domaine BT de CSL, tandis que les répétitions ankyrines de NICD sont directement en contact avec les domaines RHR-N et RHR-C. C'est dans un canal créé au niveau de l'interaction ankyrines – CSL que se fixent les 100 acides aminés N-Terminaux de MAM, repliés dans une conformation hélicoïdale (Nam et al., 2006; Wilson and Kovall, 2006). De façon intéressante, la conformation de CSL, qui interagit seule avec l'ADN, n'est pas modifiée dans le complexe ternaire par son interaction avec Notch et Mastermind.

2. D'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription :

En absence de signalisation Notch, la protéine CSL se comporte comme un répresseur transcriptionnel via son association à différents co-répresseurs de transcription (Dou et al., 1994; Hsieh and Hayward, 1995). CSL recrute effectivement deux histones déacétylases (HDAC1 et HDAC2), par l'intermédiaire des protéines SMRT (Silencing Mediator of Retinoid ans Thyroid hormone receptors) et CIR (CBF1 Interacting Corepressor) (Hsieh et al., 1999; Kao et al., 1998). Les histone déacétylases recrutées à l'ADN participent à la fermeture de la chromatine, et par conséquent répriment la transcription des gènes situés à proximité.

Lorsque Notch est activé, NICD est transporté dans le noyau où il se lie à CSL et MAM. Une compétition est d'ailleurs décrite entre NICD et SMRT pour l'interaction avec CSL (Kao et al., 1998).

Ces trois protéines forment déjà un complexe actif qui entraîne le basculement d'une répression vers une activation transcriptionnelle.

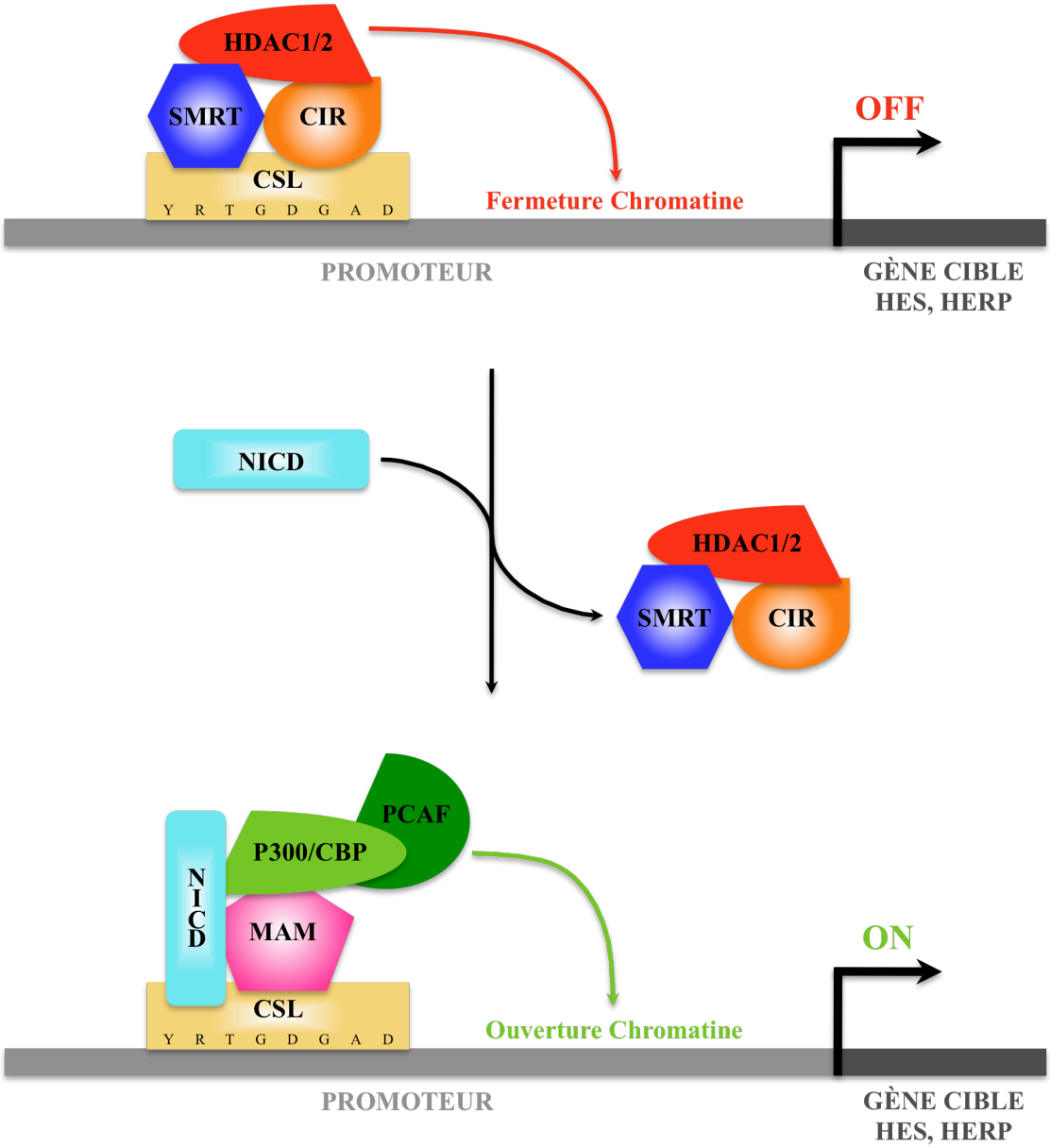


Figure 14 : NICD et le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription des gènes cibles de la voie Notch
CSL : CBF1, Supressor of Hairless, Lag1 ; SMRT : Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors ; CIR : CBF1 Interacting Corepressor ; HDAC1/2 : Histone Deacetylases 1/2 ; MAM : Mastermind ; NICD : Notch IntraCellular Domain ; p300/CBP : p300/CREB-Binding Protein ; PCAF : p300/CBP Associated Factor

De plus, ce complexe ternaire va recruter d'autres protéines nucléaires connues pour leur rôle général dans l'activation transcriptionnelle, telles que les histone acétyl transférases (HAT) p300/CBP (CREB-Binding Protein) et PCAF (P300/CBP Associated Factor). Ces deux protéines ouvrent la chromatine, acétylent les histones H3 et H4, favorisant ainsi davantage la transcription des gènes cibles de la voie Notch (Fryer et al., 2002; Wallberg et al., 2002).

Deux modèles existent pour expliquer ce passage d'un état de répression de la transcription à une activation transcriptionnelle induite par NICD.

Le modèle classique part du principe que CSL est constitutivement et statiquement lié à l'ADN. En absence de Notch, il recrute ses co-répresseurs et la transcription est inhibée. Lorsque Notch est activé, NICD est transporté dans le noyau où il y a un échange sur CSL entre les co-répresseurs et NICD. Puis le recrutement de MAM par NICD forme un complexe activateur de la transcription.

Le modèle dynamique propose :

- qu'il existe un équilibre entre la quantité de CSL liée à l'ADN et celle libre dans le nucléoplasme
- que les complexes activateurs CSL / NICD / MAM peuvent se former dans le nucléoplasme tout comme les complexes répresseurs CSL/CoRépresseurs
- qu'il y a un échange au niveau de l'ADN entre des complexes répresseurs et des complexes activateurs préformés

Des études récentes montrant que CSL a davantage d'affinité et se lie plus fortement à l'ADN en présence de NICD soutiennent ce modèle dynamique (Friedmann and Kovall, 2010; Krejci and Bray, 2007).

3. Les gènes cibles de la voie Notch :

Le complexe ternaire CSL / NICD / MAM active la transcription d'un certain nombre de gènes, cibles directes. La plupart de ces cibles directes sont impliquées dans la répression de la transcription de nombreux autres gènes, cibles indirectes, dont l'expression est régulée par Notch via ses cibles directes.

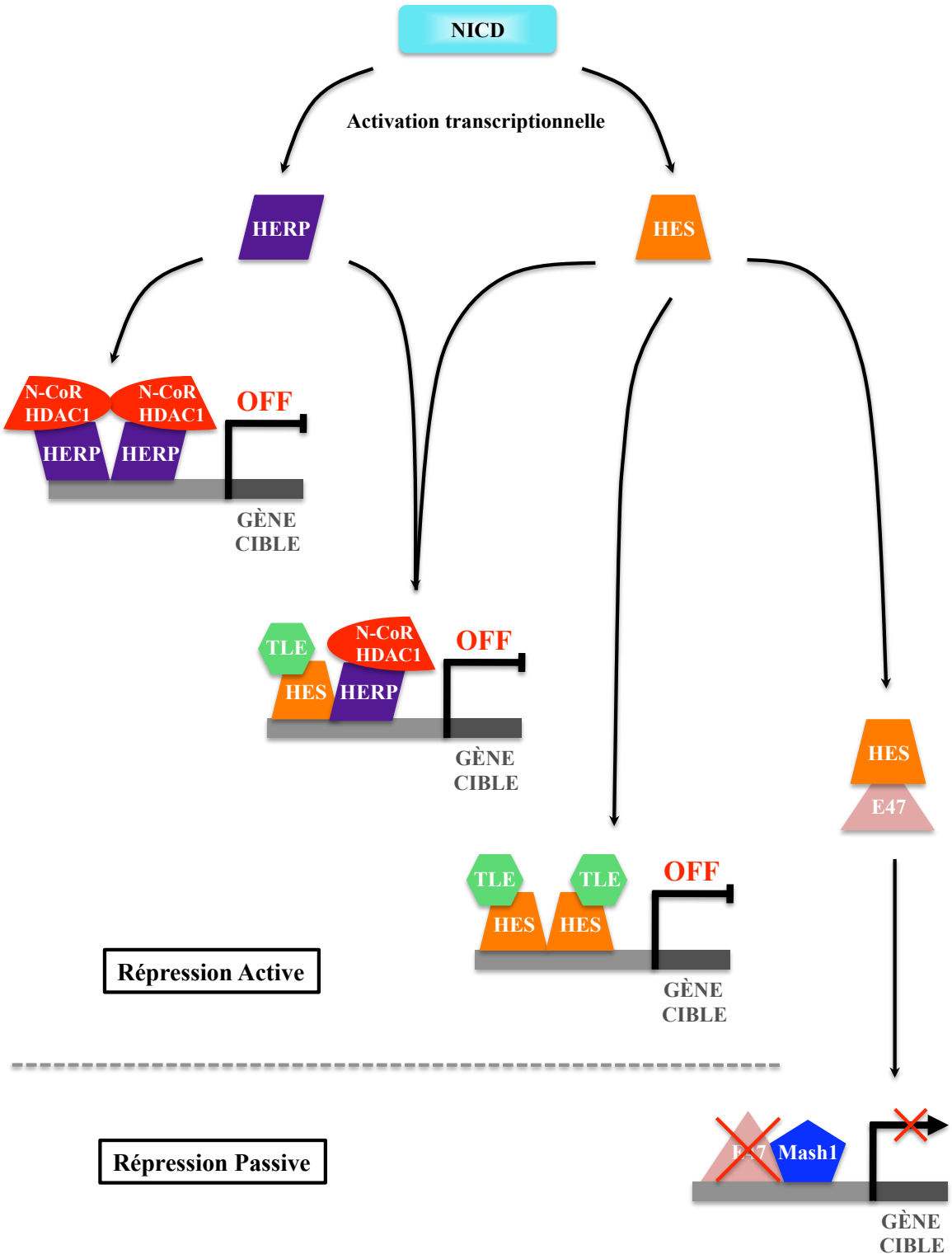


Figure 15 : Les différents modes de répression de la transcription des cibles indirectes de Notch par les cibles directes des familles HES et HERP :
HES et HERP forment des homodimères ou des hétérodimères entre eux, réprimant ainsi activement la transcription de leurs gènes cibles via le recrutement de co-répresseurs. HES agit aussi passivement en séquestrant l'activateur transcriptionnel E47.

a. Les cibles directes de Notch :

Le complexe CSL / NICD /MAM active la transcription des gènes appartenant aux familles HES et HERP (Hairy/Enhancer of Split et HES-Related Repressor), tous étant des répresseurs transcriptionnels qui possèdent un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix).
Parmi les sept gènes de la famille HES, trois sont directement régulés par Notch (HES1, HES5, HES7), tout comme trois gènes de la famille HERP (HERP1, HERP2, HERP3) (Fischer and Gessler, 2007; Jarriault et al., 1995; Maier and Gessler, 2000).

Les gènes HES codent pour des protéines capables de former des homodimères et de se lier aux séquences d'ADN de type N-box.
Les protéines HES répriment activement la transcription d'autres facteurs de transcription, notamment en recrutant le co-répresseur TLE (Transducin-Like Enhancer of split, orthologue de la protéine Groucho de drosophile) (Fisher et al., 1996).
Elles peuvent également inhiber passivement la transcription en séquestrant des protéines impliquées dans l'activation transcriptionnelle. C'est ainsi que HES1 interagit avec E47, empêchant la formation de l'hétérodimère activateur de la transcription E47/Mash-1 (Sasai et al., 1992).

Les protéines HERP forment des homodimères, mais peuvent aussi s'associer en hétérodimères avec les protéines HES, avant de se lier aux séquences N-box.
Dans tous les cas, elles agissent via les deux mêmes types de mécanismes inhibiteurs de la transcription que les protéines HES. Elles recrutent toutefois des co-répresseurs différents : N-CoR et HDAC-1 (Iso et al., 2001).

Plusieurs autres gènes cibles de Notch1 ont été décrits et présentent des sites de liaison de CSL dans leur région promotrice.
C'est le cas de *myc* (Krejci et al., 2009; Palomero et al., 2006), Cyclin D1 (Joshi et al., 2009; Ronchini and Capobianco, 2001), CDC25 (Krejci et al., 2009; Palomero et al., 2006) ou encore CDK5 (Palomero et al., 2006) qui activent la prolifération cellulaire. D'autres cibles directes sont au contraire impliquées dans l'inhibition de la prolifération, comme *p21* (Rangarajan et al., 2001).

Notch1 est aussi impliqué dans la régulation directe de la transcription d'effecteurs ou de régulateurs de l'apoptose : caspase-3 (Okuyama et al., 2004) ou Bcl-2 (Deftos et al., 1998) bien que, dans ce dernier cas, la liaison de CSL à la région promotrice reste à prouver.

Notons également que plusieurs composants de la voie de signalisation Notch sont eux-mêmes des cibles directes de Notch. C'est le cas de Notch1 lui-même chez les mammifères, ou de Serrate, Kuzbanian/ADAM10 et Su(H) chez la drosophile (Bray and Bernard, 2010).

De plus, la plupart des cibles identifiées chez les mammifères sont celles du récepteur Notch1, sans que l'on puisse vraiment savoir si les autres récepteurs ont le même effet sur l'expression de ces gènes cibles ou non.

Au final, cette liste non exhaustive des cibles directes de Notch est révélatrice de la diversité de fonctions que la voie Notch régule dans les cellules. Aussi, elle pose déjà clairement le problème de l'appréhension précise de ces fonctions dont on imagine qu'elles sont très dépendantes du contexte cellulaire étudié.

b. Les cibles indirectes de Notch :

Des dérégulations de la voie Notch mènent à des perturbations dans de nombreux processus physiologiques. Ces effets pléïotropiques sont attribués en partie à la répression transcriptionnelle, active ou passive, de gènes cibles secondaires par les protéines HES et HERP (Fischer and Gessler, 2007).

Toutefois, peu de cibles indirectes ont été identifiées. HES 1 semble réprimer sa propre transcription (Takebayashi et al., 1994), ou encore celle du gène ASH1 - orthologue des gènes *achaete-scute* de drosophile - codant pour un facteur de transcription impliqué dans le développement du système nerveux (Chen et al., 1997). Il inhibe aussi directement la transcription des gènes codant pour les protéines CD4 impliquées dans le lignage des cellules T (Kim and Siu, 1998).

V. Conclusion : de la diversité des effets de la voie Notch :

Puisque les acteurs, les mécanismes et les cibles de la signalisation Notch sont si conservés au cours de l'évolution, comment expliquer que l'activation de Notch mène à

l'établissement de programmes génétiques si différents, conduisant ainsi à des effets cellulaires si variés ?

La réponse est peut-être que les conséquences de la signalisation Notch dépendent de tous ses régulateurs qui, selon leur expression et leur activité, sont susceptibles de moduler les réponses cellulaires de l'activation du récepteur Notch.

Sans oublier les éléments régulateurs des autres voies de signalisation pouvant interférer avec la voie Notch. Les connexions de la signalisation Notch avec d'autres signalisations intracellulaires existent à de nombreux niveaux.

C'est le cas par exemple pour la voie Wnt/Wingless, dont la connexion avec la voie Notch a été établie par une interaction observée entre Dishevelled et Notch (Axelrod et al., 1996). La voie Wnt exerce une régulation négative sur Notch, alors que Notch-ICD agit comme un activateur de la transcription de certains gènes cibles de la voie Wnt (Ross and Kadesch, 2001).

C'est le cas aussi pour la voie Ras/MAPK, notamment au cours de la différenciation de la vulve chez *C. elegans* où l'activation de Ras inhibe la signalisation Notch/Lin-12 (Shaye and Greenwald, 2002).

Selon le niveau d'expression des acteurs de ces voies de signalisation, et selon l'état d'activation de ces voies, l'on suppose aisément les conséquences sur la régulation de la signalisation intracellulaire de Notch.

Une autre explication est la distribution des différents récepteurs et des différents ligands dans les tissus qui laisse un nombre de combinaisons récepteur-ligand impressionnant (20 au total chez les mammifères). Dans le cas de tissus dont les cellules expriment plusieurs ligands et plusieurs récepteurs, les effets d'une activation de Notch sont d'autant plus difficiles à prévoir.

De plus, cette distribution des ligands et récepteurs est parfois régulée de façon spatio-temporelle. Au sein d'un même tissu, cela limite ainsi souvent l'activation d'un type de récepteur par un type de ligand à un contexte bien précis.

Enfin, les gènes cibles, identifiés souvent grâce à l'étude de pathologies, ne sont pas ciblés par tous les récepteurs Notch (en tout cas les connaissances actuelles ne permettent pas de l'affirmer). Et, pour un même récepteur, certaines cibles ne sont effectivement régulées

que dans certains types de cellules ou de tissus, ce qui dépend certainement de régulations intracellulaires complexes de l'expression de ces gènes.

L'ensemble de ces éléments montre à quel point le contexte cellulaire est capital dans la détermination des effets que la voie de signalisation Notch peut engendrer, contexte dépendant des signaux extrinsèques et intrinsèques présents au moment de l'activation de la voie Notch.

Cela met aussi en évidence la difficulté de progresser dans la compréhension des mécanismes de la voie Notch selon le tissu, les cellules, le phénomène physiologique considéré où tous ces signaux régulateurs ne sont, *a priori*, pas connus.

6

UBIQUITINE, UBIQUITINATION ET DEUBIQUITINATION

I. L'ubiquitination

1. La molécule d'ubiquitine et les protéines *ubiquitin-like* :

2. L'ubiquitination

3. Les enzymes catalysant l'ubiquitination

a. La cascade enzymatique

b. Les différentes E3 ubiquitine ligases

Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT

Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING

Les E3 ubiquitine ligases de type SCF (Skp-1 / Cullin / F-box)

4. Les rôles de l'ubiquitination

a. La polyubiquitination K48 et la dégradation des protéines par le protéasome

b. L'ubiquitination et les interactions entre protéines

c. La monoubiquitination, la multiubiquitination et l'endocytose des protéines membranaires

d. L'ubiquitination et la régulation de la transcription ou de la réparation de l'ADN

II. La déubiquitination

1. Les différentes Déubiquitinases

a. Les Déubiquitinases de la classe des cystéine protéases

Mécanisme catalytique des DUBs cystéine protéases

Les Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs)

Les Ubiquitin Specific Proteases (USPs)

Les Machado-Joseph Disease Protein Domain Proteases (MJDs)

Les Ovarian Tumor Proteases (OTUs)

b. **Les Déubiquitinases de la classe des métalloprotéases**

Mécanisme catalytique des DUBs métalloprotéases

Les DUBs métalloprotéases : JAMM Protéases

2. **Les rôles de la Déubiquitination**

a. **La Déubiquitination et la dégradation des protéines par le protéasome**

b. **La Déubiquitination et le destin des protéines membranaires endocytosées**

c. **La Déubiquitination et la maturation de l'ubiquitine**

d. **La Déubiquitination et le recyclage de l'ubiquitine**

3. **La spécificité de la Déubiquitination**

III. Quelques exemples de voies de signalisation régulées par l'ubiquitination et la déubiquitination

1. **p53 est régulé par Mdm2, USP2a et HAUSP / USP7**
2. **cMyc est régulé par Sel-10 / Fbw7 et USP28**

UBIQUITINE, UBIQUITINATION ET DEUBIQUITINATION

I. L'ubiquitination :

1. La molécule d'ubiquitine et les protéines *ubiquitin-like* :

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine qui est, comme son nom l'indique, exprimée de façon ubiquitaire dans toutes les cellules de l'organisme.
Elle est constituée de 76 acides aminés, et sa séquence est extrêmement conservée chez les eucaryotes – il y a par exemple 96% d'identité entre la molécule d'ubiquitine humaine et celle de la levure. Elle possède notamment 1 Glycine C-terminale ainsi que 7 Lysines : K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63.

Il existe un certain nombre d'autres molécules très proches de l'ubiquitine, non pas de par leur séquence linéaire mais plutôt quant à leur structure tridimensionnelle et leur repliement ainsi que leur Glycine C-Terminale, qui sont appelées ULM (Ubiquitin-Like proteins Modifiers). C'est le cas de SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier), de NEDD8 (Neural precursor cell-expressed Developmentally Downregulated-8), ou encore d'ISG15 (Interferon-Stimulated Gene-15) qui peuvent être conjuguées de façon semblable à l'ubiquitine sur des protéines cibles et sur lesquelles, sauf exemples exceptionnels, je ne reviendrai pas (Welchman et al., 2005).

2. L'ubiquitination :

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines (Haglund and Dikic, 2005) qui consiste en la conjugaison d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine. L'ubiquitine se fixe de façon covalente à des protéines cibles par la formation d'une liaison isopeptidique entre la fonction carboxyle de sa Glycine C-Terminale et le groupe amine d'un résidu Lysine de sa protéine cible.

Notons qu'une ubiquitination est aussi possible sur des résidus Cystéine, au niveau de leur groupement thiol, par formation d'une liaison thiol-ester avec l'ubiquitine.
Par ailleurs, les résidus Cystéine de l'ubiquitine peuvent également être engagés, via leur groupe amine, dans les liaisons peptidiques entre les molécules d'ubiquitine au sein des chaînes linéaires d'ubiquitine. Je ne reviendrai pas non plus sur ces deux mécanismes.

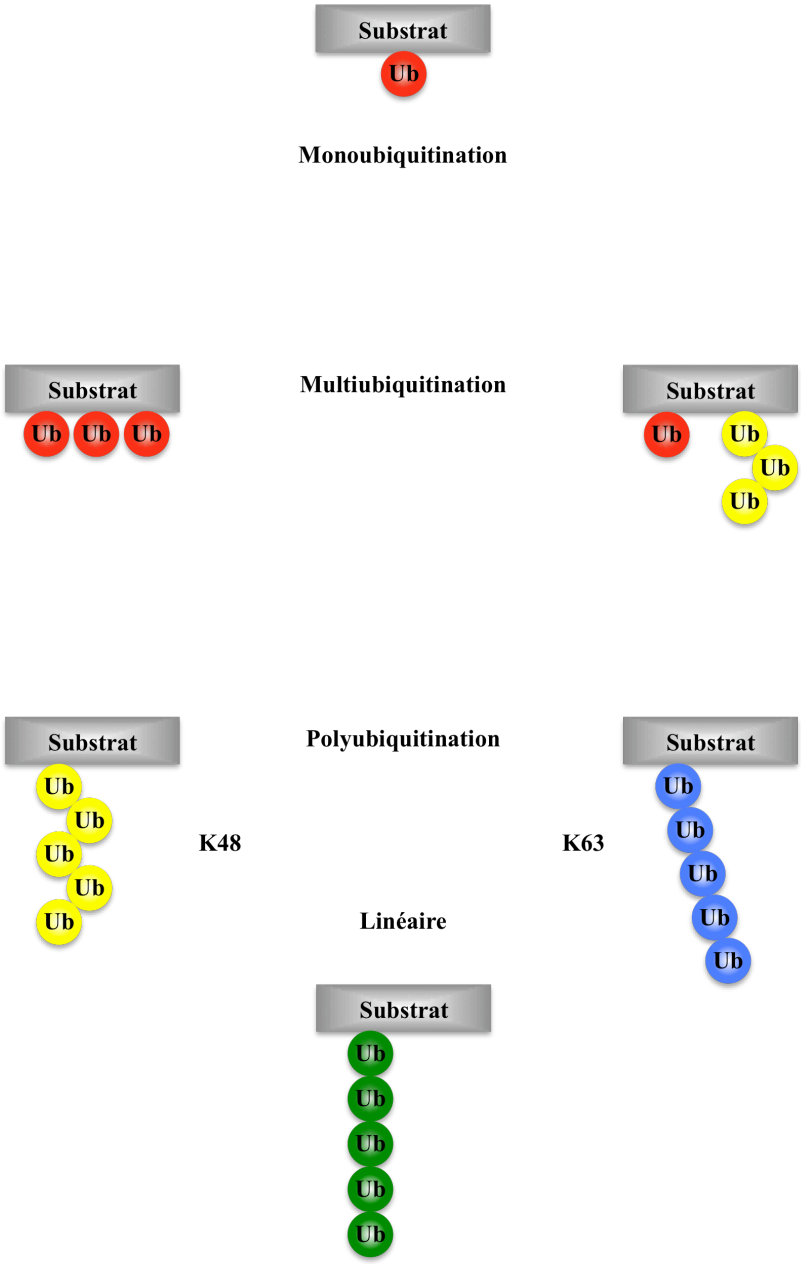


Figure 16 : Les différents types d'ubiquitinations
La liste des polyubiquitinations n'est pas exhaustive.

La réaction d'ubiquitination fait intervenir successivement trois familles d'enzymes sur lesquelles je reviendrai un peu plus en détail : les enzymes E1 dites d'activation, les enzymes E2 de conjugaison de l'ubiquitine et les E3 ubiquitine ligases.

Selon le nombre et la position des molécules d'ubiquitine transférées, la protéine cible peut être (Ciechanover et al., 2000; Hershko and Ciechanover, 1998) :

- monoubiquitinée, avec une seule ubiquitine liée à un unique résidu Lysine
- multiubiquitinée, avec plusieurs ubiquitines liées sur autant de résidus Lysine
- polyubiquitinée, avec une ou plusieurs chaînes d'ubiquitines liées sur une ou plusieurs Lysines

Dans le cas d'une polyubiquitination, en plus de la liaison isopeptidique entre la protéine cible et la première ubiquitine, s'ajoutent des liaisons isopeptidiques entre un résidu Lysine de l'ubiquitine déjà en place et la Glycine C-Terminale de l'ubiquitine suivante dans la chaîne. Lorsque les liaisons isopeptidiques entre les ubiquitines successives font intervenir leurs Lysines 48, par exemple, on parle alors de chaîne de polyubiquitine ou de polyubiquitination K48.

Si, théoriquement, les études de spectrométrie de masse effectuées chez la levure montrent que chacune des Lysines est susceptible d'être impliquée dans la formation de chaînes de polyubiquitine, ces mêmes études révèlent que l'abondance relative de ces différents types de chaînes est variable.

Cette variabilité de distribution semble conservée chez les eucaryotes supérieurs comme les mammifères où la polyubiquitination K48 est de loin la plus représentée, avec la polyubiquitination K63. Cette représentation est toutefois limitée puisque basée sur la liste des protéines polyubiquitinées qui ont été identifiées juqu'alors.

Par ailleurs, compte tenu de la distribution des différentes Lysines à la surface de l'ubiquitine, les différents types de chaînes ont une topologie très différente selon la Lysine de l'ubiquitine utilisée pour la conjugaison.

3. Les enzymes catalysant l'ubiquitination :

Comme je le précisais un peu plus tôt, le processus d'ubiquitination fait intervenir successivement trois familles d'enzymes :

- E1 ubiquitine activase (ubiquitin-activating)
- E2 ubiquitine conjugase (ubiquitin-conjugating)

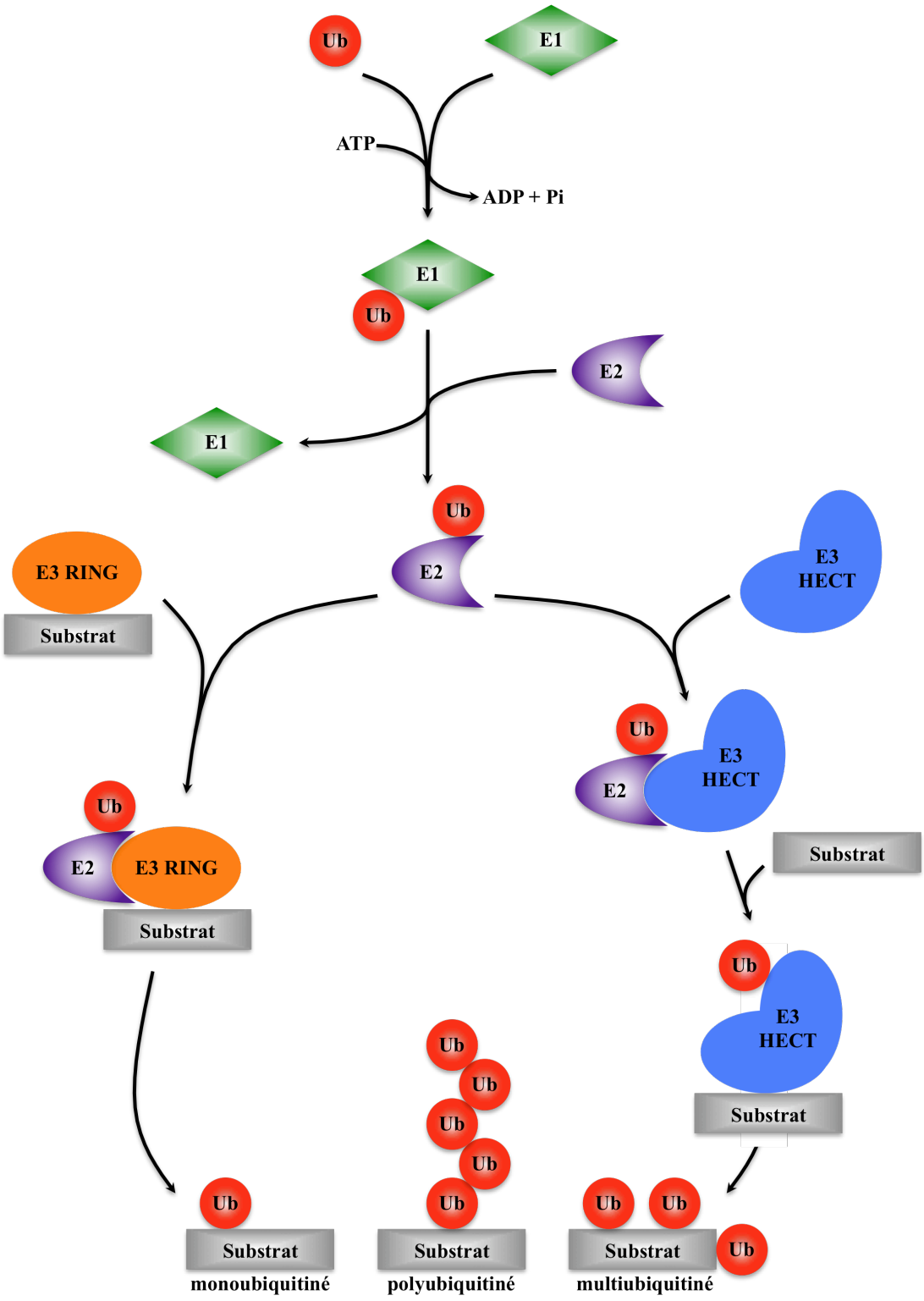


Figure 17 : Les étapes du processus d'ubiquitination avec les E3 ubiquitine ligases des familles RING et HECT

- E3 ubiquitine ligase

a. La cascade enzymatique :

La cascade enzymatique est initiée par la liaison de la molécule d'ubiquitine à une enzyme E1 ubiquitine activase. Cette réaction endothermique nécessite une molécule d'ATP pour former une liaison thioester à haute énergie entre la Glycine C-Terminale de l'ubiquitine et le groupement thiol (SH) d'un résidu Cystéine de l'E1 ubiquitine activase.

Il s'en suit alors le transfert de l'ubiquitine activée au niveau du groupement thiol de la Cystéine du site actif de l'enzyme E2 ubiquitine conjugase.

Finalement, cette E2 ubiquitine conjugase va s'associer à une E3 ubiquitine ligase qui recrute spécifiquement le substrat et permet le transfert de la molécule d'ubiquitine sur ce substrat.

Cette cascade peut se répéter afin de produire une chaîne d'ubiquitine sur la protéine cible (Hershko and Ciechanover, 1998).

b. Les différentes E3 ubiquitine ligases :

Si les deux premières étapes de la cascade sont semblables dans tous les processus d'ubiquitination, le mécanisme par lequel s'effectue le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat diffère selon le type d'E3 ubiquitine ligase mis en jeu.

Il existe en effet trois familles d'E3 ubiquitine ligases :

- les E3 de la famille HECT (Homologous to E6-AP Carboxy Terminus)
- les E3 de la famille RING (Really Interesting New Gene)
- les E3 de type SCF, constituées d'un complexe SCF (Skp-1 / Cullin / F-box)

Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT

Les E3 ubiquitine ligases de la famille HECT sont caractérisées par la présence d'un domaine HECT qui possède un résidu Cystéine très conservé et nécessaire à leur fonctionnement.

Effectivement, dans le cas des E3 à domaine HECT, l'appellation ubiquitine ligase est appropriée car elles jouent un rôle direct dans la conjugaison de l'ubiquitine au substrat. L'E3 est recrutée à l'enzyme E2 et l'ubiquitine activée est transférée de l'E2 ubiquitine conjugase

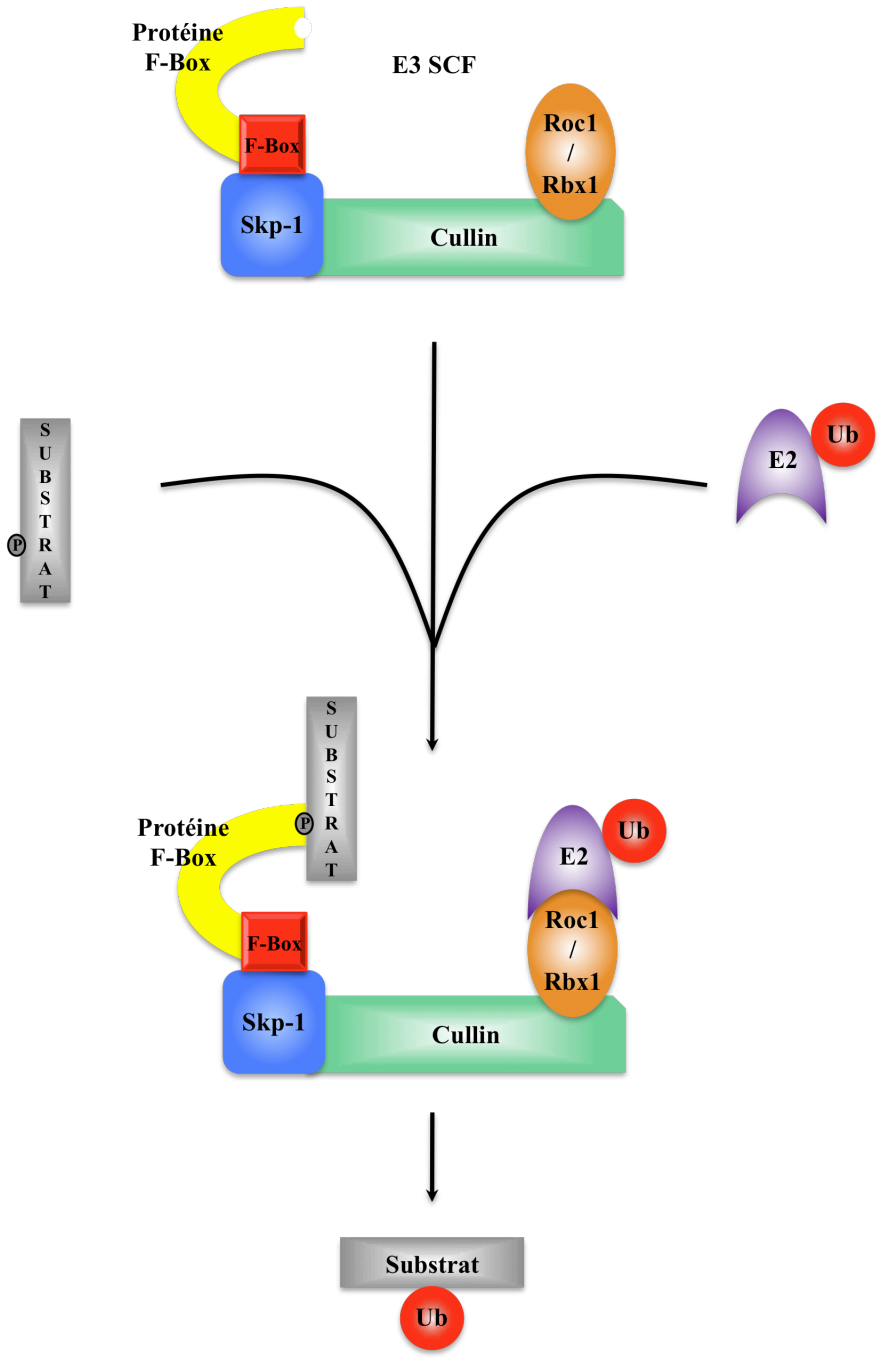


Figure 18 : Processus d'ubiquitination par les E3 ubiquitine ligases SCF (Skp-1/Cullin/Fbox) Les E3 ubiquitine ligases SCF sont constituées d'une protéine à domaine Cullin qui interagit avec Roc1/Rbx1, une protéine à domaine RING, et avec une protéine F-box par l'intermédiaire de Skp-1. Roc1/Rbx1 recrute l'E2 ubiquitine conjugase, alors que la protéine F-box recrute le substrat phosphorylé, ce qui aboutit à l'ubiquitination du substrat.

sur le résidu cystéine de l'E3 auquel elle est fixée de façon covalente. Puis cette ubiquitine est conjuguée au substrat qui a également été recruté par l'E3 ubiquitine ligase (Rotin and Kumar, 2009). D'ailleurs, la mutation du résidu cystéine du site actif du domaine HECT abolit totalement l'activité ubiquitine ligase des enzymes E3 (Weissman, 2001).

Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING

Les E3 ubiquitine ligases de la famille RING sont caractérisées par la présence de huit résidus conservés – cystéines et histidines – qui sont arrangés de manière à constituer deux sites de coordination d'un atome de zinc et qui forment un domaine appelé RING-H2 ou RING-HC (Deshaies and Joazeiro, 2009; Joazeiro and Weissman, 2000).

L'appellation ubiquitine ligase semble impropre aux E3 ubiquitine ligases à domaine RING qui, en l'état actuel des connaissances, ne sont pas capables de fixer l'ubiquitine et de la transférer sur la protéine cible. Elles sont plutôt des molécules d'échafaudage, mais pas de véritables enzymes puisque, en effet, ces E3 ubiquitine ligases servent de molécules adaptatrices entre l'E2 et le substrat et facilitent le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible.

Le rôle du domaine RING dans ce transfert reste non complètement identifié, mais il semble indispensable puisque la mutation de ces résidus Cystéine abolit l'ubiquitination des substrats. Un modèle propose que le motif "RING finger" qui les caractérise forme des boucles, stabilisées par la coordination de Zinc, et permet le recrutement des E2 ubiquitine conjugases, favorisant ainsi le transfert de l'ubiquitine sur le substrat avec lequel les E3 interagissent via d'autres domaines (Deshaies and Joazeiro, 2009).

Les E3 ubiquitine ligases de type SCF (Skp-1 / Cullin / F-box)

Les E3 ubiquitine ligases de type SCF (Skp-1 / Cullin / F-box) sont beaucoup moins représentées. Elles sont composées :

- d'une protéine à domaine RING qui interagit avec l'E2 ubiquitine conjugase et permet le transfert de l'ubiquitine sur le substrat
- d'une autre protéine à boîte F (de type F-box) qui est impliquée dans la reconnaissance du subtrat
- d'une protéine de type Cullin qui interagit avec la protéine à RING finger et avec la protéine F-box (dans ce dernier cas, parfois via des protéines adaptatrices)

La protéine à domaine RING fonctionne comme je viens de le décrire, sauf qu'elle ne recrute pas le substrat, puisque celui-ci est reconnu par la protéine F-box. Le complexe SCF permet finalement le transfert de l'ubiquitine de l'E2 ubiquitine conjugase sur la protéine cible (Hotton and Callis, 2008).

4. Les rôles de l'ubiquitination :

S'il n'y a pas de règles générales associant un type d'ubiquitination à un effet cellulaire bien précis, il existe toutefois des tendances qui, malgré des exceptions, semblent se vérifier le plus fréquemment.

a. La polyubiquitination K48 et la dégradation des protéines par le protéasome :

L'ubiquitination, et plus précisément la polyubiquitination en chaîne K48, a d'abord été identifiée comme un signal induisant la dégradation des protéines cytoplasmiques polyubiquitinées par le protéasome 26S (Ciechanover, 1994). Les chaînes d'ubiquitine – au moins quatre molécules d'ubiquitine sont nécessaires – sont reconnues par le protéasome.

Cependant, les travaux plus récents ont permis de montrer que l'ubiquitination a bien d'autres fonctions dans les cellules.

b. L'ubiquitination et les interactions entre protéines :

L'ubiquitination d'une protéine permet parfois de recruter des partenaires d'interaction, partenaires qui possèdent parfois des domaines de liaisons à l'ubiquitine appelés *Ubiquitin Binding Domains* (UBD) dont font partie les *Ubiquitin Interacting Motifs* (UIM) ou encore les *Ubiquitin Associated Domains* (UBA) (Hurley et al., 2006).

Un exemple de ces interactions dépendantes de l'ubiquitination se retrouve dans la voie de signalisation NF-κB activée par exemple lors de l'activation du récepteur au TNF, le TNFR. La liaison du TNF sur son récepteur entraîne une trimérisation du TNFR, et le recrutement d'une protéine adaptatrice TRADD.

Celle-ci recrute alors de façon simultanée une E3 ubiquitine ligase de la famille RING appelée TRAF2 (ou TRAF5) ainsi qu'une protéine Kinase nommée RIP1 qui est alors polyubiquitinée par TRAF2/5 avec des chaînes K63.

De façon intéressante, cette polyubiquitination permet de recruter deux autres protéines :

- une kinase TAK1, qui est alors activée
- le complexe IKK (I*k*B Kinase), via l'UBD de la sous-unité régulatrice du complexe, NEMO

Ces recrutements dépendants de l'ubiquitine sont cruciaux pour la suite de l'activation de NF-κB. Il en résulte effectivement une phosphorylation et une activation par TAK1 du complexe IKK qui va alors phosphoryler IκBα, la sous-unité inhibitrice de NF-κB, qui est par la suite polyubiquitinée en chaînes K48 par l'E3 ubiquitine ligase SCF β-TrCP et dégradée par le protéasome.

Cela libère ainsi les dimères NF-κB qui sont transloqués dans le noyau où ils activent la transcription de leurs gènes cibles (Israël, 2010).

c. La monoubiquitination, la multiubiquitination et l'endocytose des protéines membranaires :

La monoubiquitination d'une protéine transmembranaire a été identifiée comme un signal pouvant induire son endocytose (Haglund et al., 2003), ainsi que son tri intracellulaire.

C'est notamment le cas pour les récepteurs couplés aux protéines G (GPRCs), ou les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comme le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

Suite à son activation par l'EGF, l'EGFR est monoubiquitiné ou multi-monoubiquitiné par l'E3 ubiquitin ligase de la famille RING c-Cbl. Cette ubiquitination permet l'endocytose clathrine-dépendante des récepteurs membranaires, notamment grâce à l'epsine, une protéine impliquée dans l'endocytose, qui possède un UBD, reconnaît les récepteurs ubiquitinés et permet leur recrutement au sein des puits d'internalisation (Horvath et al., 2007; Polo et al., 2002; Shih et al., 2002).

Après l'endocytose, les récepteurs ubiquitinés sont reconnus, dans les endosomes précoces ou de tri, par une machinerie moléculaire particulière constituée par les complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT-0 à ESCRT-3) dont font partie des protéines liant les protéines ubiquitinées via leurs UBD comme Hrs ou Tsg101.

Cette machinerie concentre les récepteurs ubiquitinés et les adresse vers les corps multi-vésiculaires (Multi Vesicular Bodies, MVB) où les protéines sont finalement dégradées par fusion des MVB avec les lysosomes ou des endosomes tardifs (Haglund et al., 2003; Kirkin and Dikic, 2007; Sorkin and Goh, 2009).

d. L'ubiquitination et la régulation de la transcription ou de la réparation de l'ADN :

La monoubiquitination des histones semble réguler directement la transcription en régulant les diverses autres modifications post-traductionnelles des histones – comme la méthylation ou l'acétylation – qui changent la structure de la chromatine la rendant plus ou moins accessible à la machinerie de transcription (Kirkin and Dikic, 2007).

De même, l'ubiquitination des histones et leurs modifications consécutives sont également impliquées dans la réparation de l'ADN et dans le remodelage de la chromatine post-réparatoire (Zhu and Wani, 2010).

Les fonctions de l'ubiquitination dans les cellules sont nombreuses, et les nouvelles études ne cessent d'apporter de nouveaux exemples pour chacun des rôles décrits ci-dessus.
De nombreuses voies de signalisation sont régulées par un ou plusieurs processus d'ubiquitination, effectués à des niveaux différents de la signalisation, catalysés par une ou plusieurs E3 ubiquitine ligases et menant chacun à un événement particulier et nécessaire.

II. La déubiquitination :

Un peu à la manière de la phosphorylation, l'ubiquitination est un processus réversible qui est régulé par un mécanisme strictement inverse : la déubiquitination, c'est à dire l'enlèvement des molécules d'ubiquitine, qu'elles soient isolées ou en chaînes.

Ce processus est catalysé par des enzymes appelées Déubiquitinases (ou DUBs) qui agissent de façon inverse aux E3 ubiquitine ligases, soit en contrebalançant le processus d'ubiquitination en cours, soit consécutivement à l'étape d'ubiquitination. Les DUBs sont par conséquent tout autant impliquées dans la régulation des divers rôles cellulaires de l'ubiquitination.

1. Les différentes Déubiquitinases :

Les Déubiquitinases appartiennent à la superfamille des protéases, dans laquelle sont recensées plus de 550 protéines. Sur la base de leur mécanisme catalytique, les protéases sont divisées en 5 classes : aspartique, métallo, serine, thréonine et cystéine protéases.

Deux classes de protéases contiennent des Déubiquitinases : les cystéine protéases et les métalloprotéases.

a. Les Déubiquitinases de la classe des cystéine protéases :

Mécanisme catalytique des DUBs cystéine protéases

Par définition, l'activité enzymatique des cystéine protéases requiert le groupement thiol d'une Cystéine au niveau du site actif. La déprotonation de cette Cystéine est facilitée par un résidu Histidine adjacent qui est lui-même polarisé par un résidu Aspartate, ces trois acides aminés constituant une triade catalytique.

Pendant la catalyse, la Cystéine du site actif des DUBs effectue une attaque nucléophile sur la fonction carboxyle de la liaison isopeptidique entre la protéine substrat et la molécule d'ubiquitine, ou bien sur la fonction carboxyle de la liaison isopeptidique entre deux ubiquitines successives au sein d'une chaîne de polyubiquitine.

Il résulte de cette déubiquitination la libération de la protéine cible – déubiquitinée partiellement ou totalement - et la formation d'un intermédiaire covalent entre la DUB et l'ubiquitine dont l'hydrolyse libère l'enzyme native et la molécule – ou la chaîne – d'ubiquitine (Nijman et al., 2005).

Au sein du génome humain, les DUB cystéine protéases sont sous-classées en quatre groupes sur la base de la structure tridimensionnelle de leur domaine catalytique.

Les Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs)

Il y a quatre UCHs chez l'Homme dont le domaine catalytique est très homologue.

Des études structurales et biochimiques ont montré que les UCH sont capables de cliver l'ubiquitine sur des protéines cibles (Amerik and Hochstrasser, 2004).

Bien que les UCHs fussent les premières DUBs décrites, leurs fonctions spécifiques sont mal connues. On pense qu'elles agissent principalement sur le recyclage de l'ubiquitine.

Elles pourraient également intervenir dans le processus de maturation de l'ubiquitine. Celle-ci est effectivement synthétisée sous forme de précurseur (chaînes d'ubiquitines linéaires) ou liée à des protéines ribosomales précurseurs, et nécessite l'intervention de DUB pour aboutir une molécule d'ubiquitine mature qui peut être conjuguée sur des protéines cibles.

C'est toutefois dans ce groupe que l'on retrouve UCH-L1 – une UCH exprimée uniquement dans les neurones – dont des mutations inhibant ou réduisant son activité DUB ont été identifiées dans la maladie de Parkinson (Liu et al., 2002).

Les Ubiquitin Specific Proteases (USPs)

Les USPs forment le plus grand groupe de DUB, avec une soixantaine de membres.
Le domaine catalytique des USPs contient deux petits motifs très conservés, appelés Cys-Box et His-Box, qui incluent les acides aminés critiques pour l'activité catalytique.
Pourtant, la taille du domaine catalytique complet varie entre 300 et 800 acides aminés en raison des séquences plus ou moins grandes qui s'intercalent entre ces deux motifs dans les différentes USPs.
Notons que certaines USPs ne possèdent pas les résidus formant la triade catalytique et n'ont pas d'activité catalytique proprement dite, c'est le cas par exemple d'USP39 ou USP45.
Pour d'autres comme USP16 ou USP30, c'est uniquement le résidu Aspartate qui fait défaut sans que cela n'altère l'activité DUB, ce qui suggère qu'un autre acide aminé est utilisé pour stabiliser l'histidine du site actif (Nijman et al., 2005).

Les Machado-Joseph Disease Protein Domain Proteases (MJDs)

Les protéines Ataxin-3 et Ataxin-3-like ont été identifiées comme des DUBs par des analyses bioinformatiques (Scheel et al., 2003) et possèdent bien la capacité de déubiquitiner de façon dépendante d'une cystéine de leur domaine catalytique (Burnett et al., 2003). D'autres protéines nommées Josephin-1 et Josephin-2 présentent les mêmes caractéristiques. Le domaine catalytique de ces quatre protéines a en conséquence été appelé le domaine Josephin (Nijman et al., 2005).
La similarité entre le domaine catalytique de ces protéines et celui des autres déubiquitinases cystéine protéases est faible, mais la triade catalytique est cependant retrouvée.

Le gène *Ataxin-3* est muté dans la maladie neurodégénérative par expansion de polyglutamine appelée Ataxie Spinocérébelleuse de type 3, ou Maladie de Machado-Joseph – du nom de la famille portugaise des Açores où la pathologie a été identifiée.
Comme dans les autres maladies neurodégénératives par expansion de polyglutamine, la présence de répétitions Glutamine dans la séquence de la protéine Ataxin-3 entraîne son mauvais repliement, son accumulation et son agrégation toxique dans les cellules.

Les fonctions des quatre protéines citées plus haut et des autres appartenant à cette classe de MJDs par homologie de séquence restent inconnues.

Les Ovarian Tumor Proteases (OTUs)

Cette quatrième classe de DUBs a également été identifiée par des études de bioinformatique (Makarova et al., 2000).

Le gène *otu* est impliqué dans le développement de l'ovaire chez la drosophile (Goodrich et al., 2004). De façon intéressante, le gène *otu* et ses orthologues humains *Otubain-1* et *Otubain-2* ont des homologies de séquence avec certaines cystéine protéases exprimées par des virus (Makarova et al., 2000).

Otubain-1 et Otubain-2 ont été les deux premières protéines de la classe des OTUs identifiées comme étant catalytiquement actives (Balakirev et al., 2003). Une activité catalytique a également été montrée pour une autre protéine du groupe, Cezanne.
Cependant, pour la plupart des DUBs OTUs, l'activité DUB et le rôle physiologique restent à découvrir.

b. Les Déubiquitinases de la classe des métalloprotéases :

Mécanisme catalytique des DUBs métalloprotéases

Contrairement aux cystéine protéases, les enzymes métalloprotéases utilisent généralement un ion zincique Zn^{2+} pour lier une molécule d'eau polarisée et ainsi générer un intermédiaire réactionnel non covalent avec le substrat. L'atome métallique est initialement stabilisé par un Aspartate et deux résidus Histidine (Ambroggio et al., 2004). L'intermédiaire est ensuite cassé par le transfert d'un proton depuis une molécule d'eau libérant la DUB et l'ubiquitine.

Les DUBs métalloprotéases : JAMM Protéases

Il existe 14 protéines humaines possédant un domaine JAMM (ou JAB1 / MPN / Mov34 metalloenzyme) qui constitue leur domaine catalytique.

La première protéine identifiée dans cette classe est Rpn11/POH1, une sous-unité du protéasome, dont on a montré qu'elle possède une activité metalloprotéase pour l'ubiquitine liée à des protéines cibles (Amerik and Hochstrasser, 2004). Cette protéine porte un domaine appelé MPN/MOV34.

On retrouve ce domaine dans les autres protéines du groupe JAMM dont d'autres ont été identifiées comme portant une activité DUB, comme AMSH / STAMBP (Associated Molecule with the SH3 domain of STAM / STAM Binding Protein), une déubiquitinase localisée dans les endosomes qui régule le trafic intracellulaire de l'EGFR activé et endocytosé, en déubiquitinant l'EGFR et en favorisant son recyclage vers la membrane plasmique (Clague and Urbe, 2006).

Sur la base de la séquence des protéines JAMM connues pour avoir une activité DUB, une séquence MPN+ a été dessinée comme contenant les acides aminés indispensables à l'activité catalytique : deux résidus Histidine et un résidu Aspartate, tous deux nécessaires à la coordination de l'ion Zn^{2+}.

Pour la plupart des protéines ne possédant pas ce domaine MPN+ absolument conservé, l'on ne sait si elles portent une activité DUB ou non.

2. Les rôles de la Déubiquitination :

La déubiquitination est logiquement impliquée dans les mêmes processus que l'ubiquitination, mais pas seulement.

a. La Déubiquitination et la dégradation des protéines par le protéasome :

Nous avons vu que la polyubiquitination K48, en particulier, aboutit à la dégradation par le protéasome des protéines ciblées. Or, une ou plusieurs étapes de déubiquitination interviennent préalablement à cette dégradation.

En effet, une des sous-unités du complexe 19S du protéasome (Proteasome Lid Complex) est une DUB de la classe des métalloprotéases JAMM appelée Rpn11. Cette DUB

est responsable d'une déubiquitination des protéines par coupure de la liaison isopeptidique entre la protéine et l'ubiquitine proximale. Cette déubiqutination est nécessaire à l'entrée des protéines dans le canal du protéasome et leur dégradation finale (Lee et al., 2011; Verma et al., 2002).

Par ailleurs, deux autres déubiquitinases ont été identifiées comme agissant associées au protéasome en amont de la dégradation proprement dite des protéines cibles, mais n'appartenant pas au protéasome : USP14 et d'UCH37.

La déubiquitinase USP14 interagit avec le protéasome et est de cette manière activée. Elle lie aussi les substrats polyubiquitinés qu'elle déubiquitine. Cette déubiquitination semble réprimer la dégradation par le protéasome qui s'en suit (Lee et al., 2010a).

UCH37 est également activée par son interaction avec certaines sous-unités du protéasome, permettant ainsi une déubiquitination des substrats, ce qui semble activer la dégradation de ces substrats par le protéasome (Hamazaki et al., 2006).

b. La Déubiquitination et le destin des protéines membranaires endocytosées :

Nous avons vu avec l'exemple de l'EGFR que l'ubiquitination d'un récepteur membranaire peut mener à son endocytose et à sa dégradation lysosomiale via son interaction avec la machinerie ESCRT et la formation de corps multi-vésiculaires. Là encore, des étapes de déubiquitination sont impliquées dans ce processus.

Il existe effectivement deux déubiquitinases qui sont localisées dans les endosomes précoces et qui vont agir sur l'EGFR activé, ubiquitiné et endocytosé : USP8/UBPY et AMSH.

Ces deux DUBs appartiennent respectivement aux classes USPs et JAMM, elles font toutes deux partie de la machinerie ESCRT-0, en interagissant de façon compétitive avec le même domaine de la protéine STAM, qui appartient au même complexe.

Toutes deux sont capables de déubiquitiner l'EGFR, mais les conséquences de cette déubiquitination sont opposées selon la DUB considérée.

En effet, alors que la déubiquitination par USP8 est une étape nécessaire à l'entrée du récepteur dans les MVB et à sa dégradation finale dans les lysosomes (Row et al., 2006), la déubiquitination de l'EGFR par AMSH favorise le recyclage du récepteur vers la membrane plasmique (Clague and Urbe, 2006; McCullough et al., 2004).

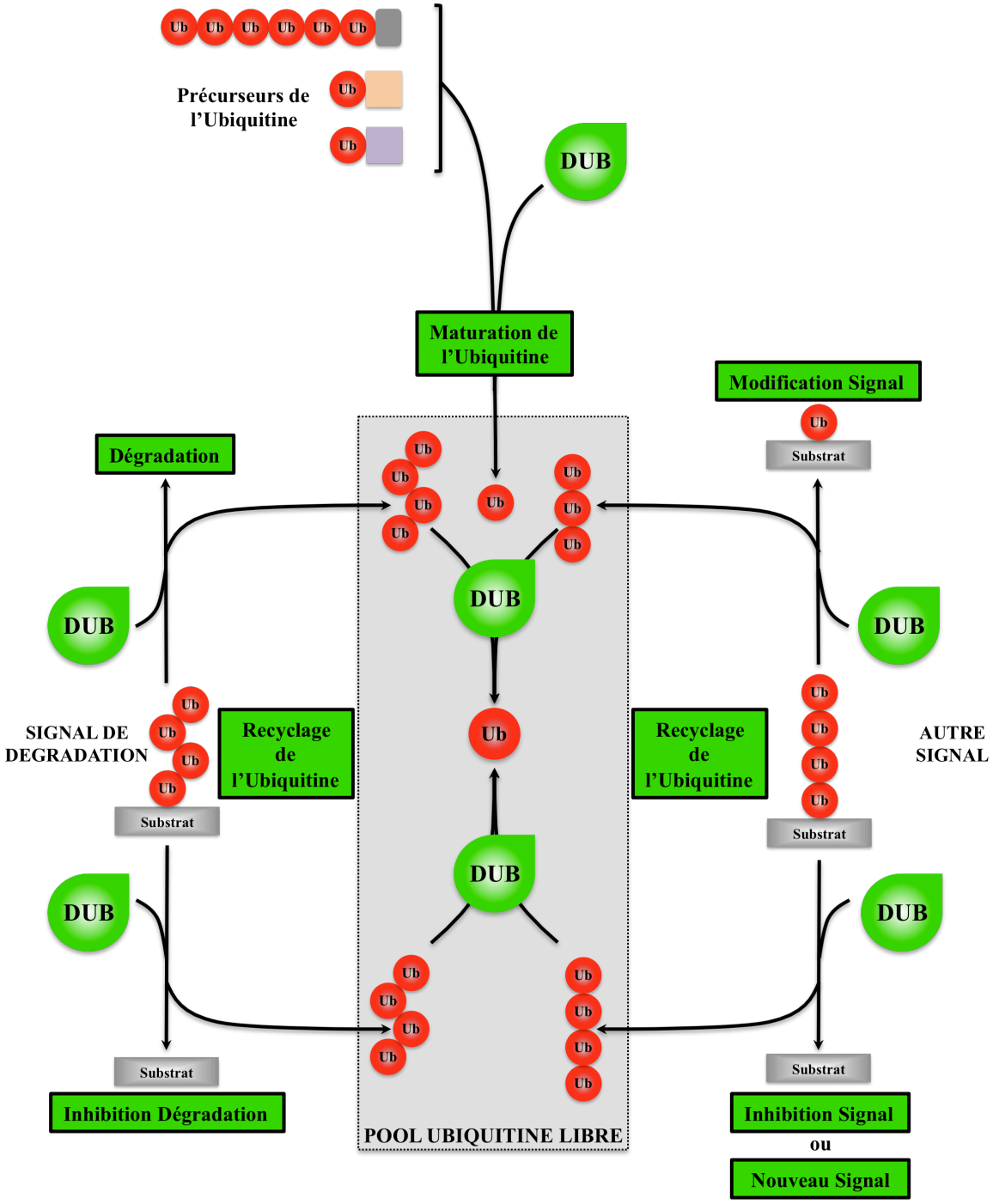


Figure 19 : Les différents rôles de la déubiquitination

Voici donc un exemple intéressant d'une double régulation d'un même processus par deux déubiquitinases différentes qui sont, rappelons-le, recrutées de façon compétitive au sein des endosomes de tri.

c. La Déubiquitination et la maturation de l'ubiquitine :

Comme je le précisais un peu plus tôt, l'ubiquitine est synthétisée sous forme de précurseurs qui peuvent être (Amerik and Hochstrasser, 2004) :

- des chaînes linéaires d'ubiquitine, reliées entre elle par des liaisons peptidiques entre la Glycine C-terminale d'une ubiquitine et le résidu Cystéine N-Terminal de l'ubiquitine suivante dans la chaîne
- une molécule d'ubiquitine liée de façon covalente à certaines protéines ribosomales

Ces précurseurs nécessitent une maturation pour aboutir à des molécules d'ubiquitine conjugables sur des protéines, maturation qui fait intervenir des déubiquitinases pour cliver les liaisons entre les molécules d'ubiquitine ou entre l'ubiquitine et les protéines ribosomales. Une grande partie des DUBs exprimées dans les cellules sont capables de réaliser ces clivages.

Cette étape de maturation pourrait également être un point de contrôle important du système Ubiquitine, ne permettant pas aux molécules d'ubiquitine présentant des défauts de repliement ou de conformation d'être libérées dans la cellule.

d. La Déubiquitination et le recyclage de l'ubiquitine :

Dans les cellules, on retrouve de l'ubiquitine libre – nouvellement synthétisée et maturée par des DUBs – mais également des chaînes plus ou moins longues d'ubiquitine – issues d'une synthèse cytoplasmique par des E3 ubiquitine ligases ou libérées par l'action de DUB sur des substrats polyubiquitinés, par exemple avant la dégradation par le protéasome (Pickart, 2000).

Dans tous les cas, ces oligomères d'ubiquitine sont désassemblés par l'action de diverses déubiquitinases, libérant ainsi dans le cytoplasme des molécules d'ubiquitine libres et recyclées qui pourront à nouveau être conjuguées.

3. La spécificité de la Déubiquitination :

Les déubiquitinases agissent de façon plus ou moins spécifique : chaque DUB régule la déubiquitination d'un nombre limité de substrats ubiquitinés.

Cette spécificité peut se référer aux résidus Ubiquitine eux-mêmes, c'est à dire à une monoubiquitination ou à un type particulier de chaînes de polyubiquitine.
La DUB CYLD, protéine codée par le gène suppresseur de la Cylindromatose – qui est connue pour inhiber la voie de signalisation NF-kB en déubiquitinant TRAF2/5, RIP1 ou encore NEMO – semble par exemple cliver spécifiquement les chaînes K63 in vivo (Sun, 2010). Dans le cas de CYLD, cette spécificité provient du domaine catalytique, mais d'autres domaines en dehors du site actif des DUBs peuvent être responsables de cette spécificité pour un type particulier de chaînes d'ubiquitine (Nijman et al., 2005).
D'autres exemples, ceux d'USP8 et d'USP14 qui ne sont *a priori* capables de déubiquitiner que des chaînes K48 (Nijman et al., 2005).

La spécificité peut également exister vis-à-vis du substrat lui-même. Comme la plupart des interactions enzyme / substrat, l'interaction DUB / protéine cible se fait de façon transitoire via des séquences et motifs situés en dehors du cœur catalytique très conservé des DUBs.
Pour revenir à l'exemple de CYLD, on sait qu'un domaine en dehors du site catalytique de CYLD participe à son interaction avec un de ses substrats, NEMO (ou IKKγ) (Nijman et al., 2005).

Au final, qu'il s'agisse de réguler un processus en contrebalançant l'effet des E3 ubiquitine ligases, ou bien de permettre l'achèvement d'un processus induit par l'ubiquitination, le rôle des déubiquitinases est majeur dans les cellules.

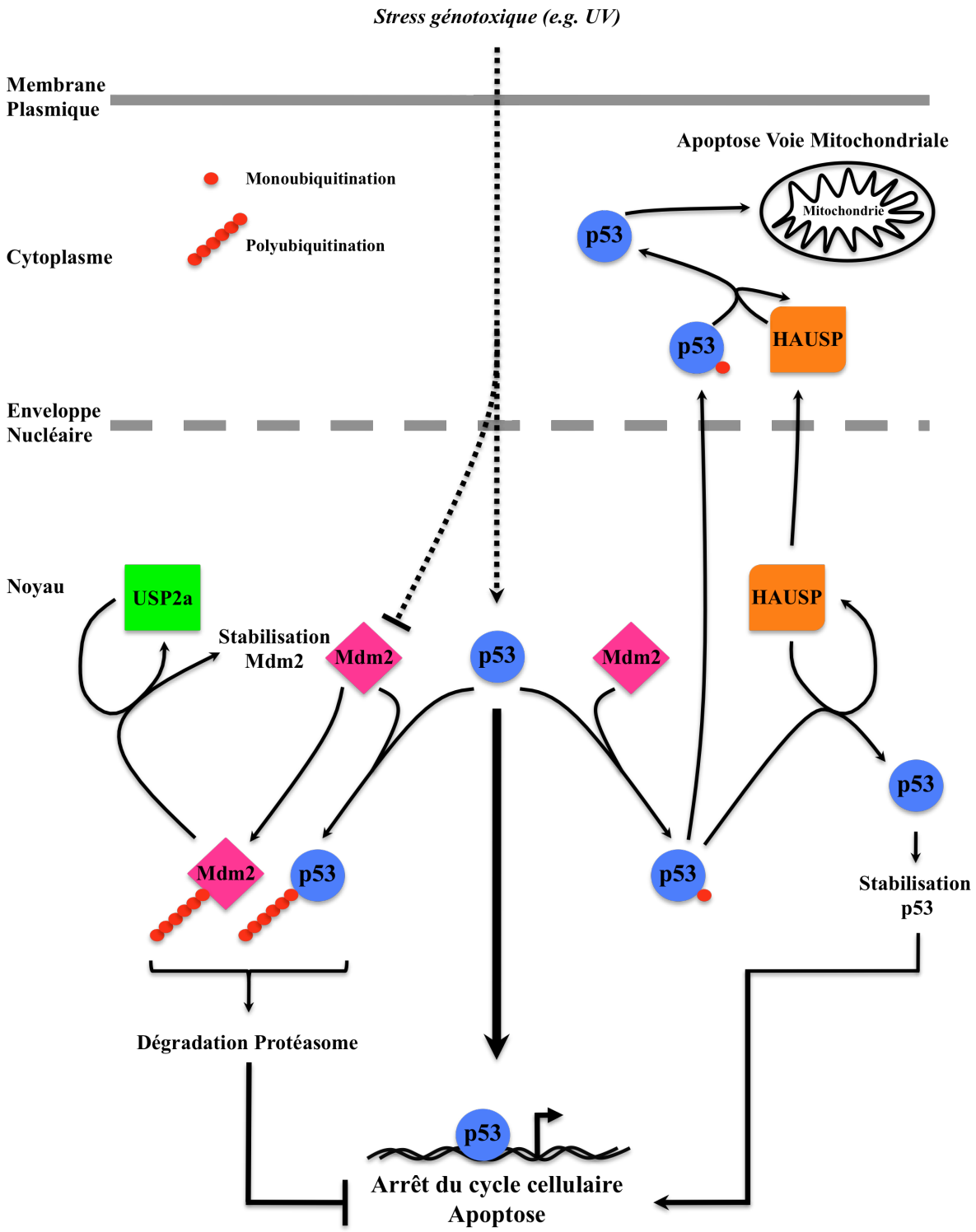


Figure 20 : Régulation de p53 par l'ubiquitination et la déubiquitination

III. Quelques exemples de voies de signalisation régulées par l'ubiquitination et la déubiquitination :

Je vais maintenant vous présenter deux voies dans lesquelles les processus d'ubiquitination et de déubiquitination sont bien documentés, mais surtout qui me permettront d'illustrer, dans un contexte pourtant limité que représente une signalisation, la diversité et les caractéristiques des modes d'action des E3 ubiquitine ligases et des déubiquitinases.

1. p53 est régulé par Mdm2, USP2a et HAUSP / USP7 :

p53 est un facteur de transcription suppresseur de tumeur qui est activé, et stabilisé, suite à divers stress cellulaires.
p53, « le gardien du génome », active alors la transcription de ses gènes cibles qui sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire – la sénescence – et l'apoptose des cellules.
On retrouve d'ailleurs souvent une inhibition de p53, par des mutations ou des mécanismes régulateurs, dans de nombreux cancers, et cette inhibition est souvent requise pour la progression tumorale (Hock and Vousden, 2010).

Dans des conditions normales, p53 est polyubiquitiné dans le noyau par l'E3 ubiquitine ligase Mdm2, qui est par ailleurs capable de s'auto-ubiquitiner, ce qui mène à la dégradation de p53 par le protéasome, tout comme à la dégradation de Mdm2. Lors de stress génotoxiques (e.g. UV), p53 est activé, et Mdm2 est inhibée (par des mécanismes encore mal connus), ce qui mène à la stabilisation de p53 et favorise ses effets apoptotiques et arrête le cycle cellulaire.
Un premier niveau de régulation lié à l'ubiquitination permet donc de contrôler la stabilité de p53 dans les cellules.

Une première déubiquitinase a été impliquée dans la régulation de p53 par la mise en évidence de son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase Mdm2 : il s'agit de USP2a.
Dans le noyau, USP2a stabilise Mdm2 en la déubiquitinant, ce qui empêche sa dégradation par le protéasome (Stevenson et al., 2007).
L'action d'USP2a résulte donc en une accumulation de Mdm2 catalytiquement active et, par conséquent, en une déstabilisation de p53 qui est davantage polyubiquitiné et dégradé par le protéasome (Lee and Gu, 2010). USP2a constitue donc un deuxième niveau de régulation nucléaire de l'activité de p53.

De façon intéressante, en plus de la polyubiquitination, p53 peut également être monoubiquitiné par la même E3 ubiquitine ligase Mdm2 (Li et al., 2003). Cette monoubiquitination a un effet tout autre puisqu'elle va entrainer l'export nucléaire de p53 qui se retrouve alors monoubiquitiné dans le cytoplasme (Brooks et al., 2004).

P53 monoubiquitiné est alors le subtrat d'une deuxième déubiquitinase, HAUSP ou USP7 qui peut déubiquitiner et stabiliser p53 dans le noyau, mais peut également agir sur p53 dans le cytoplasme (Hock and Vousden, 2010).

On pourrait penser que l'export de p53 dans le cytoplasme inhibe ses effets apoptotiques dans le noyau, mais p53 déubiquitiné par HAUSP dans le cytoplasme est très probablement impliqué dans l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale ou dans l'inhibition de l'autophagie (Hock and Vousden, 2010).

Il existe donc, en plus de la régulation nucléaire, deux autres niveaux de régulation cytoplasmique associant ubiquitination et déubiquitination.

Avec une E3 ubiquitine ligase qui est responsable de deux types d'ubiquitination de p53 menant à des effets différents, et la présence de deux déubiquitinases qui agissent directement ou indirectement sur p53 dans des compartiments cellulaires différents, le niveau d'activation de p53 est ainsi très finement régulé, aboutissant à des réponses cellulaires adaptées.

2. cMyc est régulé par Sel-10 / Fbw7 et USP28 :

Myc est une protéine oncogène qui agit comme facteur de transcription contrôlant la croissance et la prolifération cellulaires. Des niveaux élevés de Myc sont d'ailleurs retrouvés dans la plupart des cancers, et participent en grande partie aux processus oncogéniques.

Myc est une protéine instable qui est rapidement dégradée par la voie ubiquitine – protéasome. En effet, l'E3 ubiquitine ligase Sel-10 / Fbw7 recrute une forme phosphorylée de Myc et la polyubiquitine avec des chaînes K48, ce qui engendre sa dégradation par le protéasome.

Une déubiquitinase a été identifiée comme régulateur de Myc, il s'agit d'USP28. USP28 déubiquitine et stabilise Myc en inhibant sa dégradation par le protéasome induite par Sel-10 / Fbw7.

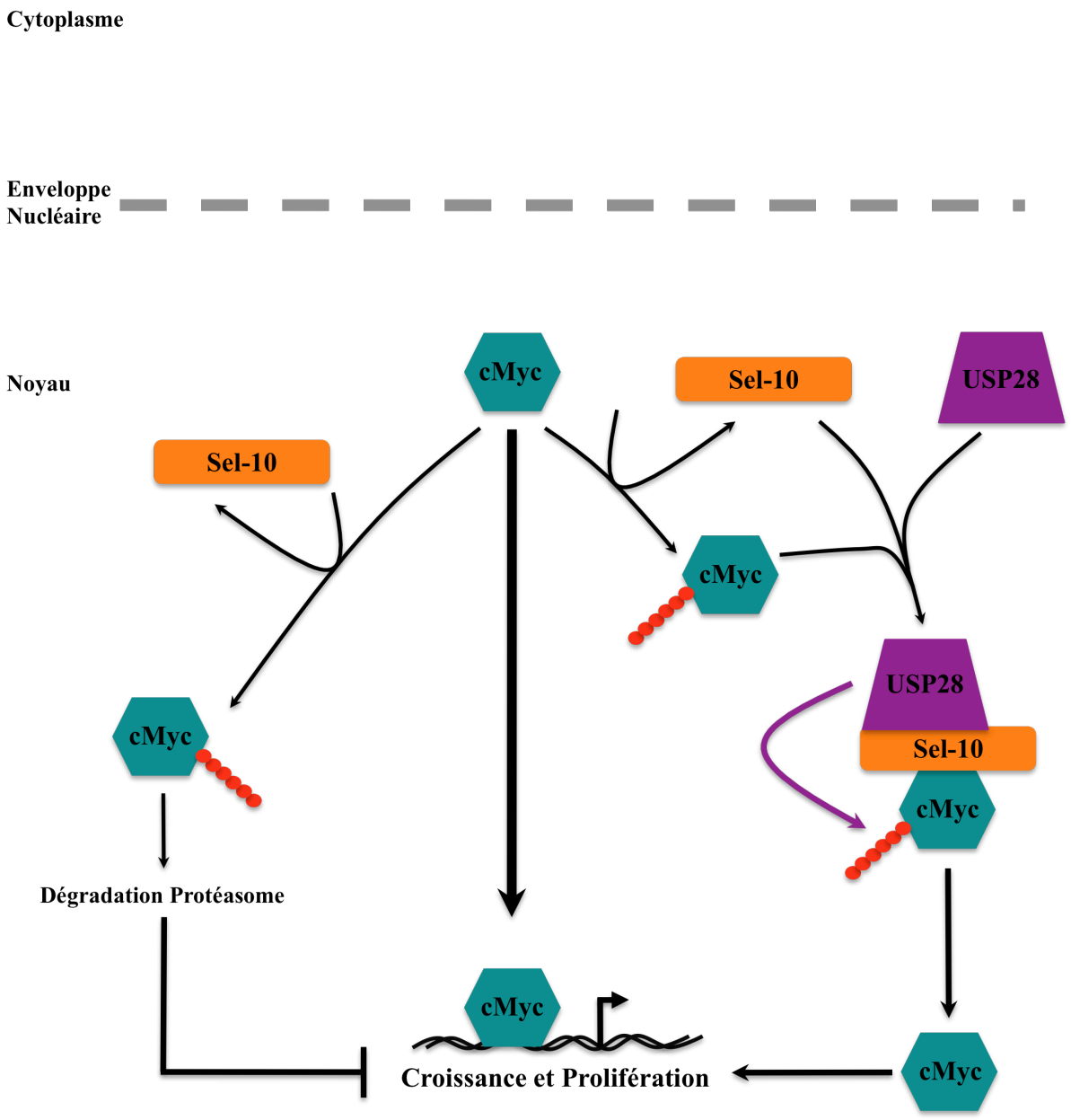


Figure 21 : Régulation de cMyc par l'ubiquitination et la déubiquitination

Mais le mécanisme par lequel USP28 agit est particulier, puisqu'elle ne se lie pas directement à Myc. Non, USP28 se lie à Myc via l'E3 ubiquitine ligase Sel-10 / Fbw7 avec laquelle elle interagit, formant alors un complexe tripartite où Sel-10 sert de pont entre USP28 et Myc. Une fois ce complexe formé, USP28 déubiquitine Myc qui va alors être stabilisé dans le noyau et activer la trancription de ses gènes cibles (Amati and Sanchez-Arevalo Lobo, 2007; Popov et al., 2007).

L'originalité de ce mécanisme d'action et les exemples précédents montrent à quel point les processus d'ubiquitination et de déubiquitination sont variés et importants dans la régulation de la vie cellulaire.

7

L'UBIQUITINATION REGULE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

I. Ubiquitination des ligands DSL

1. **L'E3 ubiquitine ligase Neuralized**
2. **L'E3 ubiquitine ligase Mind bomb**

II. Ubiquitination du récepteur Notch

1. **Ubiquitinations du récepteur Notch en absence d'activation : dégradation du récepteur**
   a. **L'E3 ubiquitine ligase Su(dx)/Itch/AIP4**
   b. **L'E3 ubiquitine ligase Nedd4**
2. **Ubiquitinations du récepteur Notch activé : dégradation ou activation**
   a. **L'E3 ubiquitine ligase Sel-10, dégradation de Notch activé nucléaire et fin du signal**
   b. **L'E3 ubiquitine ligase c-Cbl, dégradation de Notch activé encore ancré à la membrane**
   c. **Monoubiquitination et endocytose du récepteur Notch activé et clivage par la γ-secrétase**
3. **Le cas de l'E3 ubiquitine ligase Deltex**
   a. **Un régulateur positif de la voie Notch**
   b. **Un régulateur négatif de la voie Notch**

III. Ubiquitination de régulateurs de la voie Notch

L'UBIQUITINATION REGULE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

Des étapes d'ubiquitination interviennent dans la signalisation Notch, touchant à la fois les récepteurs et les ligands, régulant à différents niveaux l'ensemble de la voie de signalisation Notch.

I. Ubiquitination des ligands DSL :

Deux E3 ubiquitine ligases ont été identifiées comme régulateurs de l'activité des ligands de Notch, Neuralized et Mind Bomb.

1. L'E3 ubiquitine ligase Neuralized :

Neuralized fait partie des gènes neurogéniques identifiés chez la drosophile, donc caractérisé comme un régulateur positif de la voie Notch (Lehmann et al., 1983), et est conservé chez les vertébrés. On retrouve deux gènes orthologues chez les mammifères ; Neuralized1 et Neuralized2.

Les protéines Neuralized sont des E3 ubiquitine ligases de la famille RING (Really Interesting New Gene), possédant deux domaines NHR (Neuralized Homology Repeat) et un domaine RING finger leur conférant l'activité enzymatique (Deblandre et al., 2001; Lai et al., 2001; Yeh et al., 2001).
Neuralized est capable de monoubiquitiner le ligand Delta *in vitro* (Deblandre et al., 2001) et d'induire l'internalisation de ce ligand par l'intermédiaire de son domaine RING (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001).

Chez la drosophile, Neuralized est nécessaire dans la cellule émettrice du signal pour promouvoir l'activité des ligands (Le Borgne and Schweisguth, 2003b).
Neuralized est ainsi nécessaire au processus d'inhibition latérale intervenant lors de la ségrégation entre précurseurs épidermiques et précurseurs neuronaux (Lehmann et al., 1983).
Au cours du développement des organes sensoriels externes, Neuralized est aussi impliquée dans le contrôle des divisions asymétriques en activant l'endocytose de Delta dans les cellules

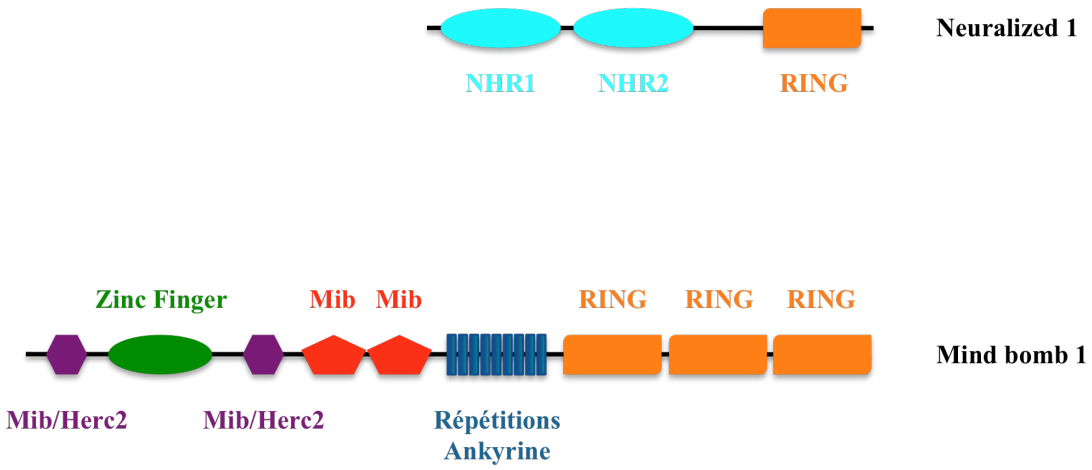


Figure 22 : Structure des E3 ubiquitine ligases agissant sur les ligands de Notch chez les mammifères :
Neuralized 2 possède la même structure que Neuralized1. Mind bomb 2 possède un domaine RING de moins que Mind bomb 1.
NHR : Neuralized Homology Repeat ; RING : Really Interesting New Gene ; Mib : Mind bomb ; Herc2 : HECT domain and RCC1 domain protein 2.

pIIb où elle est ségrégée, et donc l'activation de Notch dans les cellules pIIa (Le Borgne and Schweisguth, 2003b).
Par contre, Neuralized n'est pas nécessaire à la formation de frontières comme dans le disque imaginal au cours du développement de l'aile (Le Borgne et al., 2005).

Chez les mammifères, l'invalidation de *neuralized1* et la double invalidation de *neuralized1* et *neuralized2* ne sont pas létales au stade embryonnaire chez la souris et ne sont pas responsables de phénotypes neurogéniques.
Par contre, Neuralized1 est impliqué dans la différenciation cellulaire dans les glandes mammaires (Vollrath et al., 2001).

Les différents rôles de Neuralized ne sont donc pas très précis et ne semblent pas être forcément conservés au cours de l'Evolution.

2. L'E3 ubiquitine ligase Mind bomb :

Le gène *mind bomb (mib)* a pour la première fois été identifié comme un régulateur de la voie Notch chez le poisson zèbre (Jiang et al., 1996; Itoh et al., 2003), puis son homologue a été identifié chez la drosophile, tout comme les deux homologues chez les mammifères Mib1 et Mib2 (Koo et al., 2005a; Koo et al., 2005b).

La protéine Mind bomb est, dans tous les organismes où elle est exprimée, comme Neuralized, une E3 ubiquitin ligase de la famille RING possédant des répétitions ankyrines et des domaines RING lui donnant l'activité ubiquitine ligase (Chen and Casey Corliss, 2004).
Chez le poisson zèbre, Mind bomb, via ses domaines RING, est capable d'ubiquitiner le ligand Delta, ce qui entraîne son internalisation dans des vésicules intracellulaires (Itoh et al., 2003).

Chez la drosophile, la perte de fonction de Mind bomb entraîne des altérations beaucoup plus larges que celle de Neuralized, suggérant une implication dans de nombreux processus dépendant de Notch (Le Borgne and Schweisguth, 2003a). Elle est létale au stade pupe, celle-ci ne possèdant ni œil ni aile mais ne présentant pas de grave phénotype neurogénique (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005).

Chez la souris, l'invalidation de Mib1 est létale au stade embryonnaire et conduit à un phénotype neurogénique (Koo et al., 2005a), alors que celle de Mib2 est viable (Koo et al., 2007). Chez les mammifères, Mib1 semble donc être la seule E3 ubiquitine ligase des ligands DSL qui est essentielle au développement embryonnaire (Koo et al., 2007).

En contrôlant l'endocytose des ligands de Notch dans les cellules émettrices du signal, les deux E3 ubiquitine ligases Neuralized et Mind bomb pourraient favoriser la transendocytose du domaine extracellulaire de Notch activé avec Delta et ainsi promouvoir le clivage γ-secrétase du récepteur, en somme favoriser la signalisation induite par le ligand. Elles semblent pourtant agir de façon différente selon les organismes et les contextes considérés.

II. Ubiquitination du récepteur Notch :

Plusieurs E3 ubiquitine ligases ont été identifiées comme régulatrices du récepteur Notch et de sa signalisation. Le récepteur Notch est effectivement soumis à différentes ubiquitinations selon qu'il est activé ou non, étapes que je vais développer de façon parallèle à la description des E3 ubiquitine ligases impliquées – de façon plus ou moins précise – dans la voie Notch.

1. Ubiquitinations du récepteur Notch en absence d'activation : dégradation du récepteur :

a. L'E3 ubiquitine ligase Su(dx)/Itch/AIP4 :

La mutation *su(dx)* – pour suppresseur de *deltex* – a été initialement décrite chez la drosophile pour sa capacité à supprimer le phénotype des mutants *deltex* – je reviendrai sur le cas Deltex dans quelques paragraphes (Morgan et al., 1931; Busseau et al., 1994). De plus, une mutation perte de fonction de su(dx) induit un phénotype ressemblant aux allèles *Abruptex* gain de fonction de Notch (mutés au niveau de certaines répétitions EGF), indiquant que *su(dx)* a un rôle de régulateur négatif de la voie Notch (Fostier et al., 1998).
La protéine Su(dx) est une E3 ubiquitine ligase de la famille HECT (Cornell et al., 1999).

Chez la souris, on retrouve un orthologue de su(dx) appelé Itch. Il y a également un orthologue humain appelé AIP4.

La protéine Itch et son orthologue humain appelé AIP4 (Atrophin-1-Interacting Protein 4) ont une structure semblable avec les domaines caractéristiques de la sous-famille d'E3 ubiquitine ligases Nedd4 (Rotin et al., 2000):

- un premier domaine C2, en position N-Terminale, qui permet l'ancrage calcium-dépendant à la membrane plasmique
- quatre domaines WW qui sont responsables d'interactions protéine-protéine avec les domaines PPXY portés par d'autres protéines
- un domaine HECT, en position C-Terminale, qui est le domaine catalytique responsable de l'ubiquitination

Chez la souris, Itch a été connecté à la voie de signalisation Notch comme interagissant avec le domaine intracellulaire du récepteur Notch activé, clivé par la métalloprotéase ADAM et encore ancré à la membrane. Ce travail propose qu'Itch polyubiquitine Notch, ce qui le mène dans une voie de dégradation, régulant ainsi l'activation de Notch (Qiu et al., 2000).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus chez la drosophile ou les mammifères par d'autres groupes.
Effectivement, chez la drosophile, on a montré que Su(dx) et/ou Nedd4 (une autre E3 ubiquitine ligase de la même sous-famille) est capable de réguler le tri du récepteur Notch non activé dans les endosomes précoces, sans toutefois préciser vers quelle direction – dégradation, recyclage (Wilkin et al., 2004).

Le ciblage du récepteur Notch non activé a été confirmé plus récemment par notre laboratoire en montrant que, chez les mammifères, Itch/AIP4 est recruté au récepteur Notch non activé qu'il polyubiquitine en chaînes d'ubiquitine K29, ce qui le mène dans une voie de dégradation lysosomiale, régulant ainsi négativement la quantité de récepteur potentiellement activable exprimé à la surface des cellules (Chastagner et al., 2008).

Notons par ailleurs que le laboratoire a également montré le rôle de Itch/AIP4 dans la polyubiquitination et la dégradation de Deltex via sa polyubiquitination K29, confirmant sa fonction de *suppresseur de deltex* (Chastagner et al., 2006).

b. L'E3 ubiquitine ligase Nedd4 :

Une autre E3 ubiquitine ligase, Nedd4, appartenant à la même sous-famille, semble agir de façon semblable à Itch/AIP4 sur Notch. C'est le cas chez la drosophile, où, comme je le

précisais un peu plus tôt, elle est connue pour réguler le tri du récepteur Notch non activé (Wilkin et al., 2004). Nedd4 est parfois décrit chez la drosophile comme l'E3 ubiquitin ligase qui polyubiquitine Notch et est responsable de son endocytose constitutive, inhibant par ailleurs son activation ligand-indépendante (Sakata et al., 2004).

2. Ubiquitinations du récepteur Notch activé : dégradation ou activation :

a. L'E3 ubiquitine ligase Sel-10, dégradation de Notch activé nucléaire et fin du signal :

Le gène *sel-10* (Suppression or Enhancement of *lin-12* mutations) a été identifié comme un suppresseur du défaut de ponte des œufs induit par une mutation hypomorphe de *lin-12* chez *C. elegans* (Sundaram and Greenwald, 1993). Sel-10 est donc un régulateur négatif de l'activité de Lin-12 (Hubbard et al., 1997). Le gène *Sel-10* est conservé chez les mammifères.

Chez les mammifères, la protéine Sel-10 contient une boîte F ainsi que 7 répétitions WD40 responsables de l'interaction avec la forme nucléaire de Notch, NICD.
C'est une E3 ubiquitine ligase de la famille SCF (Skp-1/Cullin/F-box), qui induit la polyubiquitination et la dégradation par le protéasome de la forme nucléaire transcriptionnellement active de Notch, NICD. Une forme dominante-négative de Sel-10, dépourvue de boîte F, est incapable de recruter le complexe SCF et d'ubiquitiner NICD qui est alors stabilisé dans le noyau (Gupta-Rossi et al., 2001; Wu et al., 2001).

Cette régulation nucléaire nécessite le domaine PEST de Notch qui est phosphorylé par CDK8 (Fryer et al., 2004), ce qui permet le recrutement de Sel-10, la polyubiquitination et la dégradation par le protéasome.

La dégradation de la forme activée nucléaire de Notch permet le contrôle précis de l'activation des gènes cibles de la voie Notch, en rendant la forme nucléaire NICD très instable – ce qui pourrait expliquer que la présence de Notch dans le noyau n'était pas détectable alors qu'on le savait déjà co-activateur transcriptionnel.

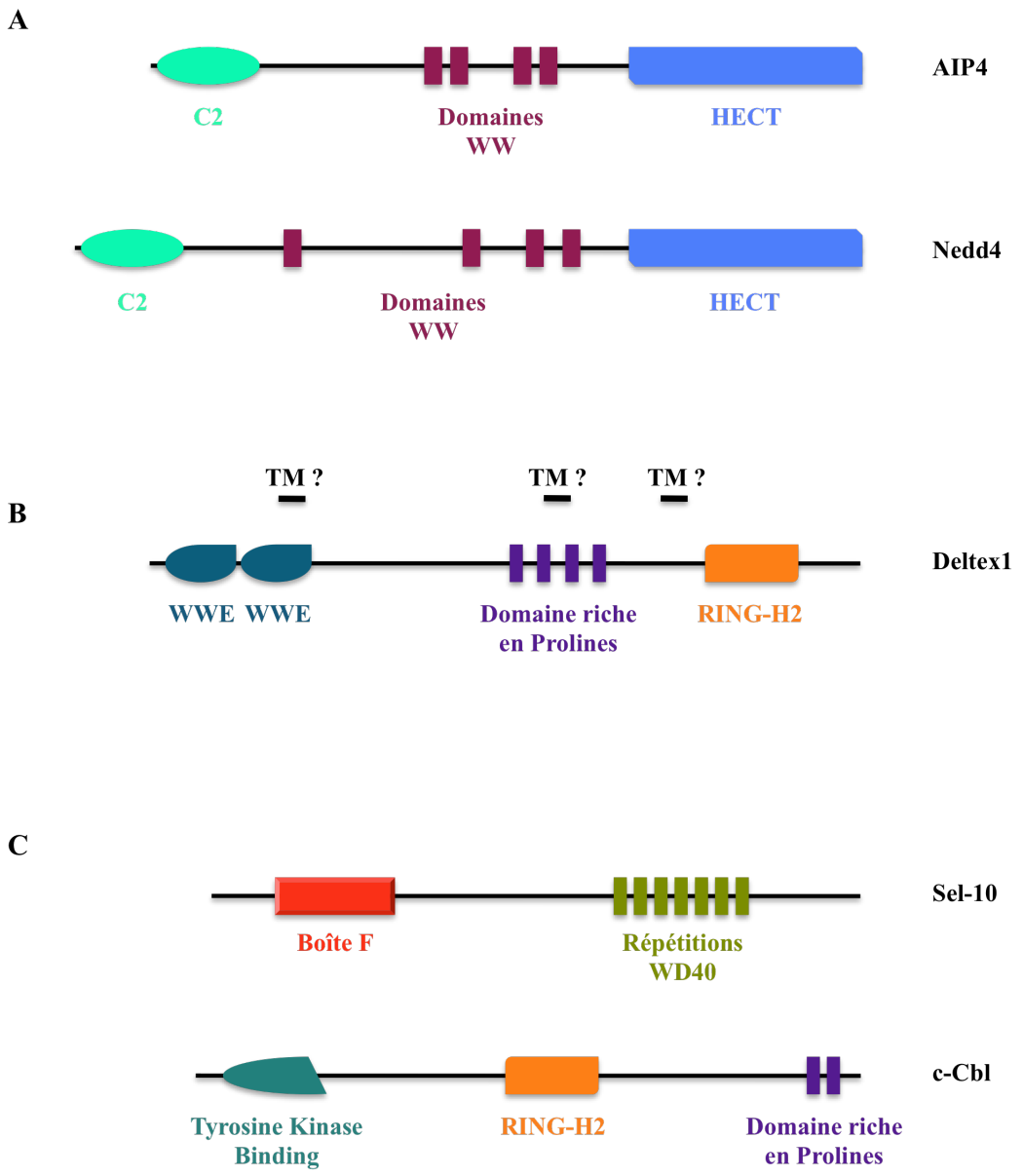


Figure 23 : Structure des E3 ubiquitine ligases agissant sur le récepteur Notch chez les mammifères :
A : Les E3 ubiquitine ligases du récepteur Notch non activé : AIP4 et Nedd4
B : L'E3 ubiquitine ligase Deltex1 et ses domaines transmembranaires putatifs
C : Les E3 ubiquitine ligases du récepteur Notch activé : Sel-10 et c-Cbl
HECT : Homologous to E6-AP Carboxy Terminus ; RING : Really Interesting New Gene.

b. L'E3 ubiquitine ligase c-Cbl, dégradation de Notch activé encore ancré à la membrane ?

Une autre E3 ubiquitine ligase a été impliquée dans la voie de signalisation Notch, en raison de son interaction avec le récepteur Notch activé, clivé par la métalloprotéase de la famille ADAM, et encore ancré à la membrane : c-Cbl.

c-Cbl possède un domaine catalytique RING, et est connue pour multi-ubiquitiner le récepteur à l'EGF suite à son activation, conduisant à son endocytose et à son ciblage vers les lysosomes où le récepteur est finalement dégradé (Shtiegman and Yarden, 2003; Sorkin and Goh, 2009).

Il a été proposé que Cbl interagit avec la forme activée Notch1, le polyubiquitine ce qui entraîne finalement sa dégradation dans les lysosomes (Jehn et al., 2002).

c. Monoubiquitination et endocytose du récepteur Notch activé et clivage par la γ-secrétase :

Les travaux du laboratoire quant à la voie d'activation Notch utilisent, entre autres, une forme tronquée de Notch1, délétée d'une partie du domaine extracellulaire de Notch, semblable au produit de coupure par la métalloprotéase TACE et constitutivement active puisqu'elle est substrat du complexe γ-secrétase.

L'étude de cette forme, appelée Notch-ΔE, a permis de mettre en évidence deux nouvelles étapes nécessaires à la voie d'activation de Notch.

Le laboratoire a effectivement montré que cette forme Notch-ΔE est monoubiquitinée au niveau de la lysine juxtamembranaire K1749 et endocytosée, ces deux étapes étant requises pour le clivage par la γ-secrétase et la production de la forme NICD transcriptionnellement active (Gupta-Rossi et al., 2004).

En effet, l'inhibition de l'endocytose (en utilisant des formes dominantes négatives d'Eps15 ou de la Dynamine), ou l'inhibition de la monoubiquitination (en mutant la lysine 1749 en arginine K1749R) de cette forme Notch-ΔE, aboutit à l'absence de clivage γ-secrétase et de production de la forme NICD.

Ces résultats ont été confirmés en étudiant l'activation du récepteur Notch1 muté K1749R par le ligand Delta1 qui est inhibée par rapport à l'activation Delta1-dépendante d'un récepteur sauvage (Gupta-Rossi et al., 2004).

L'E3 ubiquitine ligase responsable de cette monoubiquitiniation du récepteur Notch activé n'a toutefois pas été identifiée.

3. Le cas de l'E3 ubiquitine ligase Deltex :

L'allèle *deltex* (delta sur le chromosome X) a été initialement décrit en raison de sa mutation dont le phénotype était semblable à celui de mutations de *delta* au niveau de la veine de l'aile (Morgan et al., 1922).

Cette mutation viable (et non neurogénique) a été ensuite redécouverte pour sa capacité à supprimer la létalité des allèles *abruptex* gain de fonction de *notch*. De plus, *deltex* interagit génétiquement avec deux autres loci neurogéniques : *delta* et *mastermind* (Xu and Artavanis-Tsakonas, 1990).

L'implication de Deltex dans la voie Notch a été confirmée par la démonstration de son interaction avec les répétitions ankyrines du récepteur Notch (Diederich et al., 1994).

Il existe quatre gènes orthologues chez les mammifères codant pour quatre protéines – Deltex1, Deltex2, Deltex3 et Deltex4 – qui forment des homodimères ou hétérodimères.

La protéine Deltex a été initialement décrite comme cytoplasmique (Busseau et al., 1994) mais des données plus récentes du laboratoire montrent que la protéine Deltex1, chez les mammifères, est associée aux endosomes (Chastagner et al., 2006).

Les protéines Deltex (ou DTX) possèdent une structure très conservée entre la drosophile et les mammifères (Kishi et al., 2001; Matsuno et al., 1995), avec :

- un domaine I, en position N-Terminale, qui est nécessaire et suffisant pour interagir avec Notch, et qui se compose de deux domaines WWE (Aravind, 2001)
- un second domaine riche en prolines, qui est connu pour interagir avec des domaines de type SH3 (Matsuno et al., 1998)
- un domaine RING-H2, domaine nécessaire à l'activité des E3 ubiquitine ligases RING, et qui présente le plus fort degré de conservation entre la drosophile et l'Homme, suggérant une fonction cruciale pour la protéine

L'association du domaine RING et de domaines WWE est une caractéristique commune à de nombreuses protéines impliquées dans l'ubiquitination (Aravind, 2001), Deltex apparaît donc comme une E3 ubiquitine ligase qui est susceptible d'ubiquitiner le récepteur Notch avec lequel elle interagit.

Qui plus est, trois des quatre homologues humains de Deltex ont la capacité de s'auto-ubiquitiner, et possède ainsi une fonction d'E3 ubiquitine ligase porté par leur domaine RING : DTX1, DTX2 et DTX3. Ces mêmes observations ont été faites sur des protéines présentant une région C-Terminale très homologue à celle des protéines Deltex, les protéines de la famille BBAP (B-lymphoma and BAL-associated proteins) (Takeyama et al., 2003).

Quel est le rôle de Deltex dans la voie de signalisation Notch, et ce rôle est-il dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase ?

Les données issues des différents travaux effectués chez la drosophile ou les mammifères restent encore très contradictoires et proposent que Deltex agit aussi bien comme un régulateur positif que comme un régulateur négatif de la voie Notch.

a. Un régulateur positif de la voie Notch :

Des expériences de surexpression de Deltex chez la drosophile ont révélé des phénotypes similaires à ceux observés lors d'une expression d'une forme activée de Notch dans la formation des organes sensoriels externes (Matsuno et al., 1995).

Par ailleurs, la mutation perte de fonction de *deltex* peut être compensée par l'expression d'une forme activée de Notch, indiquant également que Deltex est un régulateur positif de la voie Notch agissant en amont de la production de la forme NICD transcriptionnellement active (Matsuno et al., 1995).

D'autres données appuient ce rôle de régulateur positif pour Deltex dans le développement de la marge de l'aile de drosophile (Hori et al., 2004). Ces mêmes travaux proposent que la surexpression de Deltex active l'endocytose et l'accumulation dans les endosomes tardifs de Notch qui est colocalisé avec Deltex et dont l'activation est renforcée (Hori et al., 2004; Wilkin et al., 2008).

Le rôle de Deltex, cette fois-ci endogène, dans l'internalisation et l'activation de Notch a été également récemment décrit chez la drosophile (Yamada et al., 2011).

L'activité de régulateur positif semble avoir été conservée chez les mammifères mais cela reste toujours controversé, d'autant que le mécanisme de cette régulation n'est pas connu (Kishi et al., 2001).

Deltex semble aussi agir dans la transduction du signal Notch indépendemment du co-facteur de transcription CSL (Ramain et al., 2001). Certains travaux suggèrent que Deltex est capable de réprimer l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E47 ou MASH1 (qui sont les co-activateurs de la transcription de gènes cibles dont Notch réprime l'expression via Hes1), peut-être en agissant directement dans le noyau (Ordentlich et al., 1998; Yamamoto et al., 2001). Cette localisation nucléaire putative de Deltex reste toutefois contradictoire avec sa localisation cytoplasmique décrite généralement chez la drosophile ou les mammifères.

b. Un régulateur négatif de la voie Notch :

Des expériences sur des neurones en culture ont montré que l'expression de formes activées de Notch induisent une rétraction des neurites sur ces neurones. Or, la surexpression de Deltex1 dans ce même système induit au contraire une croissance des neurites, ce qui suggère plutôt un rôle antagoniste de Deltex sur la voie de signalisation Notch (Sestan et al., 1999).

Chez les mammifères, la voie de signalisation Notch, comme nous l'avons vu précédemment, inhibe le développement lymphoïde B et induit la différenciation lymphoïde T. Or, la surexpression de Deltex dans les cellules souches hématopoïétiques agit de manière opposée en induisant un développement ectopique des lymphocytes B dans le thymus et une absence de lymphocytes T matures (Izon et al., 2002), indiquant encore une fois un rôle de régulateur négatif de la voie Notch.

Un peu plus récemment, l'existence d'un triple complexe entre Notch non activé, Deltex et Kurtz (Beta-Arrestine non visuelle) a été mis en évidence chez la drosophile, ce complexe menant à une polyubiquitination de Notch et à sa dégradation finale par le protéasome (Mukherjee et al., 2005).

De façon assez surprenante, des dizaines d'années après la découverte de Deltex comme un régulateur de la voie Notch, il est toujours impossible de dire avec précision comment agit cette protéine dans la voie Notch, ni même de caractériser si elle active ou

inhibe la signalisation Notch. Pourtant les données s'accumulent, donnant à Deltex des rôles variés qui dépendent du contexte étudié, ce qui n'aide toujours pas à déterminer son mode d'action. Peut-être que Deltex, justement en fonction du contexte, agit véritablement tantôt comme un régulateur positif, tantôt comme un régulateur négatif de la voie Notch.

III. Ubiquitination de régulateurs de la voie Notch :

A l'ubiquitination des ligands DSL et du récepteur Notch s'ajoutent celles des facteurs régulant la voie de signalisation Notch.

C'est le cas par exemple de Numb, un régulateur négatif de la voie Notch qui semble impliqué dans l'endocytose du récepteur Notch (Gulino et al., 2010).

L'E3 ubiquitine ligase LNX (Ligand of Numb protein X), de la famille RING, interagit et polyubiquitine Numb, ce qui induit sa dégradation dans le protéasome, régulant ainsi positivement la voie de signalisation Notch (Nie et al., 2002; Takahashi et al., 2009).

Comme nous venons de le voir, les étapes d'ubiquitination affectant le récepteur Notch, ses ligands ou leurs régulateurs sont nombreuses et décrites avec plus ou moins de précision.

Elles mettent en évidence, de façon certaine, l'importance de ces processus dans la régulation de la signalisation Notch, qu'il s'agisse de contrôler l'activation même du récepteur par ses ligands ou bien la signalisation intracellulaire du récepteur consécutive à son activation.

8

eIF3f, UNE SOUS-UNITE D'UN FACTEUR D'INITIATION DE LA TRADUCTION QUI POSSEDE UN DOMAINE JAMM / MPN

I. eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3

1. L'initiation de la traduction chez les Eucaryotes et rôle d'eIF3

2. Les sous-unités du complexe eIF3

3. Les différents rôles d'eIF3f

II. eIF3, un complexe de la famille PCI dont les sous-unités eIF3f et eIF3h possèdent un domaine JAMM / MPN

1. eIF3f possède un domaine JAMM / MPN

2. Le complexe eIF3 appartient à la famille des Zomes ou PCI

EIF3F, UNE SOUS-UNITE D'UN FACTEUR D'INITIATION DE LA TRADUCTION QUI POSSEDE UN DOMAINE JAMM / MPN

Vous comprendrez un peu plus tard que, au cours de la réalisation de mon projet, j'ai été amené à travailler sur la protéine eIF3f de façon assez inattendue. Voici quelques données concernant eIF3f et ses quelques fonctions identifiées jusqu'alors.

I. eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3 :

1. L'initiation de la traduction chez les Eucaryotes et rôle d'eIF3 :

L'initiation de la traduction chez les Eucaryotes fait intervenir au moins douze facteurs d'initiation (eIF) qui interagissent et recrutent :

- l'ARN de transfert initiateur chargé de méthionine, appelé Met - $tRNA_i^{Met}$, dont l'anticodon est complémentaire du codon d'initiation de la traduction de l'ARN messager (AUG)
- les sous-unités 40S et 60S du ribosome 80S qui vont permettre d'hybrider les nucléotides du codon d'initiation avec ceux de l'anticodon de l'ARN de transfert de la méthionine initiale
- l'ARN messager, mRNA

L'ensemble de ces recrutements permet l'assemblage des complexes de pré-initiation de la traduction (PICs) et assure que le bon codon d'initiation AUG soit bien déchiffré (Hershey and Merrick, 2000).

Le complexe eIF3 a été l'un des premiers facteurs d'initiation à être identifié dans les années 1970, mais la plupart des connaissances précises quant à son fonctionnement dans l'initiation de la traduction n'a été acquise que ces dix dernières années.

La majeure partie des étapes de l'initiation de la traduction sont catalysées par le complexe eIF3, comme (Hinnebusch, 2006) :

- la liaison de la sous-unité 40S du ribosome et l'inhibition de son association prématurée avec la sous-unité 60S
- l'assemblage du complexe ternaire (TC) eIF2–GTP–Met - $tRNA_i^{Met}$

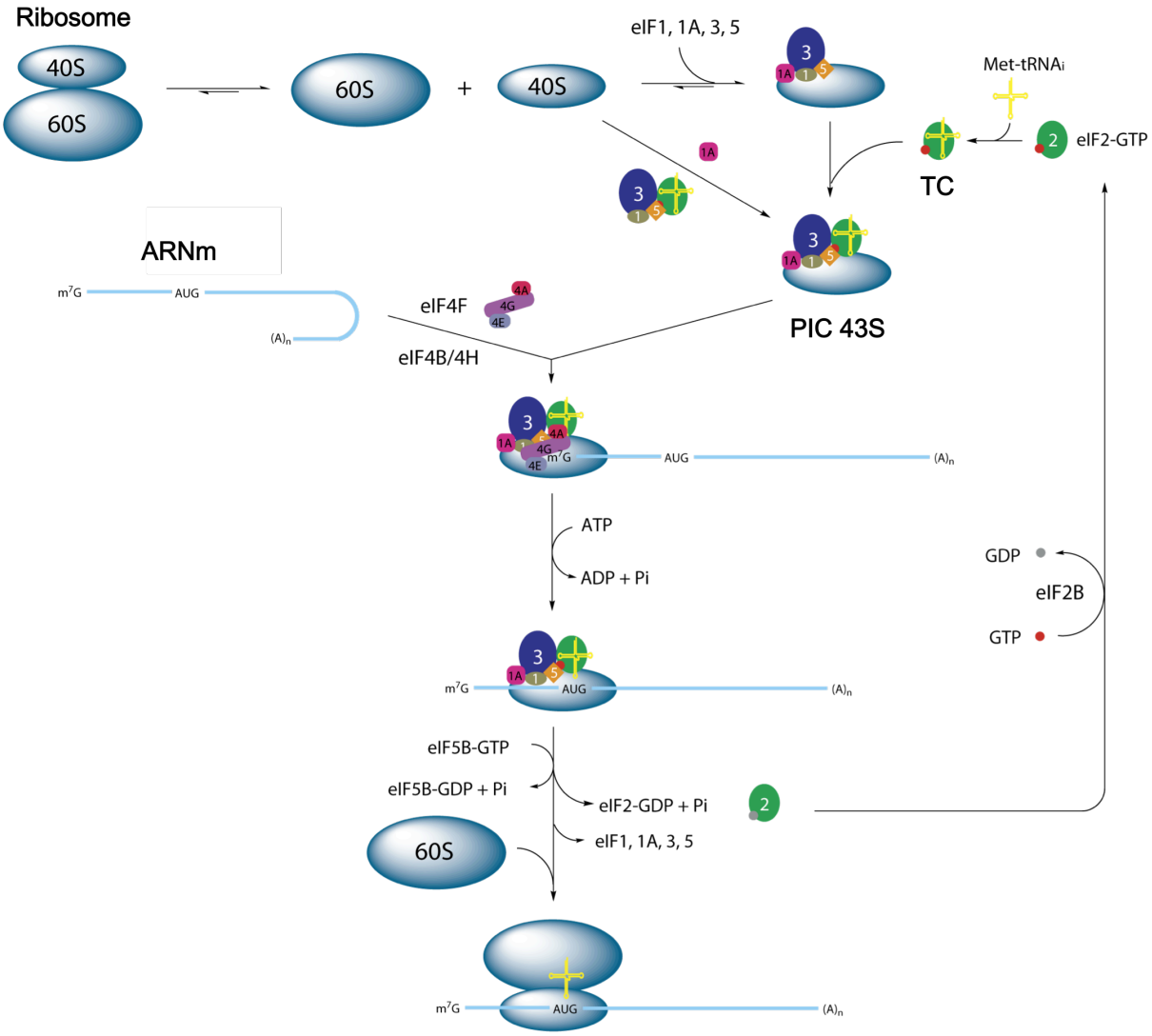


Figure 24 : Les différentes étapes de l'initiation de la traduction
TC : Complexe Ternaire eIF2-GTP-Met – $tRNA_i^{Met}$
PIC 43S : Complexe de pré-initiation 43S

- la liaison de ce complexe TC à la sous-unité 40S du ribosome, formant ainsi que le complexe de pré-initiation 43S (PIC 43S)
- le recrutement du mRNA au PIC 43S
- le scannage de la séquence du mRNA pour la reconnaissance du codon d'initiation AUG

2. Les sous-unités du complexe eIF3 :

En accord avec ses fonctions diverses dans l'initiation de la traduction, le complexe eIF3 est le plus grand et le plus complexe des facteurs d'initiation. Chez les mammifères, il est composé de 13 sous-unités différentes qui sont appelées eIF3a à eIF3m (Browning et al., 2001).

Chez la levure bourgeonnante, le complexe eIF3 a une organisation plus simple avec seulement 5 sous-unités orthologues des protéines eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g et eIF3i de mammifères. Chacune de ces sous-unités est essentielle pour la traduction *in vivo* (Hinnebusch, 2006), et l'ensemble constitue un noyau fonctionnel suffisant.

Chez la levure fissipare, l'organisation du complexe est plus compliquée, et l'on retrouve, en plus des cinq sous-unités du noyau fonctionnel, l'orthologue d'eIF3f et, de façon exclusive, soit les orthologues de eIF3h et eIF3m, soit ceux de eIF3d et eIF3e.
Les sous-unités orthologues d'eIF3f et eIF3m, bien que n'appartenant pas au noyau fonctionnel, sont dans ce cas indispensables au fonctionnement du complexe eIF3 (Hinnebusch, 2006).

Chez les mammifères, l'organisation fonctionnelle d'eIF3 semble être encore différente. Les sous-unités eIF3g et eIF3i, qui sont pourtant les plus conservées entre les levures et l'Homme, semblent être dispensables pour l'activité du complexe eIF3 des mammifères.
A l'inverse, trois sous-unités qui ne sont pas forcément conservées – eIF3e, eIF3f et eIF3h – sont absolument nécessaires à l'activité d'eIF3, ce qui est aussi le cas des sous-unités très conservées eIF3a, eIF3b et eIF3c, ces six protéines formant le cœur fonctionnel du complexe eIF3 des mammifères (Masutani et al., 2007).

3. Les différents rôles d'eIF3f :

Des travaux ont montré que la sous-unité eIF3f est impliquée dans d'autres processus que l'initiation de la traduction. Voici un bref aperçu des fonctions prêtées à eIF3f.

eIF3f semble inhiber la réplication du virus HIV-1 en modifiant la reconnaissance de la séquence spécifique de l'ARN pré-messager d'HIV-1 par le facteur d'épissage 9G8. Cet effet semble se produire par un recrutement des protéines CDK11 et 9G8 avec lesquelles eIF3f interagit (Valente et al., 2009).

Il a également été montré qu'eIF3f régule la voie de signalisation mTor, importante pour la différenciation du muscle et l'hypertrophie musculaire via la phosphorylation de S6K1 qui va activer la traduction et la croissance musculaire. eIF3f sert de protéine d'échafaudage qui recrute mTor et S6K1 et permet une action coordonnée menant à la phosphorylation de S6K1 et à la croissance musculaire. Ces mêmes travaux proposent qu'eIF3f est polyubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase de la famille DCF Atrogin1 / MAFbx, ce qui le cible vers une dégradation par le protéasome (Csibi et al., 2010; Csibi et al., 2009).

D'autres données rapprochent eIF3f du système ubiquitine, puisque des travaux récents ont montré qu'eIF3f interagit physiquement et génétiquement avec une E3 ubiquitine ligase de la famille RING appelée TRC8 qui est localisée dans le réticulum endoplasmique. D'ailleurs, TRC8 interagit aussi avec la sous-unité eIF3h (Lee et al., 2010b).

L'expression d'eIF3f semble être régulée et osciller au cours du cycle cellulaire, puisque, dans des cellules A549, elle est inhibée au cours de la phase G0, mais atteint des pics au cours de la phase S puis de la mitose (Higareda-Mendoza and Pardo-Galvan, 2010).

De plus, l'on a retrouvé eIF3f associé à divers cancers puisque, selon une étude, son expression est diminuée dans les cancers du pancréas, du sein, de l'ovaire et dans les mélanomes, et cela dès le stade ARN messager. D'autre part, la surexpression ectopique d'eIF3f dans des lignées cellulaires de mélanomes ou de cancers du pancréas mène à une inhibition de la prolifération et à une augmentation de l'apoptose. Au contraire, le knock-down d'eIF3f dans les lignées cellulaires de mélanomes diminue l'apotose (Doldan et al., 2008a; Doldan et al., 2008b).

```
                E.................................HSH-------SXXD                MPN+
hAMSH         VETCGILCGKL   ...   ITLGWIHTHPTQTAFLSSVDLHTH            MPN+
hRpn11        MEVMGLMLGEF   ...   MVVGWYHSHPGFGCWLSGVDINTQ            MPN+
hCsn5         LEVMGLMLGKV   ...   NAIGWYHSHPGYGOWLSGIDVSTO            MPN+
hRpn8         KRVVGVLLGSW   ...   RIVGWYHTGPKLHKNDIAINELMK            MPN
hCsn6         VQVIGALIGKQ   ...   EFLGWYTTGGPPDPSDIHVHQQVC            MPN

heIF3f     EGAARVIGTLLGTV   ...   LILGWYATGHDITEHSVLIHEYYS            MPN
heIF3h        EVVQGVLLGLV   ...   LHVGWYQSTYYGSFVTRALLDSQF            MPN

                                          HE--H--G--H
```

Signature de Métalloprotéase

Figure 25 : Alignement des séquences du domaine MPN des sous-unités des Zomes et de celui de la déubiquitinase AMSH :

Les acides aminés les plus conservés sont représentés en jaune.

Les acides aminés formant la séquence MPN+ et nécessaires à l'activité protéase sont surlignés en rouge et sont retrouvés dans les protéines AMSH, Rpn11 et Csn5, mais pas dans Rpn8, Csn6, eIF3f et eIF3h.

La signature de métalloprotéase, contenant notamment deux résidus Histidine et un résidu Acide Aspartique, est représentée en vert. Elle est retrouvée dans la séquence d'eIF3f, mais pas dans celles de Rpn8 et Csn6 qui n'ont pas d'activité protéase, ni dans celle d'eIF3h. Elle rend envisageable une activité catalytique pour eIF3f.

eIF3f est donc impliqué dans plusieurs processus autres que la traduction, même si les données ne sont pas toujours très appuyées et que les interprétations de ces différents travaux sont parfois exagérées.

II. eIF3, un complexe de la famille PCI dont les sous-unités eIF3f et eIF3h possèdent un domaine JAMM / MPN :

1. eIF3f possède un domaine JAMM / MPN :

Parmi les treize sous-unités du complexe eIF3, deux possèdent un domaine JAMM / MPN (Mpr1-Pad1-N-Terminal) dont on a vu qu'il est caractéristique des déubiquitinases de la classe des métalloprotéases : il s'agit d'eIF3f et eIF3h.

Certes, ces domaines JAMM / MPN ne s'alignent pas parfaitement à la séquence MPN+ dont je vous parlais, qui est dessinée sur la base de la séquence des quelques protéines connues pour avoir une activité métalloprotéase, et qui est censée prévoir l'activité catalytique.

D'ailleurs, pour chacune de ces deux sous-unités, aucune activité protéase n'avait jusqu'alors été identifiée (Pick et al., 2009).

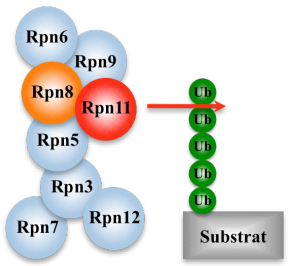
Mais la présence des domaines JAMM contenant les acides aminés essentiels – deux Histidines et un Acide Aspartique organisés de façon à pouvoir coordonner un ion zincique – rend possible une activité déubiquitinase, au moins pour eIF3f.

La présence de ces deux sous-unités à domaine JAMM / MPN participe à l'association du complexe eIF3 à la famille PCI que je vais maintenant décrire.

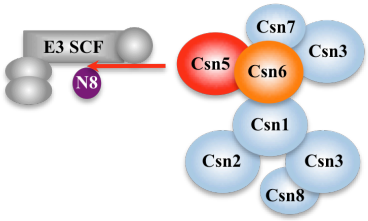
2. Le complexe eIF3 appartient à la famille des Zomes ou PCI :

La famille PCI (Proteasome Lid Complex, COP9 Signalosome, Translation Initation Factor 3) est composée, comme l'indique son nom, de trois complexes macromoléculaires :

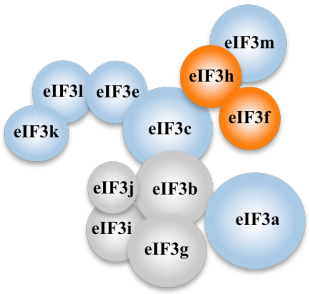
- le complexe 19S du protéasome ou Proteasome Lid Complex
- le COP9 Signalosome ou CSN
- le complexe d'initiation de la traduction eIF3



Protéasome 19S
Déubiquitination

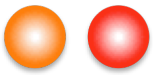


Signalosome COP9
Déneddylation



eIF3
Activité protéase ?

Sous-unités PCI



Sous-unités MPN
(rouge : catalytiquement active)

Autres sous-unités

Figure 26 : Les trois complexes de la famille PCI : les Zomes

Cette famille PCI est basée sur une très grande homologie de structure entre ces trois complexes, puisque, en effet, chacun des complexes comporte :

- 6 sous-unités à domaine PCI, caractéristique de ces trois complexes
- 2 sous-unités à domaine MPN, aussi caractéristique de ce groupe
- un certain nombre de sous-unités sans domaine PCI ni MPN, au nombre de 5 dans le cas du complexe eIF3

De façon intéressante, dans chaque complexe, les deux sous-unités MPN sont associées côte à côte (Pick et al., 2009).

De façon encore plus intéressante, une seule de ces deux sous-unités MPN exerce une activité catalytique de déconjugaison de l'ubiquitine ou d'une molécule *ubiquitin-like*.

Dans le complexe 19S du protéasome, la sous-unité Rpn11 porte une activité déubiquitinase et participe, comme nous l'avons décrit précédemment, à la déubiquitination des substrats avant leur dégradation dans le protéasome (Verma et al., 2002). L'autre sous-unité MPN, Rpn8, n'a pas d'activité catalytique avérée.

Dans le COP9 Signalosome, la sous-unité CSN5 manifeste une activité de déneddylation, en déconjugant la molécule NEDD8 des protéines de type Cullin au sein des E3 ubiquitine ligases de la famille SCF, ce qui favorise le recyclage de ces enzymes (Wee et al., 2005). L'autre sous-unité, CSN6, ne possède pas une telle activité.

Aucune activité de déubiquitination ou de déconjugaison d'*ubiquitin-like* n'avait été identifiée, jusque là, pour les sous-unités eIF3f ou eIF3h du complexe eIF3.

Les similitudes entre ces trois complexes sont nombreuses et suscitent intérêt et curiosité. Bien que chaque complexe ait des rôles distincts, la grande homologie de structure et les activités de déconjugaison communes au moins à deux d'entre eux laissent penser qu'une telle activité catalytique est également présente dans le complexe eIF3, même si pour l'instant aucun résultat expérimental ne le suggère.

C'est d'ailleurs un sujet qui engendre un débat : eIF3 possède-t-il une activité métalloprotéase ? Cette activité est-elle nécessaire à l'initiation de la traduction ? Laquelle des sous-unités MPN porte cette activité ? eIF3 se comporte-t-il comme les deux autres PCI ? Telles sont les questions que se posent les amoureux des Zomes.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons vu, les événements d'ubiquitination sont nombreux à réguler la voie de signalisation Notch, et, bien que leurs mécanismes d'action ne soient pas toujours parfaitement connus, plusieurs E3 ubiquitine ligases ont été identifiées comme agissant sur les ligands ou sur les récepteurs Notch.

D'un point de vue plus général, nous avons pu découvrir à quel point les étapes de déubiquitination sont importantes voire indispensables à l'achèvement des processus induits par l'ubiquitination. Or, à l'inverse des E3 ubiquitine ligases, nous ne connaissons toujours pas les déubiquitinases qui régulent la voie de signalisation Notch.

Certes, chez la drosophile, la déubiquitinase Fat facets (Faf) a été identifiée comme régulant positivement l'internalisation et donc l'activité du ligand Delta, en déubiquitinant la protéine Liquid facets (Lqf), ce qui active finalement la voie de signalisation Notch au cours du développement de l'œil (Chen et al., 2002; Overstreet et al., 2004). Mais c'est l'unique DUB identifiée, et son action est indirecte sur Notch.

HYPOTHESE GENERALE ET OBJECTIFS

Nous avons fait l'hypothèse que chaque événement d'ubiquitination du récepteur Notch est accompagné d'une étape de déubiquitination subséquente qui est requise pour la poursuite du processus régulé par l'ubiquitination ou bien qui antagonise ce processus.

Mon projet de thèse consistait, en conséquence, à identifier les déubiquitinases impliquées dans la voie Notch, plus particulièrement dans deux étapes d'ubiquitination du récepteur Notch.

OUTILS

Nous avons choisi une stratégie de silencing par ARN interférent, en utilisant une banque de shRNAs ciblant les 91 déubiquitinases connues ou putatives du génome humain.

Cette banque, construite par le groupe de René Bernards (Amsterdam), cible effectivement l'expression de 91 protéines possédant un domaine catalytique DUB, que ces protéines aient une activité avérée ou non. Elle est composée de 91 pools, chaque pool étant constitué de 4

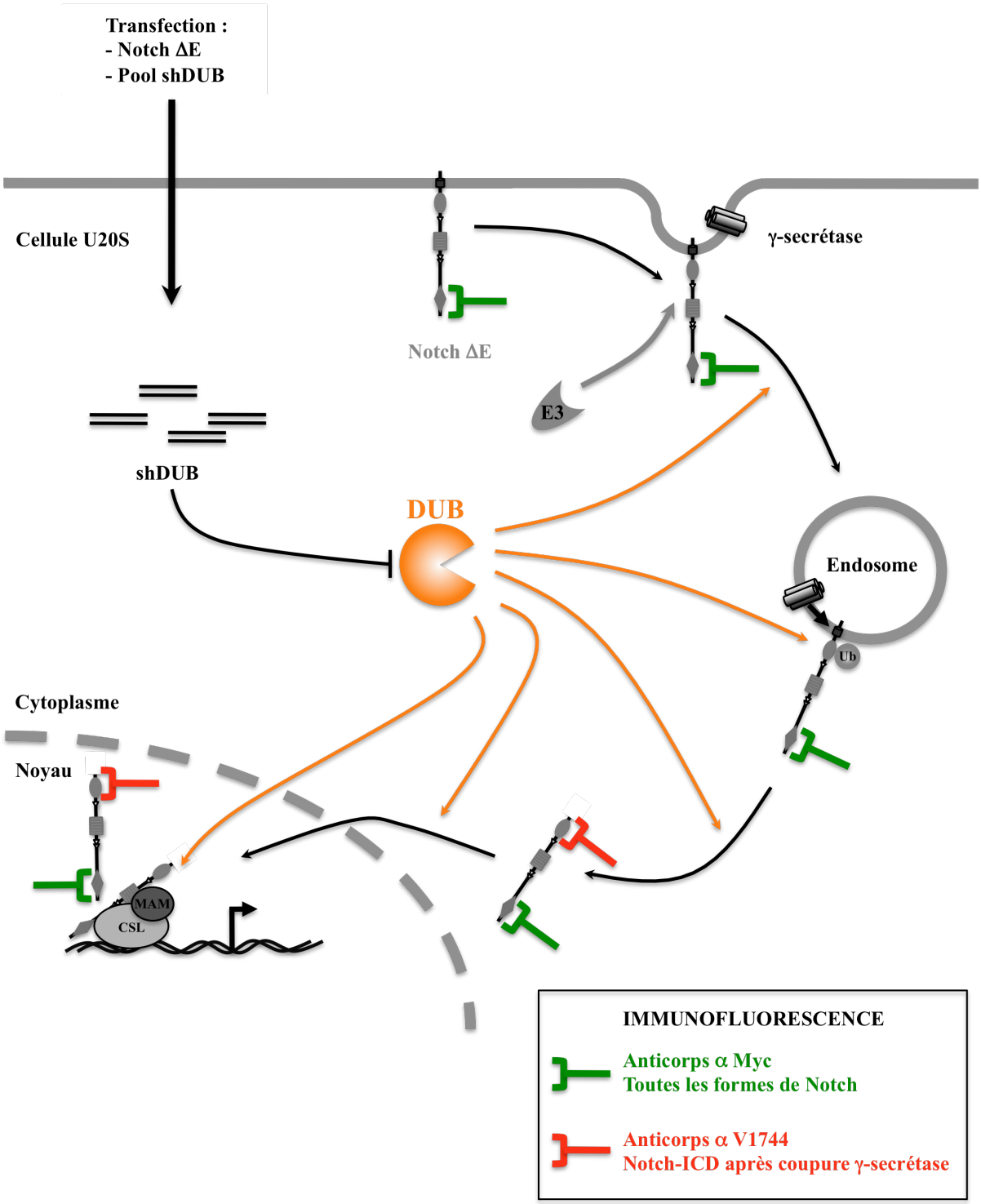


Figure 27 : Principe du crible en Immunofluorescence de la banque shDUB sur la voie d'activation de Notch

shRNAs différents ciblant l'expression d'une même DUB. Je l'appellerai par la suite la banque shDUB (Brummelkamp et al., 2002; Dirac et al., 2005; Nijman et al., 2005).

PROJET

Mon projet de thèse s'est focalisé sur deux étapes d'ubiquitination/déubiquitination du récepteur Notch et était donc composé de deux parties indépendantes.

I. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch activé et régulant la voie d'activation Notch :

L'étape concernée par cette première partie du projet est la monoubiquitination du récepteur Notch, après la coupure par la métalloprotéase ADAM, coupure dont le laboratoire a montré qu'elle est requise, avec l'endocytose du récepteur, pour le clivage de Notch par le complexe γ-secrétase et la libération de la forme NICD transcriptionnellement active (Gupta-Rossi et al., 2004).

Dans ce cas précis, nous avons fait l'hypothèse qu'une étape de déubiquitination est nécessaire à la production d'une forme NICD active dans le noyau.

Cette déubiquitination pourrait ainsi contrôler la production de NICD par le clivage γ-secrétase, la libération de NICD depuis les vésicules d'endocytose, l'entrée de NICD dans le noyau, l'interaction de NICD avec ses co-facteurs de transcription, l'activité transcriptionnelle de NICD ou encore sa stabilité.

Afin d'identifier la ou les déubiquitinases impliquées dans la déubiquitination du récepteur Notch activé, nous avons utilisé la forme Notch-ΔE que je vous ai présentée un peu plus tôt. Il s'agit d'une forme constitutivement active qui ressemble au produit de coupure par la métalloprotéase TACE, et qui est endocytosée et monoubiquitinée avant d'être clivée par le complexe γ-secrétase, produisant la forme NICD nucléaire.

Nous avons testé la banque shDUB sur cette forme Notch-ΔE dans un crible en immunofluorescence nous permettant de visualiser la production et la localisation de la forme NICD produite par le clivage γ-secrétase de Notch-ΔE, cette forme étant spécifiquement reconnue par un anticorps appelé anti-V1744.

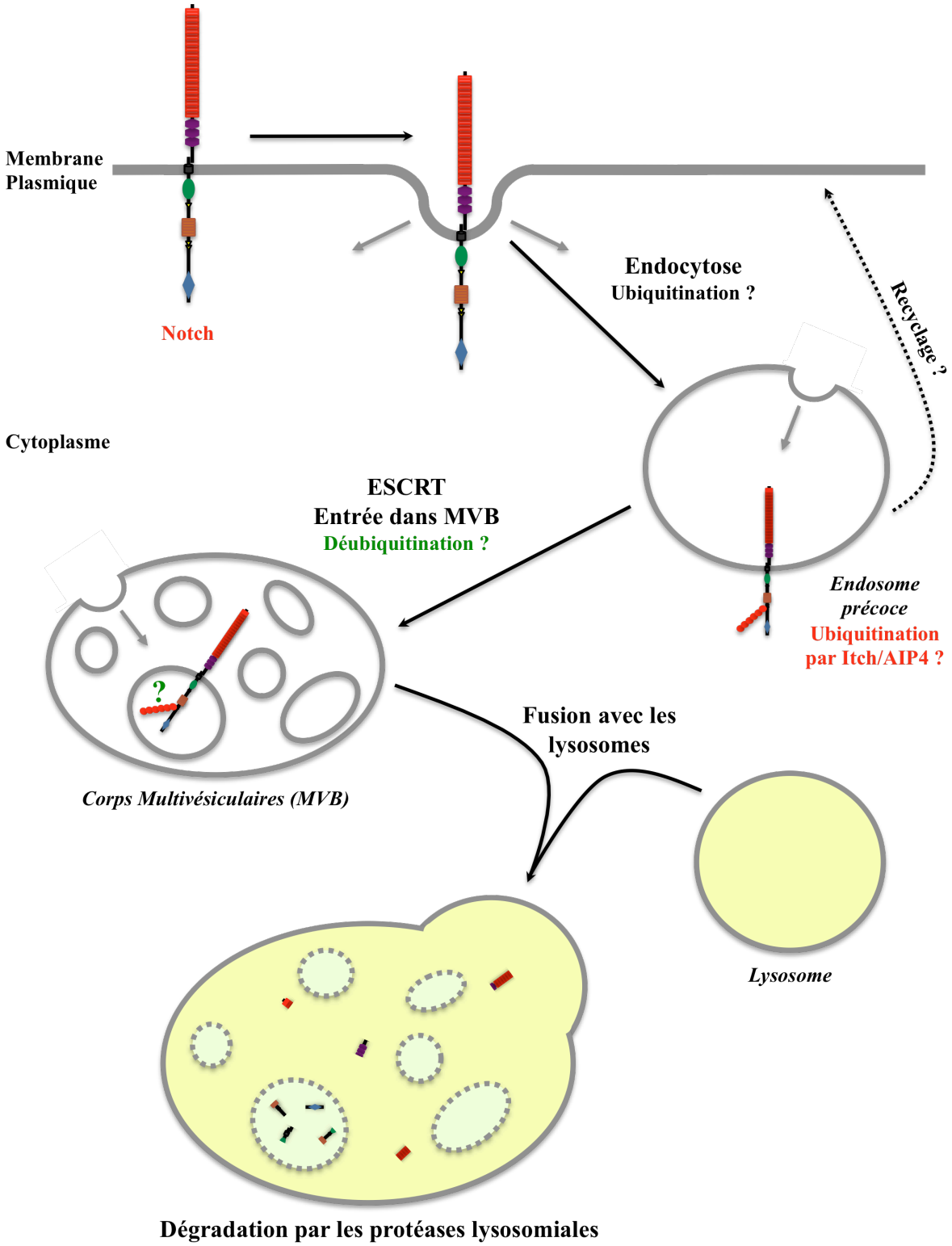


Figure 28 : Dégradation lysosomiale du récepteur Notch non activé

Les effets attendus pour l'inhibition de l'expression des DUBs potentiellement impliquées dans la voie d'activation Notch étaient une absence de production ou une délocalisation de la forme NICD produite à partir de Notch-ΔE.

II. Identification des DUBs agissant sur le récepteur Notch non activé et régulant le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé :

Cette deuxième partie du projet concerne l'étape de polyubiquitination du récepteur Notch non activé par l'E3 ubiquitine ligase Itch, après son endocytose, qui contrôle le trafic intracellulaire du récepteur vers les corps multi-vésiculaires et sa dégradation finale dans les lysosomes.

Notre hypothèse est qu'au moins une étape de déubiquitination consécutive régule le trafic intracellulaire du récepteur. Elle pourrait être nécessaire à l'entrée de Notch non activé dans les MVBs – comme c'est le cas pour la déubiquitination de l'EGFR par USP8 – mais elle pourrait également favoriser le recyclage du récepteur vers la membrane plasmique – comme c'est le cas pour la déubiquitination de l'EGFR par AMSH.
Si une ubiquitination est responsable de l'endocytose, alors une étape de déubiquitination pourrait en outre participer à l'endocytose précoce du récepteur Notch non activé.

Afin d'identifier les déubiquitinases impliquées dans le trafic du récepteur Notch non activé, nous avons établi une lignée de cellules humaines exprimant stablement une forme entière du récepteur Notch (Notch-Full Length ou Notch-FL) étiquetée dans son domaine extracellulaire par l'épitope HA.
Nous avons mis au point une expérience d' « uptake » en immunofluorescence (je n'ai pas trouvé de traduction française adaptée) en utilisant un anticorps anti-HA fluorescent pour marquer uniquement les récepteurs exprimés à la surface des cellules à un instant donné, avant de suivre par cinétique, sur cellules vivantes, le trafic de ces récepteurs Notch non activés depuis la membrane plasmique jusqu'à leur dégradation.

Nous avons finalement testé la banque shDUB sur ce crible. Selon l'étape où la déubiquitination intervient, nous attendions pour les DUBs éventuellement impliquées soit une absence d'endocytose, soit une accumulation du récepteur Notch dans des endosomes, cette accumulation pouvant résulter d'une absence de dégradation lysosomiale ou bien d'une absence de recyclage vers la membrane plasmique.

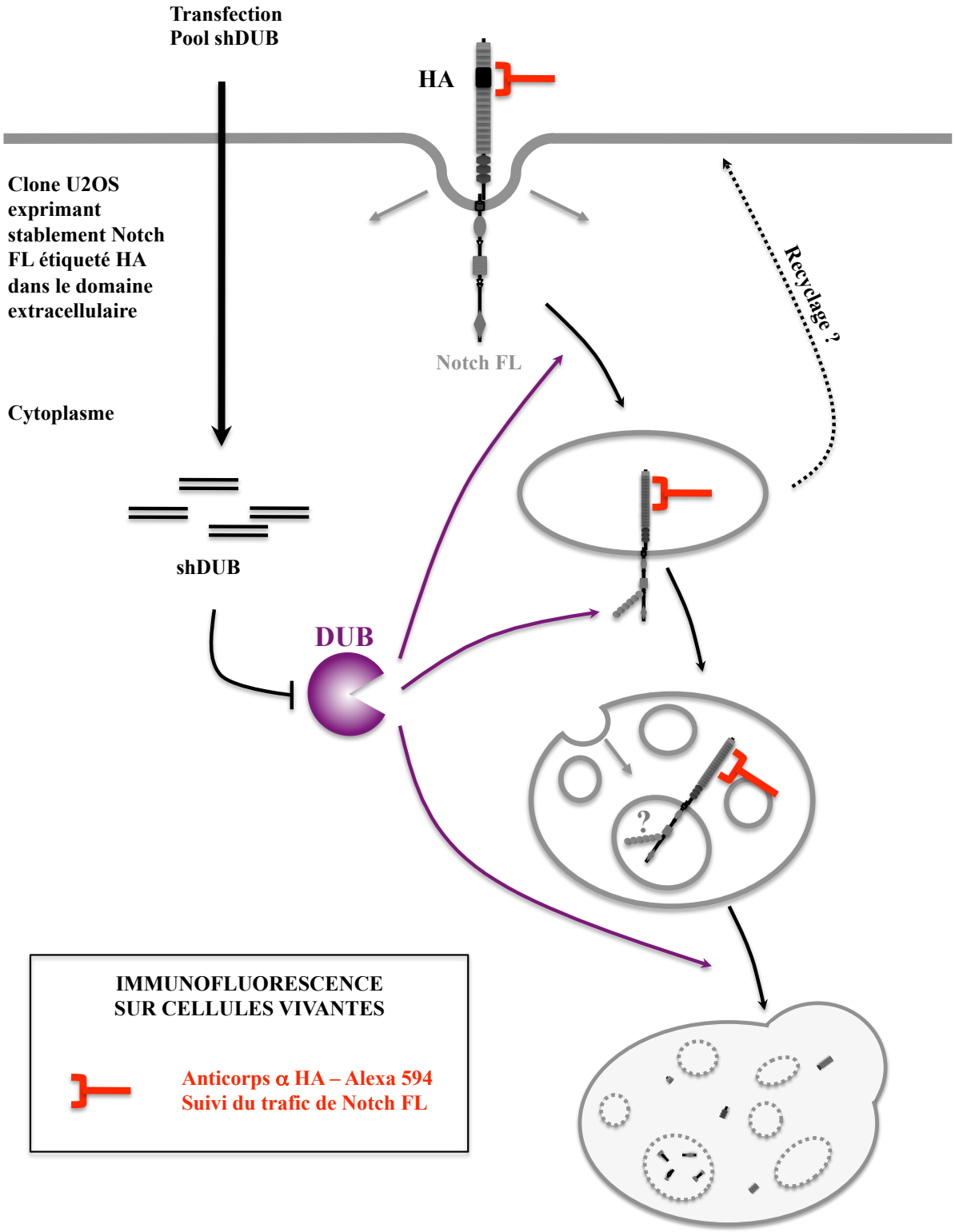


Figure 29 : Principe du crible en immunofluorescence de la banque shDUB sur le trafic intracellulaire de Notch non activé

RESULTATS

1

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH ACTIVE ET REGULANT LA VOIE D'ACTIVATION NOTCH

ARTICLE I

Le facteur d'initiation de la traduction 3f (eIF3f) est une déubiquitinase qui régule la voie d'activation de Notch

Julien Moretti, Patricia Chastagner, Stefano Gastaldello, Sara F. Heuss,

Annette M. Dirac, René Bernards, Maria G. Masucci, Alain Israël, Christel Brou

PLoS Biology, 23 novembre 2010

1

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH ACTIVE ET REGULANT LA VOIE D'ACTIVATION NOTCH

RESULTATS PUBLIES

I. Identification d'eIF3f

II. eIF3f est impliqué dans la déubiquitination du récepteur Notch activé

III. eIF3f a une activité déubiquitinase

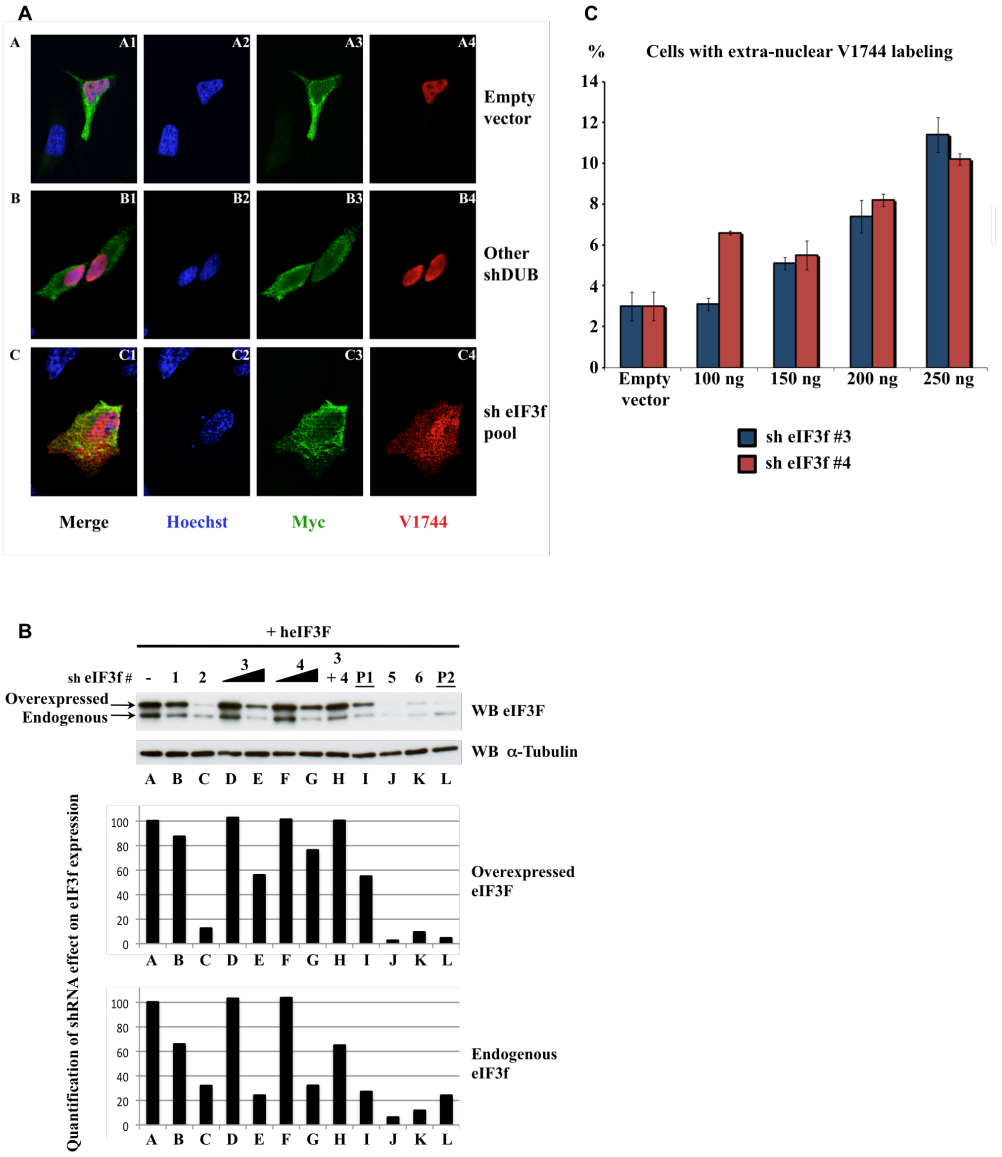
IV. eIF3f est recruté à Notch activé via l'E3 ubiquitine ligase Deltex1

V. eIF3f agit sur une forme de Notch activée avant la coupure γ-secrétase

VI. eIF3f est un régulateur positif de la voie Notch

VII. Conclusion

RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIES



Article – Figure 1 : Identification d'eIF3f

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH ACTIVE ET REGULANT LA VOIE D'ACTIVATION NOTCH

RESULTATS PUBLIES

I. Identification d'eIF3f :

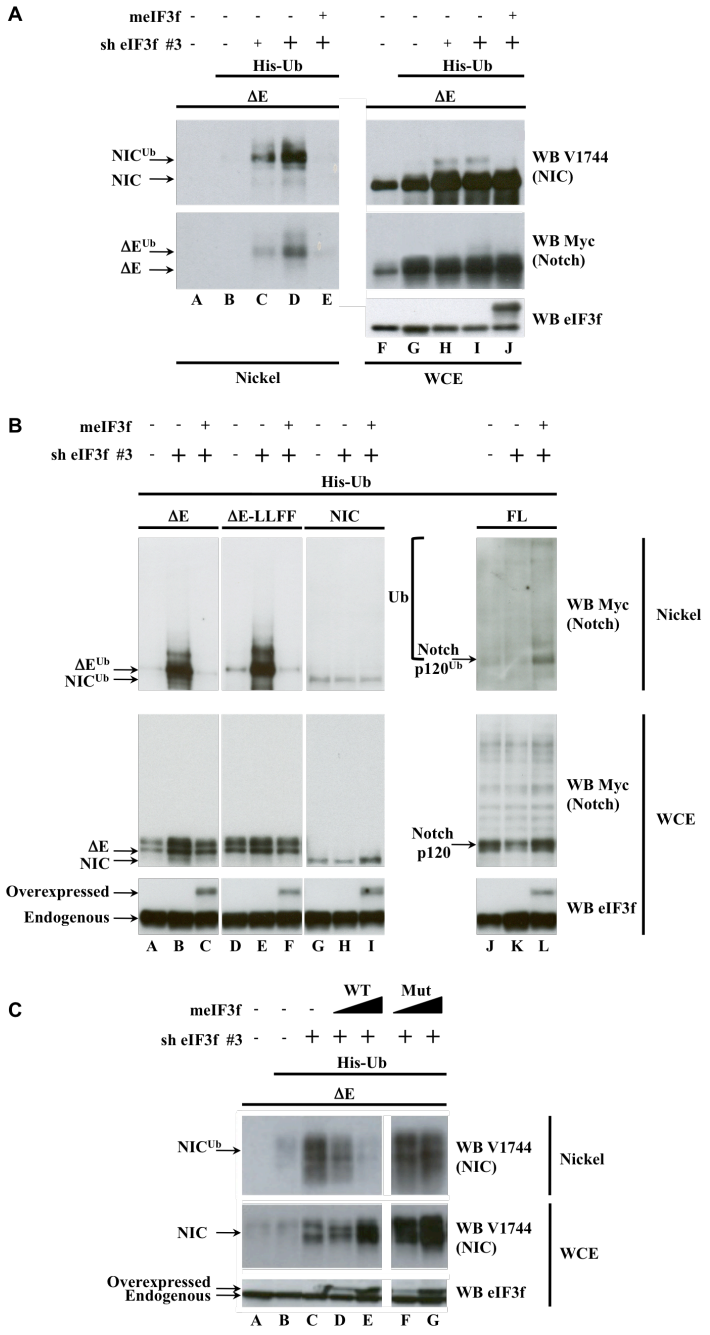
Le crible de la banque shDUB sur Notch-ΔE nous a permis d'identifier un pool de shRNA dont l'introduction dans les cellules aboutit à la production d'une forme NICD localisée partiellement hors du noyau. Ce pool de shRNA cible l'expression d'eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3 qui possède un domaine JAMM / MPN faisant d'elle une déubiquitinase putative (Article, Figure 1A).

Dans la banque, il y a en fait deux pools ciblant eIF3f. Le premier pool dont je viens de décrire l'effet sur Notch est appelé Pool1. Avec le deuxième pool ciblant eIF3f (Pool2), l'effet observé est une absence de signal Notch en immunofluorescence, comme si Notch-ΔE n'était pas exprimé, en tout cas pas détectable dans les cellules.

Afin de préciser la spécificité des shRNA, nous avons séparé les 6 shRNA différents constituant ces deux pools (deux pools de 4 shRNA chacun, mais deux shRNA sont communs aux deux pools). Nous avons alors testé en parallèle ces 6 shRNA :

- pour leur effet sur Notch-ΔE dans le même crible en immunofluorescence (Article, Figure 1B)
- pour leur efficacité à éteindre spécifiquement l'expression d'eIF3f (Article, Figure 1C)

De façon intéressante mais pas surprenante, nous avons observé une stricte corrélation entre l'efficacité des shRNA sur l'expression d'eIF3f et leur habilité à inhiber l'expression de Notch-ΔE en immunofluorescence, probablement à cause d'une conséquence sur la traduction des protéines dans les cellules. Par exemple, le Pool2 qui inhibe l'expression de Notch-ΔE a un très fort effet inhibiteur sur l'expression d'eIF3f, dont je vous rappelle qu'il participe à l'initiation de la traduction (Article, Figure 1C).



Article – Figure 2 : eIF3f est impliqué dans la déubiquitination de Notch activé

Toutefois, deux shRNA (shRNA #3 et #4), ciblant deux séquences différentes d'eIF3f et ayant un effet certes moindre mais spécifique sur l'expression d'eIF3f, mènent à une délocalisation dose-dépendante de NICD de façon semblable au Pool1 (Article, Figures 1B et 1C).

L'ensemble de ces résultats nous a mené à conclure qu'une invalidation partielle et spécifique d'eIF3f est responsable de la délocalisation de NICD produit à partir de Notch-ΔE. Ce knockdown doit toutefois être d'efficacité limitée pour observer un effet spécifique de Notch et ne pas tomber dans un effet inhibiteur de la traduction protéique plus global masquant tout autre effet.

II. eIF3f est impliqué dans la déubiquitination du récepteur Notch activé :

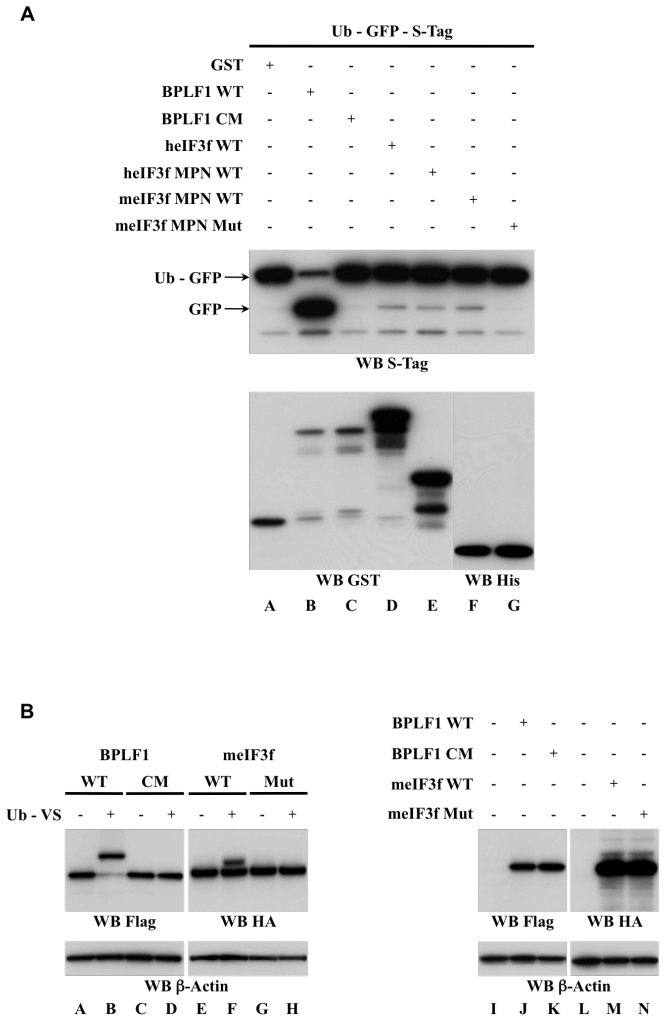
Puisque eIF3f est supposé agir comme une déubiquitinase sur Notch-ΔE, nous avons testé l'effet des shRNA #3 et #4 ciblant eIF3f sur l'ubiquitination de Notch-ΔE.

Des expériences de purification de protéines ubiquitinées en conditions dénaturantes suivies d'analyses par Western-Blot nous ont permis de montrer que ces shRNA entraînent une accumulation de formes monoubiquitinées de Notch-ΔE et de la forme NICD qui résulte de Notch-ΔE (Article, Figure2A).

De façon très intéressante, cet effet est aboli lorsqu'on exprime, en plus des shRNA, une forme murine d'eIF3f sauvage dont l'expression est insensible à ces shRNA et qui est donc capable de complémenter le manque d'eIF3f (Article, Figure2A).

Nous avons ensuite réalisé des expériences similaires sur différentes formes de Notch surexprimées :

- Notch-ΔE
- Notch-ICD
- Notch-FL (Full Length), la forme entière du récepteur
- Notch ΔE-LLFF, semblable à Notch-ΔE, qui est endocytosée, monoubiquitinée mais qui ne produit pas la forme NICD puisqu'elle est mutée au niveau du site de coupure par la γ-secrétase



Article – Figure 3 : eIF3f porte une activité déubiquitinase intrinsèque

Ces expériences ont précisé que l'accumulation de formes monoubiquitinées induite par les shRNA est spécifique des formes de Notch activées, toujours ancrées à la membrane et non clivées par la γ-secrétase : Notch-ΔE et Notch-ΔE-LLFF.
Effectivement, aucun effet n'est observé sur les niveaux d'ubiquitination de Notch-FL ou de Notch-ICD (Article, Figure2B).

Puisque eIF3f possède un domaine JAMM / MPN et qu'il semble agir sur la déubiquitination d'eIF3f, nous avons muté certains des acides aminés nécessaires au fonctionnement catalytique de ce domaine, en particulier deux résidus Histidine et deux résidus acides, générant ainsi une forme mutante appelée eIF3f Mut.

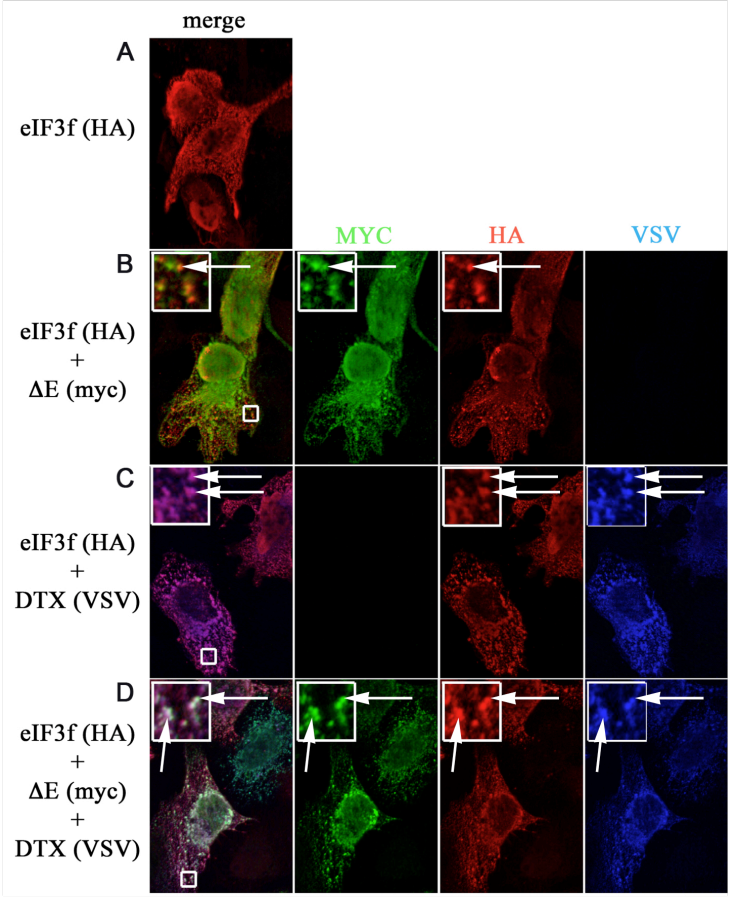
Nous avons ensuite testé en parallèle la capacité des formes eIF3F WT ou Mut à contrarier l'accumulation de formes monoubiquitinées de Notch activé.
Alors qu'eIF3f WT empêche cette accumulation de façon dose-dépendante, eIF3f Mut n'a aucun effet, montrant qu'un domaine JAMM / MPN intact est nécessaire à l'effet d'eIF3f sur l'ubiquitination de Notch activé (Article, Figure2C).

Ces données suggèrent bien qu'eIF3f peut fonctionner comme une déubiquitinase agissant via son domaine JAMM / MPN sur le récepteur Notch activé et monoubiquitiné.

III. eIF3f a une activité déubiquitinase :

eIF3f semble bien agir comme une déubiquitinase, mais aucune activité catalytique n'est connue pour cette protéine. Nous avons donc entrepris, en collaboration avec le groupe de Maria Masucci (Stockholm), de tester si eIF3f porte une activité de déubiquitination.

Une première manière de tester a été d'exprimer dans des bactéries (qui n'expriment pas de déubiquitinases) une ubiquitine fusionnée à la GFP avec des vecteurs codant pour différentes formes d'eIF3f WT ou pour le domaine MPN d'eIF3f WT ou Mut. La liaison peptidique entre l'ubiquitine et la GFP peut être clivée par une activité déubiquitinase et la GFP peut alors être libérée et observée par Western-Blot.
De façon très intéressante, nous avons observé une libération de GFP avec les formes WT d'eIF3f ou du domaine MPN, mais pas avec le domaine MPN Mut, ce qui indique qu'eIF3f est capable de cliver la liaison entre l'ubiquitine et la GFP (Article, Figure3A).



Article – Figure 4 : Colocalisation eIF3f / Deltex1 / Notch

Comme expérience complémentaire, nous avons utilisé une sonde fonctionnelle appelé Ubiquitine-Vinylsulfone, ou Ub-VS, qui est capable de se fixer de façon covalente au site actif des déubiquitinases. Nous avons transfecté des cellules eucaryotes avec des formes WT ou Mut d'eIF3f, extrait les protéines et incubé ces extraits avec de l'Ub-VS avant d'analyser les produits de réaction par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-eIF3f. De cette manière, si eIF3f a fixé l'Ub-VS, on s'attend à observer un décalage de la bande correspondante de la taille de l'Ub-VS sur le blot.
Nous avons effectivement observé ce décalage de taille attendue pour eIF3f sauvage, mais pas pour eIF3f Mut, ce qui montre que la forme sauvage d'eIF3f a bien fixé l'Ub-VS (Article, Figure3B).

Ces deux expériences montrent donc pour la première fois qu'eIF3f est dotée d'une activité déubiquitinase et que cette activité est bien portée par son domaine MPN.

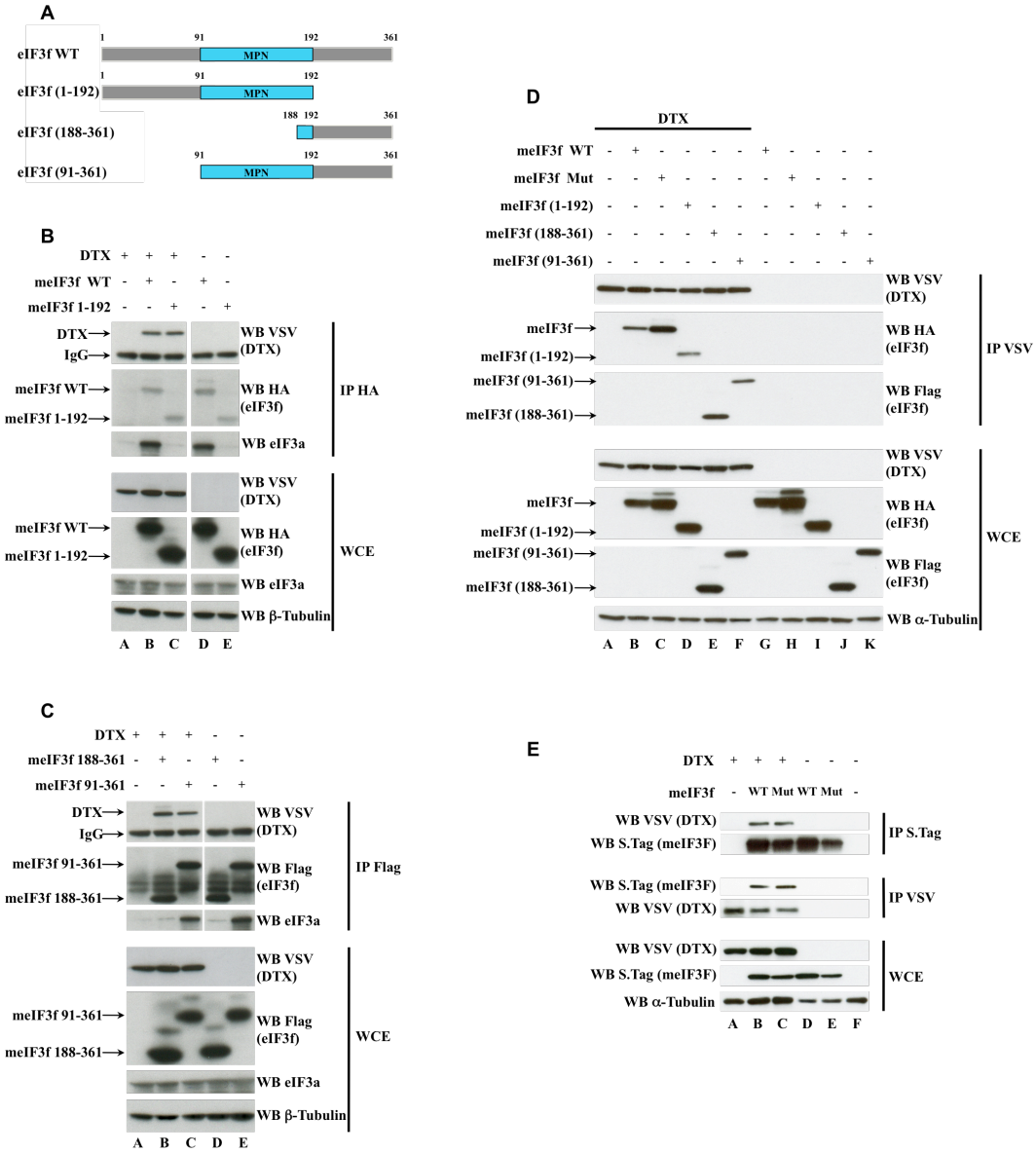
De plus, ces nouveaux résultats montrent que notre forme mutante eIF3f Mut est bien une forme catalytiquement inactive, ce qui valide les effets différents observés sur l'ubiquitination de Notch avec les formes eIF3f WT ou Mut dans les expériences précédentes.

IV. eIF3f est recruté à Notch activé via l'E3 ubiquitine ligase Deltex1 :

Nous n'avons pas pu observer d'interaction entre Notch et eIF3f. Nous avons donc testé quelques intermédiaires possibles entre les deux protéines.

En particulier, certaines DUBs, comme nous l'avons vu avec l'exemple d'USP28, interagissent avec leur substrat via une E3 ubiquitine ligase en formant un complexe DUB/E3/Substrat. Nous avons donc, dans un premier temps, testé si eIF3f est capable d'interagir avec deux E3 ubiquitine ligases connues pour être impliquées dans la voie Notch : Itch et Deltex (Cf. Introduction).

Des expériences de co-immunoprécipitation en surexpression ont permis de montrer qu'eIF3f interagit avec Deltex1, et cela dans les deux sens d'immunoprécipitation (Article, Figure 5A, B, C, D). Aucune interaction n'a été détectée avec Itch.
Nous avons vérifié ces interactions dans un contexte de niveaux d'expression plus proches des niveaux endogènes dans des cellules exprimant stablement eIF3f et/ou Deltex1 (Article, Figure 5E).



Article – Figure 5 : Interactions eIF3f / Deltex1

Il reste à savoir si l'interaction d'eIF3f avec Deltex1 permet de recruter Notch activé dans un contexte tripartite. C'est ce que nous avons testé dans des expériences de co-immunoprécipitation en exprimant eIF3f ± Deltex1 ± Notch-ΔE.

En immunoprécipitant eIF3f, nous avons observé que Notch-ΔE n'est co-immunoprécipité avec eIF3f qu'en présence de Deltex1, Deltex1 dont on vérifie par ailleurs la co-immunoprécipitation avec eIF3f à chaque fois que les deux sont coexprimés (Article, Figure 6A).

Il semble donc bien qu'il existe un complexe tripartite entre eIF3f, Deltex1 et Notch-ΔE, complexe dans lequel Deltex1 sert de pont entre les deux autres protéines.

Ces résultats étaient d'ailleurs en accord avec une franche colocalisation des trois protéines dans des vésicules intracellulaires, observée dans des expériences d'immunofluorescence (Article, Figure 4).

Nous avons ensuite répété ces expériences de co-imunoprécipitation en testant en parallèle les différentes formes de Notch présentées précédemment : Notch-ΔE, Notch-ICD, Notch-FL et Notch-ΔE-LLFF.

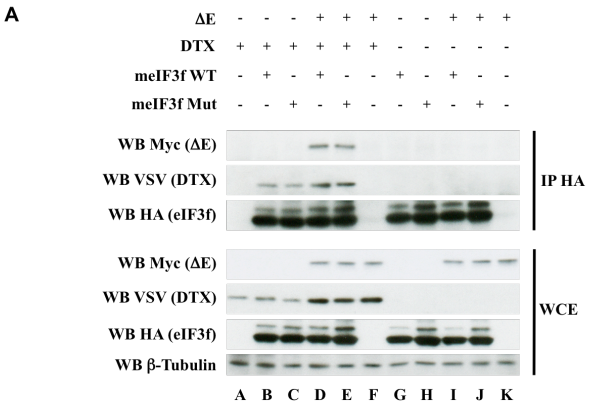
Toujours en immunoprécipitant eIF3f, nous avons observé que seules les formes Notch-ΔE et Notch-ΔE-LLFF sont co-immunoprécipitées avec eIF3f en présence de Deltex1, au contraire de Notch-FL et Notch-ICD. Notons également que la forme NICD produite à partir de Notch-DE n'est pas co-immunoprécipitée non plus (Article, Figure 6B).

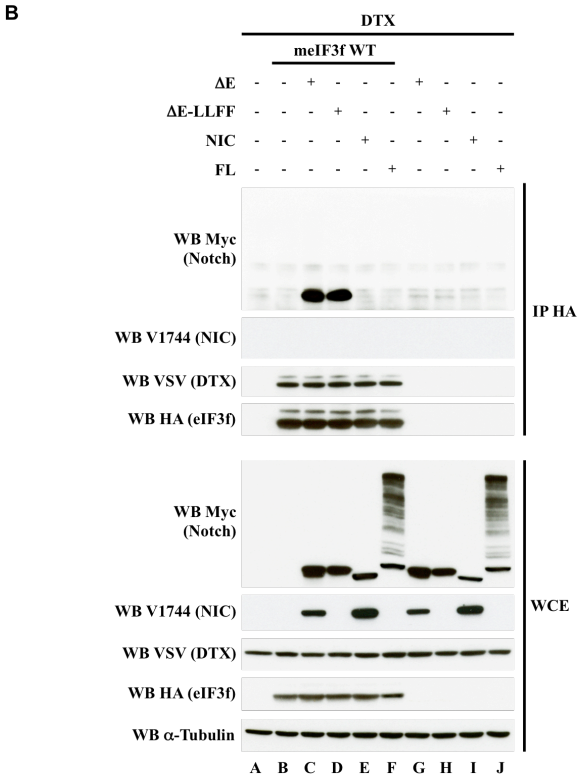
En conclusion, tout comme pour l'effet d'eIF3f sur l'ubiquitination de Notch, seules les formes de Notch activées, encore ancrées à la membrane et non clivées par la γ-secrétase semblent être recrutées dans un complexe tripartite entre eIF3f, Deltex1 et Notch.

V. eIF3f agit sur une forme de Notch activée avant la coupure γ-secrétase :

Nos derniers résultats suggèrent fortement que la cible d'eIF3f est une forme de Notch activée, ancrée à la membrane et non coupée par la γ-secrétase.

Pourtant, nous avons détecté des formes monoubiquitinées de Notch-ICD en présence des shRNA ciblant eIF3f (Article, Figure 2A), ce qui pourrait paraître paradoxal, mais qui pourrait également être la conséquence d'un clivage γ-secrétase effectué sur une forme Notch-ΔE non déubiquitinée, dans ce contexte de surexpression.





Article – Figure 6 : Interactions eIF3f / Deltex1 / Notch

De plus, lors du crible, nous avons observé avec ces mêmes shRNA la production d'une forme Notch-ICD partiellement délocalisée dans le cytoplasme. En considérant que cette forme résulte d'une coupure γ-secrétase sur Notch-ΔE monoubiquitiné, nous avons donc pensé que la présence d'une monoubiquitine résiduelle sur Notch-ICD pourrait affecter son transport nucléaire.

Nous avons cherché à mimer cette monoubiquitination en construisant une forme de Notch-ICD fusionnée à une ubiquitine N-Terminale, appelée UBIC.

Dans des expériences d'immunofluorescence, cette forme UBIC apparaît partiellement extranucléaire comparativement à la forme Notch-ICD (Article, Figure Supplémentaire S4).

De plus, son activité transcriptionnelle est très fortement réduite par rapport à celle de Notch-ICD (Article, Figure Supplémentaire S4).

Ces observations suggèrent effectivement que la présence d'une ubiquitine sur Notch-ICD altère son transport nucléaire et/ou son activité transcriptionnelle. Une des possibilités envisagées est que cette ubiquitine masque la séquence NLS de Notch-ICD la plus proche du site de monoubiquitination.

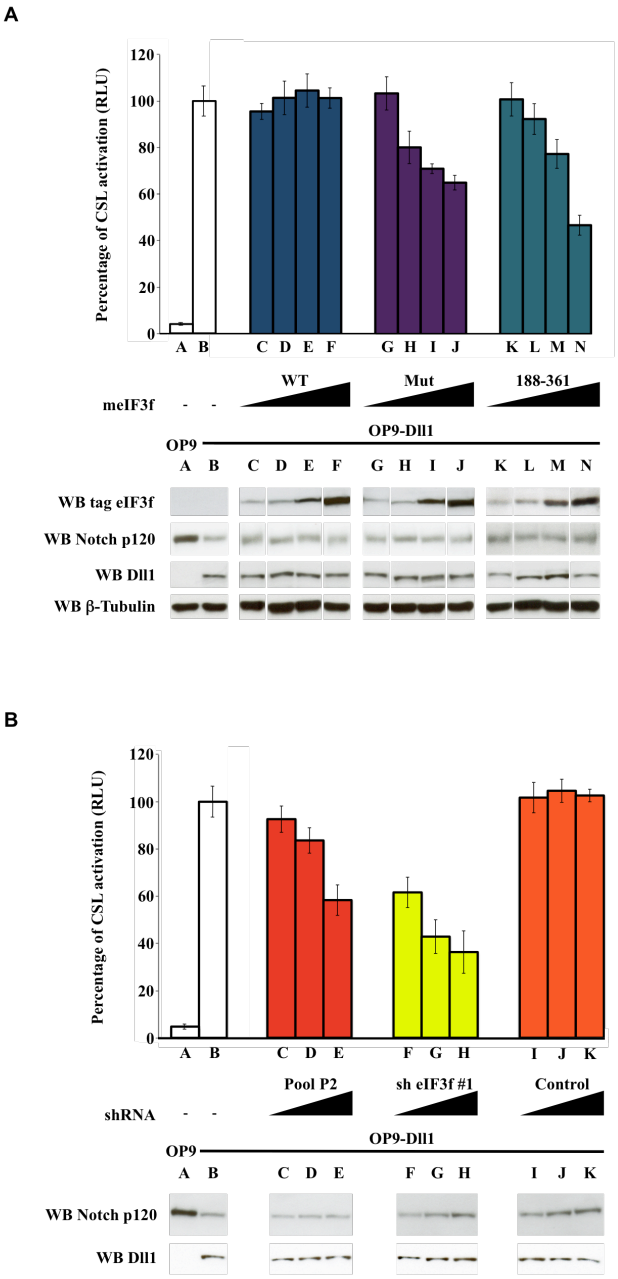
VI. eIF3f est un régulateur positif de la voie Notch :

Nous avons par la suite testé l'effet d'eIF3f dans un contexte d'activation physiologique du récepteur Notch.

Pour cela, nous avons mis au point un système de coculture entre des cellules exprimant stablement le ligand Delta-like1 et des cellules exprimant stablement le récepteur entier Notch1-FL, système permettant d'activer le récepteur Notch et de suivre son activité transcriptionnelle sur un gène rapporteur spécifique de Notch, appelé CSL-Luciferase (Article, Figure 7).

Alors que l'expression d'eIF3f dans les cellules Notch ne modifie pas l'activité transcriptionnelle de Notch, l'expression de formes d'eIF3f, dont l'une est délétée du domaine catalytique et l'autre mutée au niveau du site actif, réduit considérablement l'activation transcriptionnelle du gène rapporteur spécifique de Notch (Article, Figure 7A).

Or, ces deux formes sont capables d'interagir avec Deltex1 et donc de recruter Notch activé (Article, Figure 5).



Article – Figure 7 : eIF3f est un régulateur positif de la voie d'activation Notch

En outre, la transfection des cellules Notch avec des shRNA ciblant eIF3f (soit un pool, soit un shRNA isolé) réduit fortement l'activité transcriptionnelle de Notch, alors qu'un pool de shRNA ciblant une déubiquitinase contrôle qui possède le même domaine catalytique (AMSH) n'a aucun effet (Article, Figure 7B).

Nous avons vérifié que ces mêmes shRNA ciblant eIF3f n'ont aucun effet sur l'activité transcriptionnelle d'une forme Notch-ICD surexprimée, écartant ainsi toute possibilité d'un effet des shRNA sur un des co-facteurs transcriptionnels de Notch.

Ces deux dernières expériences montrent que l'inhibition de l'activité DUB d'eIF3f affecte la production d'une forme Notch-ICD transcriptionnellement active. eIF3f apparaît donc comme un régulateur positif de la voie de signalisation Notch.

VII. Conclusion :

L'ensemble de nos résultats propose deux nouvelles idées assez provocantes :

- la forme activée de Notch est déubiquitinée avant d'être clivée par la γ-secrétase et de produire la forme Notch-ICD
- cette étape de déubiquitination est catalysée par eIF3f, connue jusqu'alors comme une sous-unité d'un facteur d'initiation de la traduction, et dont nous montrons qu'elle possède une activité déubiquitinase intrinsèque

eIF3f est effectivement recruté à Notch activé, probablement dans les endosomes, via l'E3 ubiquitine ligase Deltex1. Il est ensuite capable de déubiquitiner Notch, ce qui permet le clivage γ-secrétase et la production d'une forme transcriptionnellement active, jouant ainsi le rôle d'un régulateur positif de la voie d'activation Notch.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIES

Nous avons cherché à savoir si eIF3f est uniquement intégré dans le complexe eIF3 ou non. Nous avons séparé des fractions protéiques de cellules non transfectées sur gradient de glycérol 15/30 %, et nous avons analysé ces fractions par Western Blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines eIF3f, eIF3a et eIF3h.

Cette analyse nous montre que ces trois protéines sont retrouvées dans les mêmes fractions dont la taille correspond à celle du complexe eIF3, de façon attendue.

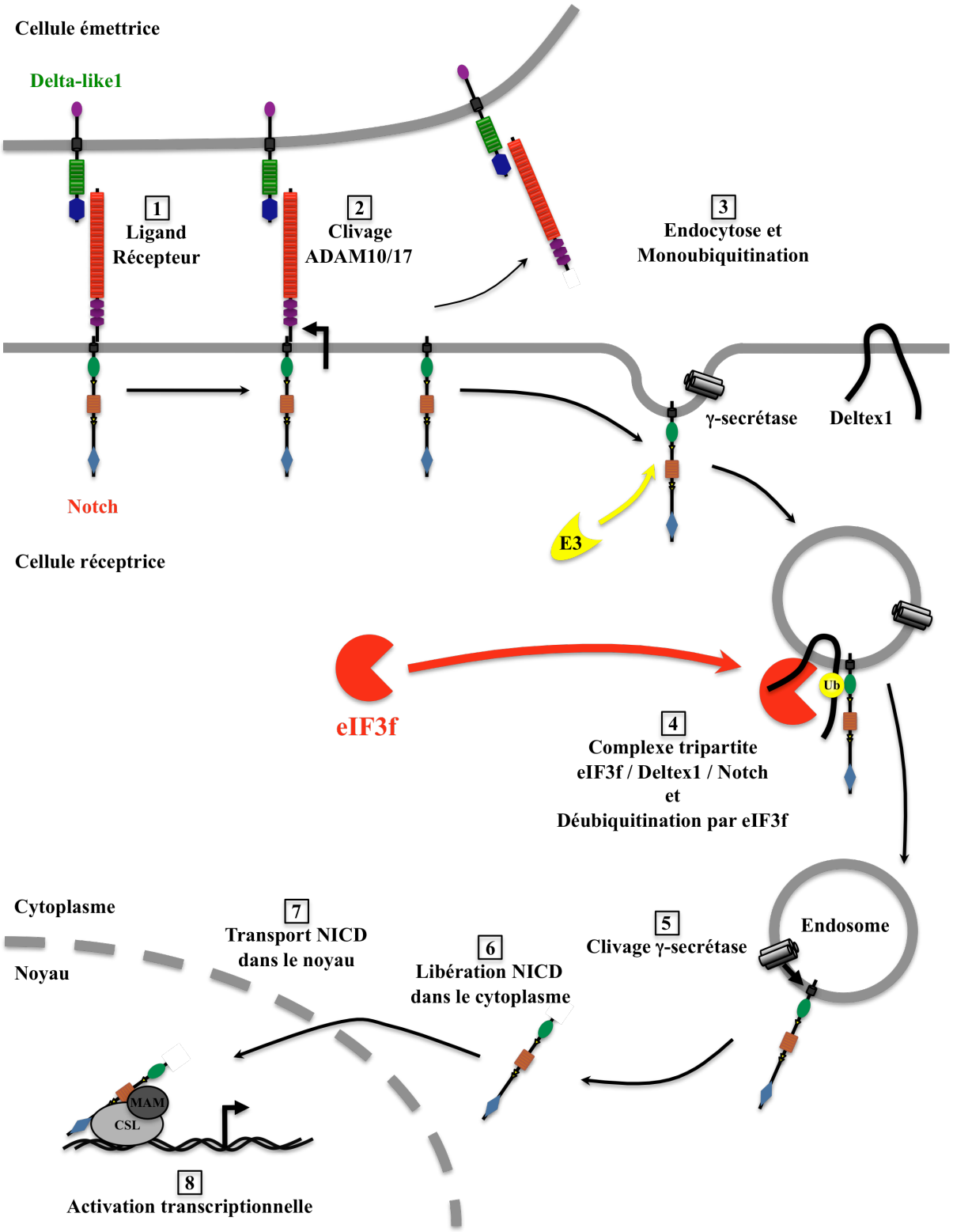
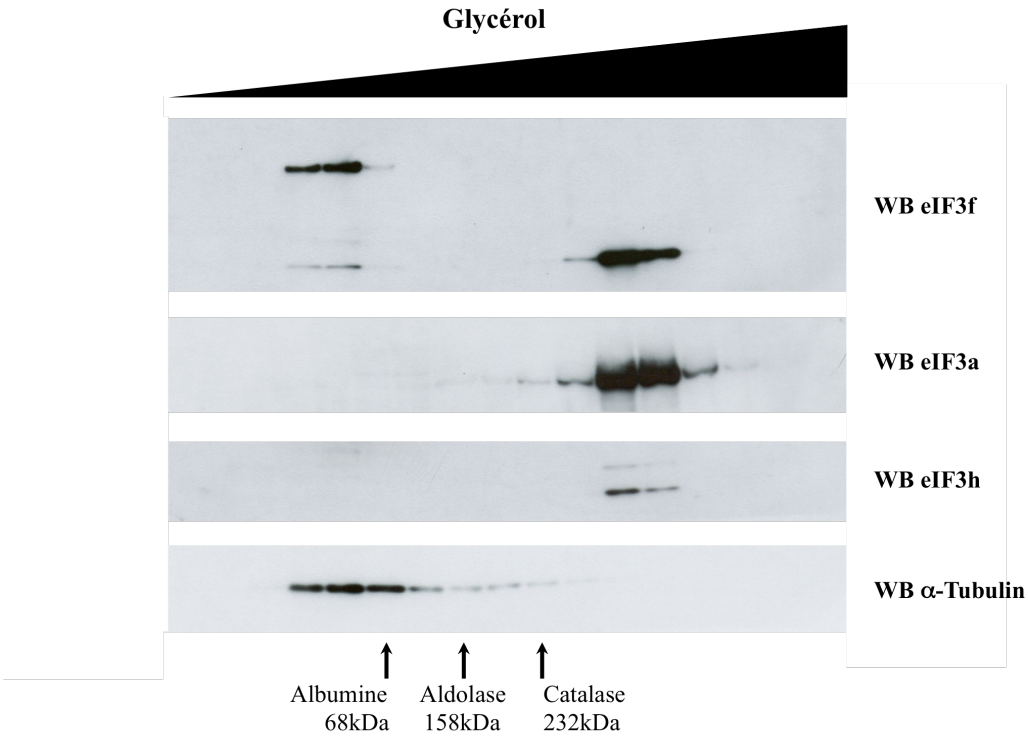


Figure 30 : Rôle d'eIF3f dans la voie Notch : déubiquitination du récepteur Notch activé

Toutefois, et de manière très intéressante, sur ces trois protéines testées, eIF3f est la seule que l'on retrouve également dans des fractions protéiques de bien plus petites tailles, à 50kDa environ, soit la taille d'eIF3f (Article, Figure Complémentaire).

Cela indique qu'un pool d'eIF3f libre, en dehors du complexe eIF3, existe dans les cellules, ouvrant de nouvelles questions sur les fonctions de ce pool libre et son éventuelle implication dans la déubiquitination de Notch activé, sujets que je développerai dans la partie discussion.



Article – Figure Complémentaire : eIF3f endogène est retrouvé à l'intérieur et hors du complexe eIF3

The Translation Initiation Factor 3f (eIF3f) Exhibits a Deubiquitinase Activity Regulating Notch Activation

Julien Moretti[1], Patricia Chastagner[1], Stefano Gastaldello[3], Sara F. Heuss[1], Annette M. Dirac[2], René Bernards[2], Maria G. Masucci[3], Alain Israël[1], Christel Brou[1]*

1 Institut Pasteur, Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire and CNRS URA 2582, rue du Dr. Roux, Paris, France, **2** Division of Molecular Carcinogenesis and Center for Biomedical Genetics, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands, **3** Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract

Activation of the mammalian Notch receptor after ligand binding relies on a succession of events including metalloprotease-cleavage, endocytosis, monoubiquitination, and eventually processing by the gamma-secretase, giving rise to a soluble, transcriptionally active molecule. The Notch1 receptor was proposed to be monoubiquitinated before its gamma-secretase cleavage; the targeted lysine has been localized to its submembrane domain. Investigating how this step might be regulated by a deubiquitinase (DUB) activity will provide new insight for understanding Notch receptor activation and downstream signaling. An immunofluorescence-based screening of an shRNA library allowed us to identify eIF3f, previously known as one of the subunits of the translation initiation factor eIF3, as a DUB targeting the activated Notch receptor. We show that eIF3f has an intrinsic DUB activity. Knocking down eIF3f leads to an accumulation of monoubiquitinated forms of activated Notch, an effect counteracted by murine WT eIF3f but not by a catalytically inactive mutant. We also show that eIF3f is recruited to activated Notch on endocytic vesicles by the putative E3 ubiquitin ligase Deltex1, which serves as a bridging factor. Finally, catalytically inactive forms of eIF3f as well as shRNAs targeting eIF3f repress Notch activation in a coculture assay, showing that eIF3f is a new positive regulator of the Notch pathway. Our results support two new and provocative conclusions: (1) The activated form of Notch needs to be deubiquitinated before being processed by the gamma-secretase activity and entering the nucleus, where it fulfills its transcriptional function. (2) The enzyme accounting for this deubiquitinase activity is eIF3f, known so far as a translation initiation factor. These data improve our knowledge of Notch signaling but also open new avenues of research on the Zomes family and the translation initiation factors.

Citation: Moretti J, Chastagner P, Gastaldello S, Heuss SF, Dirac AM, et al. (2010) The Translation Initiation Factor 3f (eIF3f) Exhibits a Deubiquitinase Activity Regulating Notch Activation. PLoS Biol 8(11): e1000545. doi:10.1371/journal.pbio.1000545

Academic Editor: Norbert Perrimon, Harvard Medical School, Howard Hughes Medical Institute, United States of America

Received April 22, 2010; **Accepted** October 7, 2010; **Published** November 23, 2010

Copyright: © 2010 Moretti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported in part by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (#4840) to CB, and from the European Community (# 018683, NoE RUBICON) to AI. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: CSN5, COP9 Signalosome subunit 5; Dll1, Delta-like1; DTX, Deltex1; DUB, deubiquitinating enzyme; eIF3f, eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f; FL, full-length; JAMM, Jab/MPN domain-associated metallopeptidase; meIF3f, murine form of eIF3f; MPN, MPR1-PAD1-N-terminal; NIC, intracellular portion of Notch; PCI, Proteasome-COP9 signalosome-initiation factor 3; PIC, preinitiation complex; Ub-GFP, GFP fused to ubiquitin; Ub-VS, Ubiquitin Vinyl Sulfone

* E-mail: christel.brou@pasteur.fr

Introduction

Notch signaling relies on two consecutive cleavages of the receptor after binding of its ligand expressed by a neighboring cell. These two processing steps successively performed by a protease of the ADAM family and by the γ-secretase complex can occur only if the activated receptors on one side, the ligands on the other side, undergo post-translational modifications and trafficking. Some of these complex events begin to be elucidated [1–7]. They essentially depend on ubiquitination events affecting the ligand and/or the receptor, and probably regulating sorting and trafficking of the activated versus non-activated molecules. Eventually, after proteolytic release the intracellular portion of Notch (hereafter named NIC) enters the nucleus, where it functions as a transcriptional co-activator of Notch target genes.

In mammals, the Notch1 receptor was proposed to be monoubiquitinated before its γ-secretase cleavage; the targeted lysine has been localized to its submembrane domain [8]. Investigating how this monoubiquitination is regulated may be crucial for understanding Notch receptor activation and downstream signaling. Ubiquitination is a reversible process, and deubiquitinating enzymes (DUBs) remove the ubiquitin moieties from ubiquitinated substrates, thus allowing a tight control of these modifications [9]. A potential deubiquitination step could either affect NIC production by γ-secretase, NIC release from the endocytic vesicles, NIC entry into the nucleus, NIC interaction with its transcriptional cofactors, NIC transcriptional activity, or NIC stability. With the aim of identifying a DUB involved in Notch signaling, we established a screening strategy using shRNA vectors targeting the putative and known DUBs of the human genome [10]. Here, we report the identification of eIF3f as a DUB targeting the activated Notch receptor and positively regulating Notch signaling.

eIF3f (for eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f) is one of the 13 subunits (named eIF3a-m) of the translation

Author Summary

The highly conserved signaling pathway involving the transmembrane receptor Notch is essential for development, and misregulation of this pathway is linked to many diseases. We previously proposed that the Notch1 receptor is monoubiquitinated during its activation. With the aim of identifying a deubiquinating enzyme that could regulate Notch activation, we demonstrated that eIF3f, known previously as part of the multiprotein translation initiation factor eIF3 complex, harbors an enzymatic activity that acts on Notch. The activated form of Notch is able to interact with eIF3f only in the presence of the E3 ubiquitin ligase Deltex, and Notch needs to be deubiquitinated before it can be cleared and its intracellular domain can enter the nucleus and fulfill its transcriptional function. Our results further decipher the molecular mechanisms of Notch signaling activation, showing that ubiquitination and deubiquitination events are required. Additionally, we show that beyond acting as a translation initiation factor, eIF3f fulfills other functions and has an intrinsic enzymatic activity.

initiation factor eIF3. eIF3 stimulates many steps of the translation initiation pathway, including assembly of the eIF2-GTP/met-tRNA complex to the 40S ribosome to form the 43S preinitiation complex (PIC), mRNA recruitment to the 43S PIC complex, impairment of the 40S ribosome to join the 60S prematurely, and scanning the mRNA for AUG recognition [11]. eIF3 has no known enzymatic activity so far, but it has an intriguing degree of homology with two other complexes whose functions appear unrelated: the COP9 signalosome and the 19S proteasome lid. All three complexes, forming the Zomes family, consist of subunits with either PCI (Proteasome-COP9 signalosome-initiation factor 3 domain) or MPN (for MPR1-PAD1-N-terminal domain) signature domains and share a common 6PCI +2 MPN domain stoechiometry. The mammalian eIF3 also has an additional five non-PCI-MPN subunits [12]. The MPN domain of CSN5 (COP9 Signalosome subunit 5) harbors a metalloprotease motif referred to as the Jab/MPN domain-associated metallopeptidase (JAMM) motif and regulates the activity of E3 ubiquitin ligases by deneddylation of the cullin component. On the other hand, a JAMM-containing subunit associated with the 19S proteasome lid (Rpn11, [13]) also harbors DUB activity, accounting for substrates deubiquitination before they enter the proteasome channel. Interestingly, eIF3f contains a JAMM domain, making it a putative DUB [14,15]. We show here that it harbors a DUB activity acting on Notch signaling.

Results

Identification of eIF3f

In order to identify DUBs involved in the Notch signaling pathway, we set up an immunofluorescence screen. We used Notch ΔE [16], a mutant form of Notch deleted of most of its extracellular domain. ΔE mimics the ADAM-cleavage product and therefore represents a constitutively active form, which is monoubiquitinated and endocytosed [8] before being cleaved by γ-secretase to liberate NIC [17]. We made use of the V1744 antibody to monitor the production and the localization of NIC, whereas anti-myc antibody detected all Notch products. U2OS cells were co-transfected with vectors encoding ΔE and with each individual pool of a shRNA library targeting the 91 known or putative DUBs encoded by the human genome (called shDUB library; see Table 1) [10]. With ΔE alone (Figure 1A, Panel A), we observed a membrane and endomembrane-localized myc labeling corresponding to the unprocessed Notch ΔE, but also a nuclear myc labeling (A3) corresponding to NIC, co-stained with the V1744 antibody (A4). The same pattern was observed with almost every shRNA pool of the library (exemplified in Panels B1–4), whereas four pools abolished ΔE expression (those targeting eIF3h, PRP8 and USP54, and Pool 2, see below). However, with an shRNA pool targeting eIF3f (panels C), we observed a partial extra-nuclear V1744 labeling (C4), as well as an increase in the average proportion of extranuclear/nuclear myc staining (see Figure S1, Dose 1). This suggests that NIC production and localization was affected when eIF3f was knocked down.

The shRNA library actually contained two pools (each containing four shRNA-encoding plasmids) targeting eIF3f: Pool 1, whose effects are shown in Figure 1A, and Pool 2, in the presence of which no ΔE-positive signal could be detected by immunofluorescence (unpublished data). We isolated the eight shRNAs from these pools (six different shRNAs in total) and tested them individually for their efficiency in knocking down eIF3f: Pool 1 (P1) contains shRNA #1 to #4, Pool 2 (P2) contains shRNA #1, #2, #5, and #6. HEK293T cells were transfected with each of these shRNAs and the levels of endogenous or overexpressed human HA-tagged eIF3f were analyzed by Western blotting. Anti-α-Tubulin was used as a loading control (Figure 1B, bottom panel), since this protein is very stable and reflects the total protein content in transfected and non-transfected cells. shRNAs #1 and #2 significantly affected the level of endogenous and transfected eIF3f (Figure 1B, Lanes B and C and quantification under the lanes), similar to the Pool 1 (P1, Lane I). The additional shRNAs from Pool 2 (#5 and #6 in Lanes J and K) and Pool 2 itself (P2, Lane L) almost completely abolished eIF3f expression in this assay. The effect of each of these shRNAs on eIF3f protein level was correlated with its ability to inhibit ΔE expression in immunofluorescence experiments and probably reflects eIF3f requirement for translation (Figure S1). Indeed shRNAs #3 and #4, which exhibited a minor effect on the expression of the eIF3f protein (Figure 1B, Lanes D–G), were the most efficient in inducing extranuclear V1744 labeling in a dose-dependent manner (Figure 1C). Nevertheless, further increasing the dose of these two shRNAs separately or co-transfecting them resulted in an effect on eIF3f expression (Figure 1B, Lanes E, G, and H) and an extinction of the ΔE signal in immunofluorescence (Figure S1 and unpublished data). Since the shRNAs that affect Notch signaling target different sequences of eI3Ff, and since this effect is complemented by transfection of wt eIF3f (see below), we can exclude an off-target effect of these shRNAs. Taken together, these results suggest that a specific but mild knockdown of eIF3f is responsible for the altered Notch localization observed in Figure 1.

eIF3f Is Involved in the Deubiquitination of Activated Notch

We next tested the effect of eIF3f on the ubiquitination of activated Notch. HEK293T cells were transfected with vectors encoding ΔE and a 6xHis-tagged Ubiquitin. We added increasing amounts of shRNA #3, without reaching the doses used in Figure 1B, Lane E, in the presence or not of a murine form of eIF3f (meIF3f). The murine eIF3f cDNA exhibits a three base pair change in the sequence targeted by shRNA #3 and is therefore refractory to its effect. Proteins were extracted in denaturing conditions and ubiquitinated proteins were purified on Nickel-charged beads. Finally, whole cell extracts and ubiquitinated products were analyzed by Western blot to quantify the levels of ubiquitinated Notch (Figure 2A). Transfection of shRNA #3 led

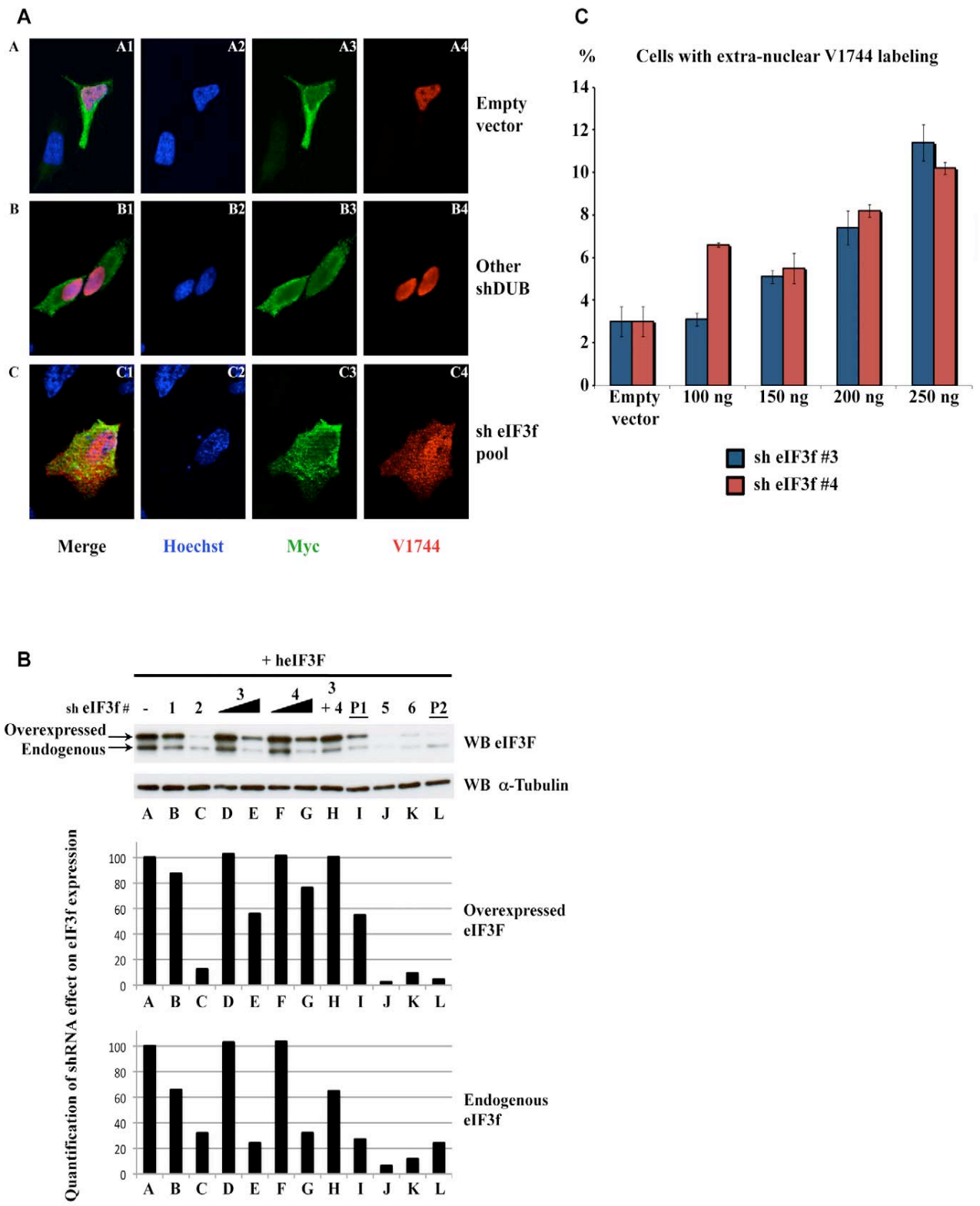


Figure 1. Identification of eIF3f. (A) Immunofluorescence screen. U2OS cells were transfected with a ΔE expressing vector together with each pool of shRNAs targeting the human DUBs. Notch products were detected with anti-myc antibody, or with V1744, to specifically detect NIC (secondary antibodies were coupled with Alexa-488 and Alexa-555, respectively). Nuclei were stained with Hoechst. (B) Western blot analysis of endogenous eIF3f and transfected HA-tagged eIF3f in the presence of the pooled (P1 and P2) or the individual shRNA vectors (#1 to #4 from P1, #5 and #6 from P2) targeting eIF3f. α-tubulin loading control is shown. Under the lanes is shown the quantification of the eIF3f bands (overexpressed or endogenous as indicated), performed with the Quantity One program (Biorad). (C) Quantification of the effect of two shRNA vectors targeting eIF3f (#3 and #4, respectively, in blue and red) on the extranuclear localization of NIC. Transfection and immunofluorescence were performed as in (A). 400 Notch-positive cells were counted for each point and the percentage of cells showing extranuclear V1744 labeling is shown. Error bars represent the SEM of duplicate experiments.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g001

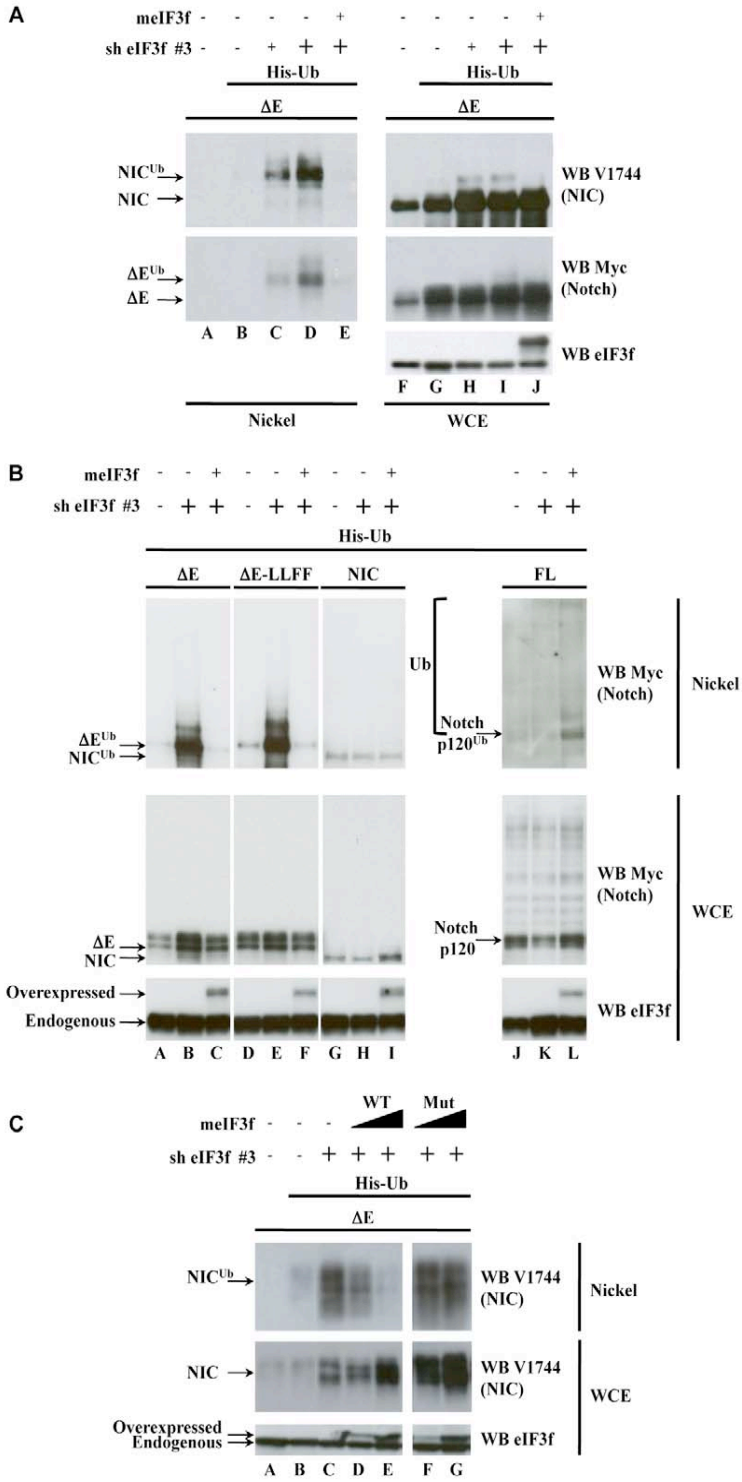


Figure 2. eIF3f is involved in the deubiquitination of activated Notch. HEK293T cells were transfected with: (A) ΔE, His-ubiquitin, two increasing doses of eIF3f shRNA #3 (indicated by + and +, respectively), and meIF3f as indicated; (B) ΔE, ΔE-LLFF, NIC or Notch full length (FL), His-ubiquitin, the larger dose of eIF3f shRNA used in (A) (+), and meIF3f as indicated; (C) ΔE, His-ubiquitin, shRNA #3, and two doses of meIF3f WT or Mut as indicated by a filled triangle. In all panels, cells were lysed under denaturing conditions and subjected to Nickel purification. Ni-purified material or WCE (5% of the total lysates) were resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the antibodies indicated on the right of the panels. Notch p120 designates the membrane-anchored form of non-activated full-length Notch, resulting from furin cleavage. Overexpressed meIF3f has a higher apparent molecular weight than the endogenous human eIF3f because of its HA tags. White lines indicate that intervening lanes have been spliced out.

doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g002

to a dose-dependent accumulation of monoubiquitinated ΔE (ΔE^{Ub}) and of monoubiquitinated NIC (NIC^{Ub}) (Lanes C, D compared to B), whereas the levels of Notch in the extracts remained stable (Lanes G to J). The same effect was observed using shRNA #4 (unpublished data). Interestingly, overexpression of meIF3f abolished the effect of shRNA #3 and accumulation of ubiquitinated Notch could no longer be seen (compare Lanes E to D). The ubiquitination levels of other forms of Notch were also analyzed in the presence or absence of shRNA #3 (Figure 2B): the membrane-anchored ΔE-LLFF (Lanes D–F), which undergoes the same processes as ΔE (i.e., monoubiquitination and endocytosis) but which is mutated in the γ-secretase cleavage site and consequently does not generate NIC [18]; the nuclear Notch (NIC, Lanes G–I) and the non-activated full-length Notch (FL, Lanes J–L). The only forms whose ubiquitination was affected by shRNA #3 and/or meIF3f were those corresponding to activated and still membrane-anchored forms of Notch, namely ΔE and ΔE-LLFF. We also tested as controls NDFIP2 (a transmembrane protein located in the endosomal compartment [19]) and Deltex1 (an E3 ubiquitin ligase genetically identified as involved in Notch signaling). These two proteins showed no change in ubiquitination in the presence of shRNA #3 or overexpressed meIF3f (Figure S2 and unpublished data). These results suggest that eIF3f is specifically involved in an ubiquitination/deubiquitination process targeting activated Notch.

The eIF3f protein contains an MPN domain, also found in some DUBs of the JAMM family, such as AMSH, Rpn11, and CSN5 [20–23]. However, the position of the amino acids constituting the catalytic site of these DUBs is not strictly conserved in eIF3f, although histidines and acidic residues can still be found and can possibly form a signature of metalloprotease ($HEX_2HX_2GX_2H$). We mutated six amino acids of eIF3f, including two histidines and two acidic residues of the putative catalytic site. We then tested in parallel WT meIF3f and this putative catalytic mutant (meIF3f Mut) (Figure 2C). Whereas WT meIF3f was able to prevent shRNA #3–induced NIC^{Ub} accumulation in a dose-dependent manner (Lanes D, E compared to C), meIF3f Mut was not, although it was expressed at similar levels (Lanes D to G). This shows that meIF3f indeed complements the effect of shRNA #3 and that an intact MPN domain of eIF3f is necessary for its effect on monoubiquitination of activated Notch. Taken together, these results strongly suggest that eIF3f could act as a DUB targeting activated Notch.

eIF3f Harbors a DUB Activity

In order to test whether eIF3f exhibits a deubiquitinase activity, we first used a functional in bacteria assay using GFP fused to ubiquitin (Ub-GFP) [24]. The peptide bond between ubiquitin and GFP can be cleaved by ubiquitin- or UbL-deconjugase activities, which are absent from the bacterial genome. Bl21 bacteria were transfected with plasmids encoding GST alone, GST-fused to human WT eIF3f or WT MPN domain, or His-tagged murine eIF3f WT or mutant MPN domain (Mut), together with a vector encoding Ub-GFP fused to an S-Tag at its C-terminus (Ub-GFP-S-Tag) (Figure 3A). As control DUB, we used BPLF1 WT (an EBV DUB of the cysteine-protease family [24]) and its catalytically inactive form BPLF1 CM. After induction of protein expression, the bacteria were lysed and cleavage of Ub-GFP was assessed in Western blot by the appearance of free GFP-S-Tag using anti-S-Tag antibody (Figure 3A, upper panel). Anti-GST or anti-His antibodies were used to verify protein expression (Figure 3A, bottom panel). As expected, we observed released GFP with BPLF1 WT but not its CM mutant (compare Lanes A–C). Interestingly, we also detected protease activity with heIF3f WT, heIF3f MPN WT, and meIF3f MPN WT (Lanes D, E, and F, respectively) but not with the mutant meIF3f MPN Mut (Lane G).

To further investigate whether eIF3f could act as an ubiquitin-specific protease, we performed an in vitro assay using Ubiquitin Vinyl Sulfone (Ub-VS), a functional probe that covalently binds the active site of DUBs and consequently inhibits DUB catalytic activity (Figure 3B). HeLa cells were transfected with vectors encoding HA-tagged meIF3f, either WT or Mut. Flag-tagged BPLF1 WT and CM were used as controls. A portion of the corresponding whole cell extracts was incubated in vitro with Ub-VS. Total extracts incubated or not with Ub-VS were finally analyzed by Western blot using anti-HA and anti-Flag antibodies to monitor the covalent binding of Ub-VS to the DUBs (Figure 3B, Lanes A to H) and to check protein expression (Lanes I to N), respectively. We observed a partial upshift corresponding to the size of the Ub-VS probe with meIF3f WT (Lane F compared to E) and with BPLF1 WT (Lane B compared to A), indicating that both are able to bind Ub-VS. In contrast, we did not observe any shift with meIF3f Mut (Lane H compared to G) nor BPLF1 CM (Lane D compared to C), showing that they are indeed unable to bind Ub-VS. We obtained the same results when the DUBs were expressed in bacteria (unpublished data).

Taken together, these results show that eIF3f exhibits a deubiquitinase activity, carried by its MPN domain. Moreover it confirms that the mutant we generated (Mut) by replacing six amino acids of the metalloprotease-like sequence of eIF3f is a catalytically inactive form of eIF3f.

Deltex1 Is an Intermediate between eIF3f and Notch

In order to identify the site of action and the target of eIF3f in the Notch activation cascade, we first overexpressed ΔE and murine eIF3f in U2OS cells. We observed by immunofluorescence a low frequency of vesicular colocalization of the two proteins (Figure 4, Panels A and B). As eIF3f might require a cofactor or target an intermediate protein to regulate Notch ubiquitination, we tested several components of the Notch signaling pathway that could be associated with trafficking. Some DUBs are known to be recruited to their substrate indirectly via an E3 ubiquitin ligase [25,26], so we particularly focused on the E3 ubiquitin ligases of the Notch pathway known to be associated with the endocytic machinery: Itch/AIP4 and Deltex1 (hereafter designated as DTX) ([27] and therein). In contrast to Itch/AIP4, DTX significantly colocalized with eIF3f when both proteins were coexpressed (Figure 4, Panel C). In addition, the presence of DTX strikingly increased the colocalization of ΔE and eIF3f, the three proteins being associated to the same vesicles (Figure 4, Panel D). These results suggest that DTX could recruit eIF3f to activated Notch.

To verify this hypothesis, we performed co-immunoprecipitation experiments in HEK293T cells transfected with vectors encoding VSV-tagged DTX, Flag-Itch/AIP4, and HA- or Flag-tagged forms of eIF3f (schematized in Figure 5A). We pulled down eIF3f and analyzed the whole cell extracts and the immunoprecipitates by Western blot (Figure 5B, 5C and Figure S3). DTX co-immunoprecipitated with eIF3f WT and (1–192), but also with eIF3f (188–361) and (91–361) (compare Lanes B, C to D, E in Figure 5B and 5C). No co-immunoprecipitation was detected with Itch/AIP4 (Figure S3). As a control, the endogenous eIF3a, another subunit of the eIF3 complex, only co-immunoprecipitated with eIF3f WT and (91–361) (Panels B, C). This observation suggests that DTX is able to physically interact with eIF3f and that the domain(s) necessary for this interaction is different from the domain necessary for eIF3f to incorporate the eIF3 complex. We then performed the reverse experiment by pulling down VSV-tagged DTX and could detect the various forms of eIF3f

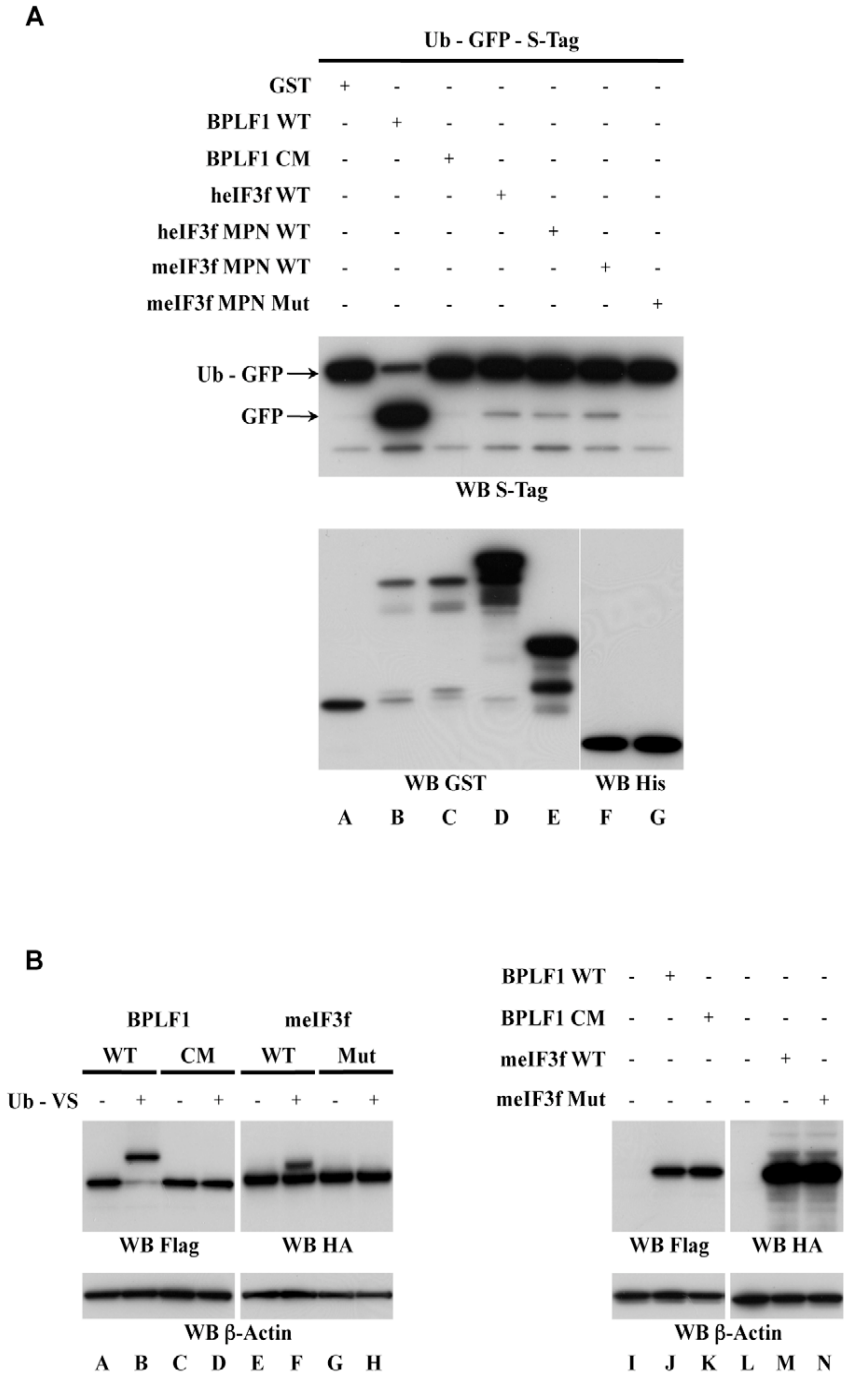


Figure 3. eiF3f DUB activity. (A) eIF3f exhibits a DUB activity in a bacterial Ub-GFP assay. Bl21 bacteria were transformed with Ub-GFP-S-Tag plasmid and either GST-fusions or His-fusions as indicated. After protein expression induction, they were lysed by sonication. WCE were analyzed by Western blot using the antibodies indicated under each panel to visualize GFP release from Ub-GFP (WB S-Tag) and to control protein expression (WB GST and His). The GFP product resulting from the DUB activity and the Ub-GFP substrate are indicated by the arrows. (B) eIF3f binds ubiquitin in an eukaryotic Ub-VS assay. HeLa cells were transfected with expression vectors encoding BPLF1 WT or CM (Lanes A–D, J, K), or meIF3f WT or Mut (Lanes E–H, M, N) as indicated. 36 h after transfection, 10 μg of WCE were incubated (or not) with Ub-VS probe (Lanes A to H). Samples were finally analyzed by Western blot as indicated under the panels to monitor Ub-VS binding (Lanes A to H) and to check protein expression (Lanes I to N). β-Actin was used as a loading control. The apparent molecular weights of BPLF1 and meIF3f are 32 kDa and 50 kDa, respectively.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g003

coimmunoprecipitating with DTX (Figure 5D): WT or Mut eIF3f (Lanes B, C) as well as the deletion mutants (Lanes D–F). To confirm these results under conditions where the proteins are not overexpressed, we established by retroviral transduction murine cell lines expressing low amounts of VSV-DTX and S-tagged forms of WT eIF3f or of a mutant of the active site (HDI to AAA). eIF3f or DTX was immunoprecipitated first and their association was confirmed in both cases (Figure 5E).

We then performed co-immunoprecipitations in HEK293T in the presence of Notch ΔE (Figure 6A). While DTX co-

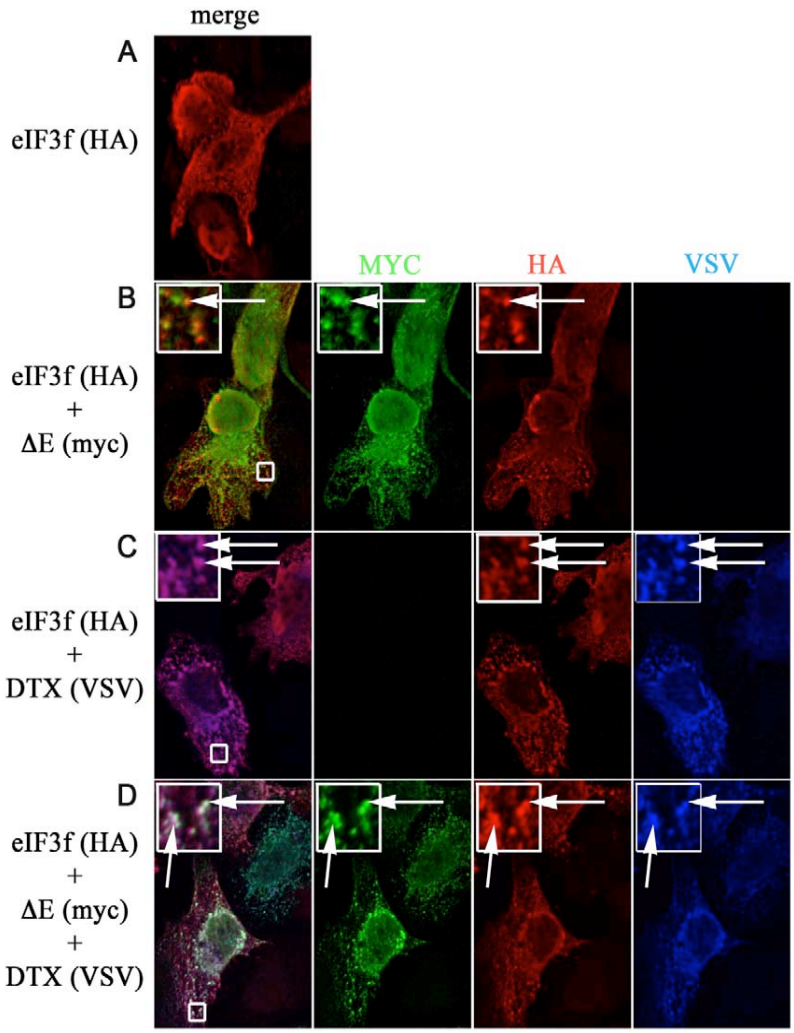


Figure 4. Colocalization of eIF3f, DTX, and ΔE. U2OS cells were transfected with expression vectors as indicated on the left. eIF3f, DTX, and ΔE were detected using mouse anti-HA, rabbit anti-VSV, and goat anti-myc, respectively (with CY3-coupled, Alexa 488-coupled, and Alexa 647-coupled secondary antibodies, respectively). Insets represent enlargements (4-fold) of the boxed region, arrows indicate colocalizations, and left panels are merges of the three adjacent panels.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g004

immunoprecipitated with WT eIF3f but also with meIF3f Mut (Figure 6A, Lanes B–E), ΔE did not (Lanes I and J), unless DTX was cotransfected (Lanes D and E). This strongly suggests that a tripartite interaction occurs between activated Notch, DTX, and eIF3f, DTX being required for the Notch-eIF3f interaction. In addition, we verified that neither DTX nor ΔE could be co-immunoprecipitated with eIF3f from cell extracts that were transfected separately and mixed (unpublished data). We then repeated these experiments using other forms of Notch: ΔE-LLFF, NIC, or the non-activated full-length Notch (FL) (Figure 6B). Only two forms could co-immunoprecipitate with eIF3f in the presence of DTX: ΔE and ΔE-LLFF (Lanes C and D). No signal was detected with FL and NIC (Lanes E and F) even with a longer exposure. It is of note that NIC produced from ΔE (Lanes C, G) and detected by the V1744 antibody was not co-immunoprecipitated with eIF3f either. These results show that the tripartite interaction between Notch, DTX, and eIF3f occurs preferentially with activated, membrane-associated, but γ-secretase unprocessed, forms of Notch.

Our results (Figures 2 and 6) suggest that the target of eIF3f is preferentially a γ-secretase unprocessed form of activated Notch. The fact that we could detect ubiquitinated NIC in the presence of shRNAs #3 and #4 (Figure 2A) might thus appear paradoxical, however it might be the consequence of γ-secretase cleavage of non-deubiquitinated Notch ΔE. We also observed that shRNAs #3 and #4 led to a partially extranuclear localization of NIC (Figure 1C). This suggests that NIC carrying residual mono-ubiquitination could be impaired in nuclear translocation. In order to test this possibility, we tried to mimic NIC^{Ub} by attaching an ubiquitin to the N-terminus of NIC (UBIC construct). Given that ΔE, and consequently any putative non-deubiquitinated NIC, has been shown to be monoubiquitinated on K1749, we used a K1749R mutant of NIC (NIC(KR)) on which no ubiquitin can be conjugated. In addition, the attached ubiquitin was mutated on the internal Lysine residues 29 and 48 to impair polyubiquitination and also on the 2 C-terminal glycines to prevent proteolysis by a DUB enzyme [28]. U2OS cells were transfected with NIC, NIC(KR), or the new construct UBIC. We observed by immunofluorescence that NIC or NIC(KR) were mostly nuclear (96% in average), whereas UBIC was partially retained in the cytoplasm (18% see Figure S4, Panel A). In addition, we monitored the transcriptional activity of these three forms by cotransfecting U2OS cells with increasing doses of expression

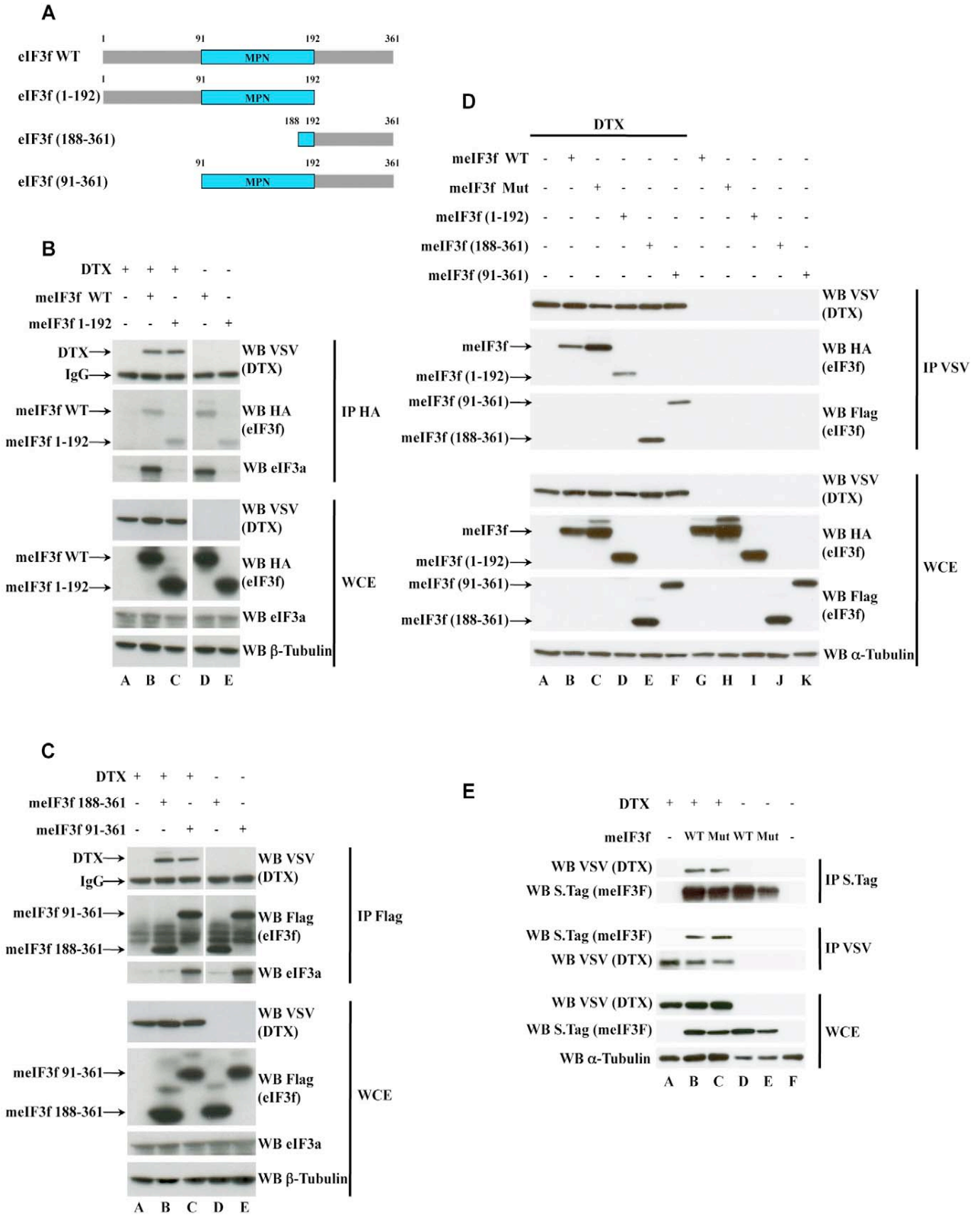


Figure 5. Interactions of eIF3f and DTX. (A) Schematic representation of murine eIF3f deletion mutants. The conserved MPN domain is depicted in blue; amino acid coordinates are indicated. (B) HEK293T cells were cotransfected with vectors encoding HA-tagged eIF3f WT or (1–192), and VSV-tagged DTX. Whole cell extracts (WCE, 5% of the lysates) were either directly blotted with antibodies indicated on the right of the lanes or immunoprecipitated first with anti-HA antibody. β-tubulin was used as a loading control. (C) HEK293T cells were cotransfected with vectors encoding Flag-tagged eIF3f (188–361) or (91–361), and VSV-tagged DTX. WCE (5%) were either directly blotted with antibodies indicated on the right of the lanes or immunoprecipitated first with anti-Flag antibody. β-tubulin was used as a loading control. (D) HEK293T cells were cotransfected with vectors encoding the various eIF3f mutants and VSV-DTX. WCE were immunoprecipitated with anti-VSV antibody, and the precipitates were eluted with VSV peptide before being loaded on SDS gels. The eluted material and the WCE (5% of the lysates) were analyzed by Western blotting with antibodies

indicated on the right of the lanes. α-tubulin was used as a loading control. (E) Stable cell lines derived form MEFs by retroviral transduction of VSV-DTX or S-tagged eIF3f (either WT or active site mutant) were lysed and subjected to parallel immunoprecipitations with VSV and S-tag antibodies as indicated. The VSV- or Laemmli-eluted material (for VSV and S-tag IPs, respectively) and the WCE (5% of the lysates) were analyzed by Western blotting with antibodies indicated on the right of the lanes. α-tubulin was used as a loading control. White lines indicate that intervening lanes have been spliced out.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g005

vectors together with a Notch-reporter gene (CSL-luciferase, [29,30]) and an internal control reporter (pRL-TK). As shown in Figure S4, Panel B, UBIC is significantly less active than NIC or NIC(KR), although it is expressed at a comparable level (see Western blot in Figure S4, Panel B bottom). One possibility to explain the localization and the drop in transcriptional activity of UBIC is that the ubiquitin moiety partially prevents access to the NLS of NIC.

eIF3f Is a Positive Regulator of Notch Signaling

In order to test whether eIF3f could act on Notch signaling under more physiological conditions, we performed a coculture assay using a CSL reporter strategy. U2OS cells stably expressing Notch FL were transfected with a CSL-Luciferase Notch reporter and increasing doses of meIF3f WT, meIF3f Mut, or meIF3f (188–361). pRL-TK vector, encoding Renilla luciferase under the control of the Notch-insensitive thymidine kinase promoter, was also cotransfected as an internal control. These cells were then cocultured with OP9 cells stably expressing or not the Notch ligand Delta-like1 (Dll1) [31], and relative luciferase activity was finally determined by normalizing CSL-firefly luciferase with renilla luciferase. In parallel cell extracts from the same transfections were analyzed by Western blot (Figure 7A, bottom). In the presence of Dll1, the relative luciferase activity of the CSL reporter gene increased 20-fold (Figure 7A, Lanes A, B), showing that Notch was indeed activated by Dll1. While the presence of meIF3F WT did not modify Dll1-dependent Notch activation (Lanes C to F), meIF3F Mut and meIF3f (188–361) repressed it in a dose-dependent manner, respectively, reaching 35% and 54% of reduction (Lanes G–J and K–N, respectively). Thus, meIF3f Mut and meIF3f (188–361) inhibit Notch transcriptional activity and behave as dominant-negative forms of eIF3f, in accordance with the fact that both lack an intact catalytic site but are able to bind DTX and Notch. We also tested the effect of shRNAs targeting endogenous eIF3f in this assay. As represented in Figure 7B, Dll1-induced Notch stimulation was inhibited in the presence of increasing doses of either P2 (Lanes C–E) or shRNA #1 (Lanes F–H), although Notch1 overall level remained constant (see bottom of Figure 7B). In contrast, a shRNA pool targeting AMSH, another DUB of the JAMM family, had no effect on Notch activation (Lanes I–K). Furthermore, the same shRNAs have no effect on NIC-mediated transcriptional activation (Figure S5), excluding any effect of the shRNAs on Notch-associated transcription factors. Therefore, inhibition of eIF3f DUB activity impairs the production of a transcriptionally active NIC in a dose-dependent manner.

All together, our results indicate that eIF3f, after being recruited to vesicular Notch via DTX, could act as a DUB on a monoubiquitinated but not γ-secretase processed form of Notch, thus positively modulating Notch signaling activity.

Discussion

A DUB Acting during Notch Activation

With the aim of identifying a DUB that could regulate Notch activation, we reached two new and provocative conclusions: the activated form of Notch needs to be deubiquitinated to enter the nucleus and fulfill its transcriptional function, and the DUB accounting for this activity is eIF3f, known so far as a translation initiation factor. When reconstituting a Notch activation system by co-culturing Notch1 receptor- and Dll1 ligand-expressing cells, we observed that Notch-dependent transcriptional activation of a reporter gene was specifically affected when expressing mutant forms of eIF3f where the active site was mutated or when eIF3f was partially knocked down. Therefore eIF3f acts as a positive regulator of Notch signaling, independently of its function in translation (see below). We have also demonstrated that a monoubiquitinated form of Notch ΔE was stabilized when eIF3f was slightly knocked down. This effect was accompanied by the appearance of a mono-ubiquitinated form of NIC, which is probably excluded from the nucleus. Therefore we conclude that Notch deubiquitination is necessary for its full activity in the nucleus.

We have not formally identified the form of Notch that is the substrate of the DUB activity. We cannot exclude that it is a monoubiquitinated non-nuclear NIC, resulting from γ-secretase cleavage of activated Notch. Such a form has never been detected before, in contrast to the nuclear polyubiquitinated NIC, which appears subsequently under the action of the E3 ubiquitin ligase Sel10 [32,33]. An artificial construct mimicking to a certain extent the monoubiquitinated NIC (UBIC) was partially retained in the cytoplasm and as a consequence was transcriptionally less active than NIC. This suggests that the ubiquitin moiety could mask the proximal NLS [34] and impair interaction with importins. Nevertheless three observations argue against the possibility of NIC being the natural substrate of eIF3f: first, NIC was not obviously associated with endosomes when it was excluded from the nucleus in the presence of eIF3f shRNA. As eIF3f colocalizes with Notch to endosomal structures, its target should be retained to these structures (Figure 4). Second, NIC produced from ΔE was not detected as coimmunoprecipitating neither with eIF3f nor with its mutant in the presence of DTX, which would have probably been the case if it were the DUB substrate (Figure 6). And third, the effect of shRNAs targeting eIF3f were only detected on activated but still membrane-anchored forms of Notch, including one unable to produce NIC (ΔE-LLFF, see Figure 2). Therefore we favor the hypothesis that the eIF3f substrate is the activated, monoubiquitinated but still membrane-anchored Notch (mimicked by ΔE in transfection experiments, see [8]). The presence of monoubiquitinated NIC when eIF3f activity is impaired would be due to a partial activity of γ-secretase on non-deubiquitinated ΔE.

Finally, our results show that eIF3f is recruited to Deltex1 and Notch ΔE-containing vesicles in transfected cells. They can thus form a tripartite complex where DTX serves as a bridging factor between Notch and eIF3f. Deltex1 belongs to the RING family of E3 ubiquitin ligase, however its target in Notch signaling remains to be determined [35]. It localizes to the endocytic pathway [27], interacts with Notch, and thus could serve as a scaffolding protein enabling Notch trafficking and modifications, and eventually Notch signaling.

eIF3f Is a DUB

Our results suggest that eIF3f, known so far as a component of a translation initiation factor complex, is itself able to act as a DUB

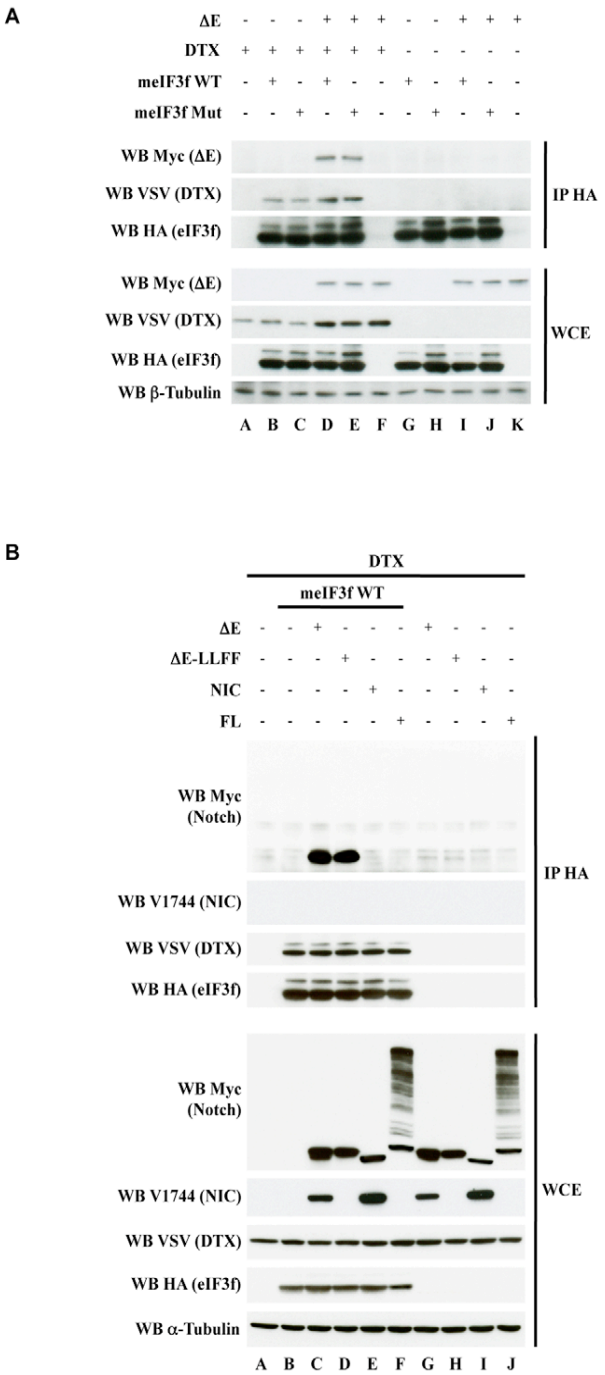


Figure 6. Interaction of eIF3f and activated Notch in the presence of DTX. HEK293T cells were cotransfected with vectors encoding HA-tagged forms of eIF3f (either WT or Mut in Panel A), VSV-DTX, and myc-tagged Notch constructs (ΔE, ΔE-LLFF, NIC, or FL in Panel B) as indicated above the lanes. Immunoprecipitations were performed with anti-HA antibody. In both panels, immunoprecipitates and WCE (10% of the lysates) were analyzed by Western blot as indicated. α- or β-tubulin were used as loading controls.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g006

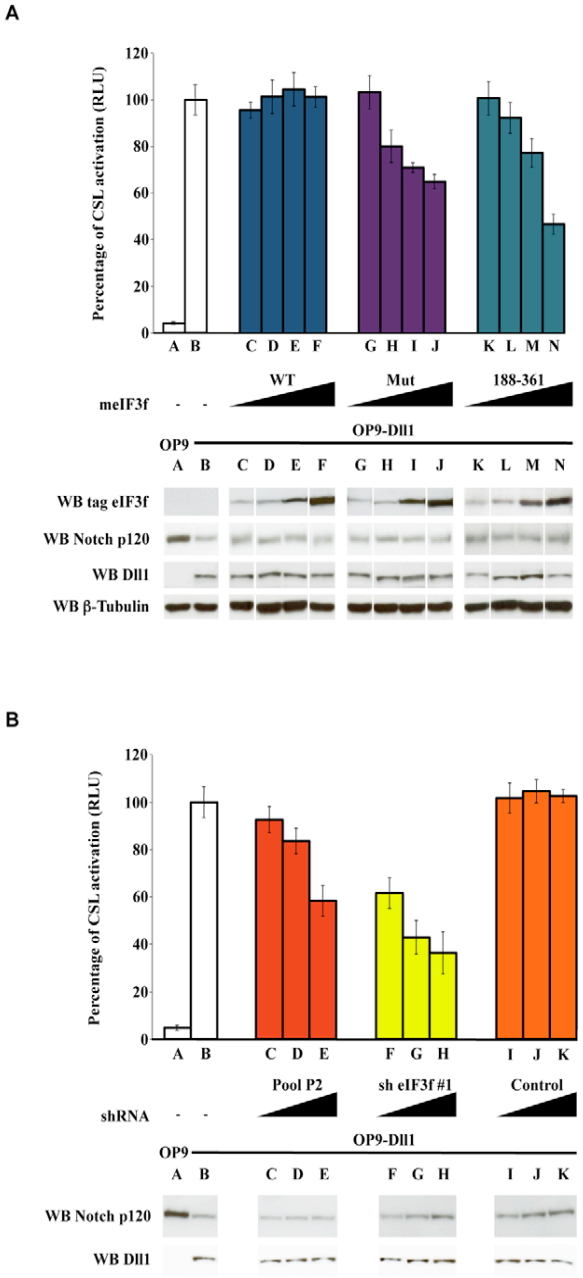


Figure 7. Notch-Delta coculture assay. Modulation of the Notch reporter activity (CSL-luciferase) in Notch1-expressing cells cocultured with Dll1-expressing cells (Lanes B–N) or control cells (Lane A). The Notch-expressing cells were first transfected with both CSL-firefly luciferase (Notch reporter) and TK-renilla luciferase (internal control) 24 h before coculture. The CSL-reporter activation corresponds to the ratio between Firefly and Renilla luciferase activities. The relative luciferase activity in the presence of Dll1-expressing cells (Lane B) was defined as 100%. Error bars represent the SEM of triplicate experiments. (A) Effects of increasing doses of expression vectors encoding eIF3f WT (Lanes C–F), Mut (G–J), or (188–361) (K–N) in reporter cells are shown as indicated. Expression levels of eIF3f, Notch, and Dll1 were confirmed by Western blot analysis, using β-tubulin as a loading control. White lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (B) shRNAs targeting eIF3f decrease Notch signaling. Increasing doses of eIF3f shRNA P2 (C–E), shRNA #1 (F–H), or a control pool targeting AMSH (I–K) were transfected into the Notch-expressing cells as above. Bottom shows the Western blot analysis of a representative experiment.
doi:10.1371/journal.pbio.1000545.g007

during Notch activation. In contrast to a mutant of the active site, a WT form of eIF3f is able to complement the inhibition of activity mediated by eIF3f shRNAs and to restore deubiquitination of Notch ΔE. However we cannot completely rule out the possibility that another DUB, associated with eIF3f, could account for Notch

deubiquitination. This is, for example, the case for CSN5, which, in addition to its own isopeptidase activity, is associated with USP15, both being required for proper processing of polyubiquitinated substrates bound to p97/VCP [36–38]. Such a putative eIF3f-associated DUB, the knockdown of which would not affect protein translation, should have been identified during the screen. Moreover, eIF3h, the other MPN-containing subunit of eIF3 associated with eIF3f [12], has neither histidines nor acidic residues that could confer a DUB activity. The fact that eIF3f was the only DUB identified argues against the possibility of an associated DUB. eIF3f was not identified in other screens, in particular in one recently performed in Drosophila [39], probably because a strong extinction of this translation factor had a more severe and broad phenotype than a Notch phenotype, even on external sensory organ development. We actually were able to pick up this factor thanks to the presence of relatively inefficient shRNAs in the library.

The human genome encodes 14 JAMM proteins, seven of which have a complete set of the conserved residues for Zn2+ coordination [40]. Among them, six (AMSH, AMSH-LP, BRCC36, Rpn11, MYSM1, and CSN5) have been reported to have isopeptidase activity on ubiquitin or ubiquitin-like proteins. It is of note that the JAMM sequence of eIF3f cannot be aligned with those of the proteins constituting the MPN+ group (Rpn11, Csn5, AMSH; see [15]). Nevertheless the four polar and the additional glutamate residue in a more N-terminal region of the domain are still present in eIF3f, although not arranged in the MPN+-defined pattern, and the mutation of some of these amino acids affects eIF3f enzymatic activity and function in Notch signaling. It must be noted that the MPN+ consensus domain has been generated using a small number of proteins and that divergent members may well exist, including eIF3f.

Using an in bacteria assay, we have demonstrated that full-length eIF3f or its isolated MPN domain exhibit DUB activity and that the active site indeed involves the amino acids that we had targeted in our inactive mutant. The relatively low activity that we detected in this assay, as compared to the BPLF1 control, might be due to the specificity of this DUB, which is limited by the nature of the P'1 and P'2 residues in the substrate sequence, thus preventing cleavage of non-specific substrates. However we have confirmed by Ub-VS fixation that WT but not mutant eIF3f exhibits DUB activity in mammalian cells. Among the members of the JAMM family, AMSH and AMSH-like seem to be specific for Lys63-linked polyubiquitin chains [41], while MYSM1 is specific for monoubiquitinated H2A [42]. Sato et al. [43] suggested that the specificity of AMSH family members for Lys63-linked polyubiquitin chains is primarily due to their interaction with the proximal ubiquitin, involving a single domain containing two characteristic insertions that are not conserved in eIF3f. However, DUBs may have a multidomain structure, and some of them associate with other proteins, including E3 ubiquitin ligases [23,44]. We show that Notch is only able to interact with eIF3f in the presence of the E3 ubiquitin ligase DTX and that a monoubiquitinated form of Notch is probably the substrate targeted by the DUB. Therefore any reconstituted in vitro system will be difficult to set up.

As JAMM DUBs are commonly found in association with large protein complexes, on one hand, and eIF3f belongs to the eIF3 complex, on the other hand, it will be of great interest to determine whether eIF3f can work as a DUB outside of the translation complex or whether the active form of eIF3f is associated with the whole translation initiation complex. If it were the case, beside an analogy and homology in the molecular architecture of the other Zomes members (Cop9 signalosome and proteasome, [45]), eIF3 would also harbor an enzymatically-conserved organization.

Do Translation Factors Have Multiple Functions?

Beyond acting as a translation initiation factor, eIF3f fulfills other functions, probably independently of the eIF3 complex. For instance, it was shown to inhibit HIV-1 replication [46] by modulating the sequence-specific recognition of the HIV-1 pre-mRNA by the splice factor 9G8. It was also recently proposed to serve as a scaffold in coordinating mTor and SGK1 actions on skeletal muscle growth [47] and to interact genetically and physically with TRC8, an E3 ubiquitin ligase of the RING family with several TM domains [48]. On the other hand, there are at least two different types of eIF3 complexes in the cell, localized in different subcellular fractions. One complex lacks eIF3a and eIF3f, while the other consists of eIF3a–c and eIF3f. Phosphorylated eIF3f may predominantly localize to the nucleus and join a complex containing at least b and c during apoptosis. Therefore, the nuclear eIF3 complex is likely to have functions other than translation initiation [49]. In yeast, affinity purification and LC-MS/MS was employed to characterize the eIF3 interactome, which was found to contain 230 proteins [50]. This led to the proposal that eIF3 assembles into a large supercomplex, the translasome, which contains elongation factors, tRNA synthases, 40S and 60S ribosomal proteins, chaperones, and the proteasome. On the other hand, eIF3 also associates with importins-β, a critical event for normal cell growth. These data suggest that translasomes are dynamically localized within the cell, and eIF3 could shuttle between the cytoplasm and the nucleus in a cell cycle-dependent manner. All these data are in agreement with the hypothesis that eIF3f, and maybe part of eIF3, could have multiple functions in the cells. Our results now add an enzymatic activity to these various properties; it remains to be elucidated whether this activity is necessary to fulfill all eIF3f functions.

Recent data suggest that other translation factors, many of which exist in several copies in the genome (as does eIF3f), have "part-time jobs" outside of their usual function in translation [51]. It is the case, for example, for eIF4A, which exhibits an RNA helicase activity in translation initiation and which was shown to act in a translation-independent manner as a negative regulator of Dpp/BMP signaling in drosophila [52]. eIF4A affects Mad protein level and was suggested to act as an E3 ubiquitin ligase.

In parallel also to ribosomal proteins, which have been recently shown to function outside of the ribosome and to be recruited in some cases for a function unrelated to the ribosome or its synthesis [53], we propose that eIF3f would be another example of a housekeeping protein that also plays a specific role in the Notch signaling pathway.

Materials and Methods

shDUB Library

shDUB library was described in [10] (see also [40,54,55]). Additive shRNAs are listed in Table 1. The pool targeting AMSH used as a control in Figure 7B is the number 139 of the library.

Constructs

All myc-tagged Notch constructs (ΔE, ΔE-LLFF, FL, and NIC) were already described [18,56] and were gifts from R. Kopan (Washington University, St. Louis, MO). These Notch constructs are all deleted from aa 2183 of murine Notch1 and fused to a hexameric myc tag at the carboxy terminus. Notch1 retroviral vector encodes a full-length human Notch1 with an HA-epitope

tag inserted between EGF repeats 22 and 23 (gift of J. Aster, Harvard medical school, Boston, USA).

All WT and deletion mutants of eIF3f (containing N-terminal tags), as well as GST-fused eIF3f constructs, were gifts from S. Leibovitch (Montpellier, France), except the catalytic mutant. meIF3f Mut was generated from HA-tagged WT meIF3f by two successive site-directed mutagenesis using, respectively, the oligonucleotides 5′-GCCACAGGCGCTGCAGCCACAGAA-CACTCAGTGCTG-3′ and its complementary DNA, and 5′-GACATCACAGCTGCAGCCCTGCTGATCCATGAG-3′ and its complementary DNA (HDI(aa181–183) mutated in AAA and IHE(aa190–192) mutated in GIL). 6xHis-tagged Ubiquitin construct was a gift from M. Treier (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany).

HIS-tagged eIF3f MPN constructs were built by inserting the amino acids 95 to 226 of meIF3f WT or meIF3f Mut in pet28a vector using NdeI and BamHI restriction sites.

Retroviral meIF3f vectors were constructed first by adding a S-Tag in the N-terminus end of meIF3f WT or meIF3f mutated in the catalytic domain (HDI (aa181–183) mutated in AAA). Then S-tagged meIF3f constructions were inserted in pMSCVpuro vector using HindIII and ClaI restriction sites. The puromycin resistance gene was replaced by S-Tagged meIF3f, whose expression is by the way under the control of PGK promoter.

CSL-Luc was a gift from T. Honjo (Kyoto University, Japan) and is referred to as pGa981-6 in [30]. NDFIP2 was a gift from S. Kumar (Adelaide University, Australia) and is referred to in [19]. Both BPLF1 constructs were described in [24].

Antibodies

We used anti-myc 9E10 and anti-VSV P5D4 antibodies. Anti-Notch IC and anti-Dll1 antibodies were described, respectively, in [57] and [31].

Other antibodies for Western blot were supplied by Abcam (polyclonal anti-S-Tag), Bethyl (polyclonal anti-eIF3a), BioLegend (polyclonal anti-eIF3f), Cell Signaling (anti-Notch V1744), Covance (monoclonal anti-HA; polyclonal anti-HA), Invitrogen (polyclonal anti-GFP), Novagen (monoclonal anti-S-Tag), and Sigma (monoclonal anti-Flag M2; polyclonal anti-Flag; monoclonal anti-β-tubulin; monoclonal anti-α-tubulin, monoclonal anti-β-Actin). Secondary antibodies for immunofluorescence were supplied by Molecular Probes (Alexa Fluor conjugates).

Cell Lines

U20S-FL cell line was established by retroviral transduction. High titers of recombinant HA-tagged Notch FL viruses were obtained 48 h after transfection of the Plat-E ecotropic packaging cell line with retroviral expression plasmids. After retroviral transduction of the U2OS cell line, clonal populations were obtained by limiting dilution. OP9-Dll1 cell line was described in [31].

MEFs stably expressing VSV-DTX and S-Tag-meIF3f were established from the DTX-expressing MEFs [27] by retro-transduction of S-tagged meIF3f vectors.

Immunofluorescence Assays

U2OS cells were grown on glass coverslips and were transiently transfected using FuGeneHD transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany) for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 for 5 min before the incubation with appropriate antibodies. Cell preparations were mounted in Mowiol (Calbiochem, Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) and images acquired using an AxioImager microscope with ApoTome system with a 63× magnification and AxioVision software (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Le Pecq, France).

Ubiquitin-Conjugates Purification

293T cells were harvested 24 h after transfection and lysed in 8 M urea, 0.1 M NaH2PO4, 10 mM Tris-Hcl (pH 8), 1% Triton X-100, and 20 mM Imidazole at room temperature. His-Ub conjugated proteins were purified on chelating Sepharose beads (Pharmacia), previously charged with Nickel. Ni-bound proteins were washed extensively with the same buffer, then with a pH 6.3 buffer, and eluted in Laemmli before Western blot analysis.

Cell Extracts, Immunoprecipitations, and Immunoblots

293T cells were collected 24 h after transfection, washed in PBS buffer, and lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 400 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Cell extracts were cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 20 min at 4°C. Immunoprecipitations were performed with the appropriate antibodies in the same buffer. When indicated, the immunoprecipitates were eluted by peptide competition (2 mg/mL) for 1 h at 4°C. Samples were denatured in Laemmli buffer for SDS-PAGE resolution, and immunoblots were performed as described previously [18].

Deconjugase Activity Assays

In bacteria functional assay: Bl21 bacteria were transfected with GST-fusions or His-tagged encoding vectors together with Ub-GFP plasmid. The bacteria were selected on agar plates and cultured in LB medium containing Chloramphenicol and Ampicillin or Kanamycin. Exponential bacteria cultures (OD = 0.4) were treated with IPTG 0.5 mM for 16 h at 23°C. Bacteria were harvested, washed, resuspended in PBS containing 20 mM N-Ethylmaleimide, and sonicated for 30 s on ice. After centrifugation (12,000 rpm, 10 min), clear supernatants were measured for GFP fluorescence and protein concentration. Samples were analyzed by two SDS-PAGE resolutions using for each sample 100 units of fluorescence for Ub-GFP assay and 10 μg extracts for protein expression analysis.

Ub-VS assay: HeLa cells were collected 36 h after transfection, washed with PBS, and lysed in 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 0.5% NP40. Protein concentrations were measured. 10 μg of WCE were incubated for 1 h at 37°C with 1 μg of Ub-VS functional probe (Boston Biochem) in a 30 μL final volume of labeling buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, and 1 mM DTT). Finally, WCE and Ub-VS-treated samples were analyzed by Western blot.

Coculture Assay

20,000 U2OS-FL cells/cm^2 were grown and transiently transfected using FuGeneHD transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany). 24 h after transfection, U2OS-FL cells were cocultured with 35,000 OP9-Dll1 cells/cm^2. 18 h later, cocultures (done in triplicates) were lysed using Passive Lysis buffer (Promega). A fraction of cell lysates were transferred to a white 96-well plate (Berthold). Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the luminometer Centro XS (Berthold). For Western blot analysis, part of cocultures were lysed with 8 M urea, 0.1 M NaH2PO4, 10 mM Tris-Hcl (pH 8), 1% Triton X-100, and 20 mM Imidazole.

Table 1. List of DUBs and selected oligonucleotide sequences present in the shDUB library Part 2.

DUB Enzyme (Putative)/Sense Oligo Sequences	Ensembl Gene ID
Ataxin-3-like	ENSG00000123594
GATCCCCCATGGATGATACCGGTTTCTTCAAGAGAGAAACCGGTATCATCCATGTTTTT	
GATCCCCGCTGACCAACTCCTGCAGATTCAAGAGATCTGCAGGAGTTGGTCAGCTTTTT	
GATCCCCCCAATAGAGAAGATGAACATTCAAGAGATGTTCATCTTCTCTATTGGTTTTT	
GATCCCCCAACAAGTTCGAGAGCAATTTCAAGAGAATTGCTCTCGAACTTGTTGTTTTT	
Ataxin-3	ENSG00000066427
GATCCCCGCAGATCTCCGCAGGGCTATTCAAGAGATAGCCCTGCGGAGATCTGCTTTTT	
GATCCCCGCAAATGATGGCTCAGGAATTCAAGAGATTCCTGAGCCATCATTTGCTTTTT	
GATCCCCATCTTACTTCAGAAGAGCTTTCAAGAGAAGCTCTTCTGAAGTAAGATTTTTT	
GATCCCCCTCCTGCAGATGATTAGGGTTCAAGAGACCCTAATCATCTGCAGGAGTTTTT	
JOSD3	ENSG00000166012
GATCCCCCTCTTCTGATAGCAGCTTATTCAAGAGATAAGCTGCTATCAGAAGAGTTTTT	
GATCCCCTCATTGAAGCAAATGAATGTTCAAGAGACATTCATTTGCTTCAATGATTTTT	
GATCCCCGACCAGAAGGAAGGAGAAATTCAAGAGATTTCTCCTTCCTTCTGGTCTTTTT	
GATCCCCTTCCCTGTAAGACTGAGTGTTCAAGAGACACTCAGTCTTACAGGGAATTTTT	
HIN-1	ENSG00000164164
GATCCCCCAGAGAGAAATTTGAAGCGTTCAAGAGACGCTTCAAATTTCTCTCTGTTTTT	
GATCCCCAGTATAAAGAAAGCTCTGCTTCAAGAGAGCAGAGCTTTCTTTATACTTTTTT	
GATCCCCAAGTGCCCTTTCTCTTATGTTCAAGAGACATAAGAGAAAGGGCACTTTTTTT	
GATCCCCAAGAAAGCTCTGCTATGTGTTCAAGAGACACATAGCAGAGCTTTCTTTTTTT	
Otubain-1	ENSG00000167770
GATCCCCGACCAGGCCTGACGGCAACTTCAAGAGAGTTGCCGTCAGGCCTGGTCTTTTT	
GATCCCCGAGCAAGGAAGACCTGGTGTTCAAGAGACACCAGGTCTTCCTTGCTCTTTTT	
GATCCCCGAGATTGCTGTGCAGAACCTTCAAGAGAGGTTCTGCACAGCAATCTCTTTTT	
GATCCCCGTTCTTCGAGCACTTCATCTTCAAGAGAGATGAAGTGCTCGAAGAACTTTTT	
Otubain-2	ENSG00000089723
GATCCCCGACTTCTGCACTCACGAAGTTCAAGAGACTTCGTGAGTGCAGAAGTCTTTTT	
GATCCCCGTGGAGTACGTGGACGAGATTCAAGAGATCTCGTCCACGTACTCCACTTTTT	
GATCCCCGGATGGCTCAGTGTCCAGCTTCAAGAGAGCTGGACACTGAGCCATCCTTTTT	
GATCCCCCCGAGCAGACTTCTTCCGGTTCAAGAGACCGGAAGAAGTCTGCTCGGTTTTT	
RPN8	ENSG00000103035
GATCCCCGTCAATGCCAGGGAAAGAATTCAAGAGATTCTTTCCCTGGCATTGACTTTTT	
GATCCCCGCTTCTGGATATCAGGAGCTTCAAGAGAGCTCCTGATATCCAGAAGCTTTTT	
GATCCCCGAAAGTACTTGATGTATCGTTCAAGAGACGATACATCAAGTACTTTCTTTTT	
GATCCCCGAATGACATTGCCATCAACTTCAAGAGAGTTGATGGCAATGTCATTCTTTTT	
TL132	ENSG00000188933
GATCCCCGACACTCATATTAAGCCTATTCAAGAGATAGGCTTAATATGAGTGTCTTTTT	
GATCCCCAGATGGCAGACACAAGCAGTTCAAGAGACTGCTTGTGTCTGCCATCTTTTTT	
GATCCCCGAAGACAGCACTGATGACCTTCAAGAGAGGTCATCAGTGCTGTCTTCTTTTT	
GATCCCCCCCAAACTGCAAGTGGTACTTCAAGAGAGTACCACTTGCAGTTTGGGTTTTT	
TRABID	ENSG00000019995
GATCCCCGGAGGAACTTGAAGTAGACTTCAAGAGAGTCTACTTCAAGTTCCTCCTTTTT	
GATCCCCGTGGTTCAAGTGATGTTGGTTCAAGAGACCAACATCACTTGAACCACTTTTT	
GATCCCCGTGTATTCCAGCAATGGTGTTCAAGAGACACCATTGCTGGAATACACTTTTT	
GATCCCCGAAGACTGGGCATTTATACTTCAAGAGAGTATAAATGCCCAGTCTTCTTTTT	
USP42	ENSG00000106346
GATCCCCCCAAGAAGATGCCCATGAATTCAAGAGATTCATGGGCATCTTCTTGGTTTTT	
GATCCCCCTGTAACCTCTCTGATCGGTTCAAGAGACCGATCAGAGAGGTTACAGTTTTT	
GATCCCCGCACATATTACCCAGGCACTTCAAGAGAGTGCCTGGGTAATATGTGCTTTTT	
GATCCCCCTGGTCAGTTAATAGGTCCTTCAAGAGAGGACCTATTAACTGACCAGTTTTT	

Table 1. Cont.

DUB Enzyme (Putative)/Sense Oligo Sequences	Ensembl Gene ID
USP48	ENSG00000090686
GATCCCCCACATTTCTTCAAGTGTGGTTCAAGAGACCACACTTGAAGAAATGTGTTTTT	
GATCCCCCAGAATGCAACAAGAAAGATTCAAGAGATCTTTCTTGTTGCATTCTGTTTTT	
GATCCCCGGCTTGTTTCTAAAGAGGCTTCAAGAGAGCCTCTTTAGAAACAAGCCTTTTT	
GATCCCCGTTCGTGGTGAGAAAGCACTTCAAGAGAGTGCTTTCTCACCACGAACTTTTT	
USP49	ENSG00000164663
GATCCCCGATTGGGGTCCATGTCGTCTTCAAGAGAGACGACATGGACCCCAATCTTTTT	
GATCCCCGCTAGAAAGCAGTTAATGATTCAAGAGATCATTAACTGCTTTCTAGCTTTTT	
GATCCCCGCTAGAAAGCAGTTAATGATTCAAGAGATCATTAACTGCTTTCTAGCTTTTT	
GATCCCCCAGGACGCGCAGGAATTTCTTCAAGAGAGAAATTCCTGCGCGTCCTGTTTTT	
USP54	ENSG00000166348
GATCCCCCCAGCATATTGGGACCAGATTCAAGAGATCTGGTCCCAATATGCTGGTTTTT	
GATCCCCCAGCAGAAATGGAGCATGGTTCAAGAGACCATGCTCCATTTCTGCTGTTTTT	
GATCCCCCTAACCTACACTGCCACACTTCAAGAGAGTGTGGCAGTGTAGGTTAGTTTTT	
GATCCCCGGTTTACCTAAAGCACCAGTTCAAGAGACTGGTGCTTTAGGTAAACCTTTTT	
VCIP135	ENSG00000175073
GATCCCCGCTCTGTTCCATGACTTCATTCAAGAGATGAAGTCATGGAACAGAGCTTTTT	
GATCCCCCAAACCAATCTGTATTGCATTCAAGAGATGCAATACAGATTGGTTTGTTTTT	
GATCCCCGCAGTAATGGATAATCGCCTTCAAGAGAGGCGATTATCCATTACTGCTTTTT	
GATCCCCGCATAATACAGGGACAGACTTCAAGAGAGTCTGTCCCTGTATTATGCTTTTT	
OTUD2, YOD1	ENSG00000180667
GATCCCCCCAGGCCCAGAAGTTCACCTTCAAGAGAGGTGAACTTCTGGGCCTGGTTTTT	
GATCCCCCGTGGTGCTTCTAGTTACGTTCAAGAGACGTAACTAGAAGCACCACGTTTTT	
GATCCCCGCGATCCAGACTTCTATAGTTCAAGAGACTATAGAAGTCTGGATCGCTTTTT	
GATCCCCGCACTGGAATTAGCAGATGTTCAAGAGACATCTGCTAATTCCAGTGCTTTTT	
A20	ENSG00000118503
GATCCCCCAAACTCCCAAAGCTGAACTTCAAGAGAGTTCAGCTTTGGGAGTTTGTTTTT	
GATCCCCGTTTGGAATCAGGTTCCAATTCAAGAGATTGGAACCTGATTCCAAACTTTTT	
GATCCCCGAAATACACATATTTGTCCTTCAAGAGAGGACAAATATGTGTATTTCTTTTT	
GATCCCCGGAAACAGACACACGCAACTTCAAGAGAGTTGCGTGTGTCTGTTTCCTTTTT	
BRCC36, BRCC3	ENSG00000185515
GATCCCCCTGAAATGCGCACAGTTGCTTCAAGAGAGCAACTGTGCGCATTTCAGTTTTT	
GATCCCCGTGTGCCTTGAATCAGCAGTTCAAGAGACTGCTGATTCAAGGCACACTTTTT	
GATCCCCGATCCATAATGGCTCAGTGTTCAAGAGACACTGAGCCATTATGGATCTTTTT	
GATCCCCCCAACAGCATTTGCAGGAATTCAAGAGATTCCTGCAAATGCTGTTGGTTTTT	
Cezanne-1	ENSG00000163113
GATCCCCGGGAGTTGAGAAGGAAGCGTTCAAGAGACGCTTCCTTCTCAACTCCCTTTTT	
GATCCCCGAGTTTCACGTCTTTGTCCTTCAAGAGAGGACAAAGACGTGAAACTCTTTTT	
GATCCCCCCCTGAAGATGGGTCACCGTTCAAGAGACGGTGACCCATCTTCAGGGTTTTT	
GATCCCCGGACAAGAAGAGAGCAGATTTCAAGAGAATCTGCTCTCTTCTTGTCCTTTTT	
Cezanne-2	ENSG00000169918
GATCCCCGCCCATTTCTCTGCCCTTGTTCAAGAGACAAGGGCAGAGAAATGGGCTTTTT	
GATCCCCGCTGAACCTTCTGCACAGCTTCAAGAGAGCTGTGCAGAAGGTTCAGCTTTTT	
GATCCCCCAATGTTAAGAGACTCAGGTTCAAGAGACCTGAGTCTCTTAACATTGTTTTT	
GATCCCCCGAGCTGTAAACGGCTTCTTTCAAGAGAAGAAGCCGTTTACAGCTCGTTTTT	
CSN5, JAB1, SGN5	ENSG00000121022
GATCCCCCCATGATCATTATGGACAGTTCAAGAGACTGTCCATAATGATCATGGTTTTT	
GATCCCCGGATCACCATTACTTTAAGTTCAAGAGACTTAAAGTAATGGTGATCCTTTTT	

Table 1. Cont.

DUB Enzyme (Putative)/Sense Oligo Sequences	Ensembl Gene ID
GATCCCCCCCGAGTAAATGCTCAGGCTTCAAGAGAGCCTGAGCATTTACTCGGGTTTTT	
GATCCCCCTACCATAGAAGCTATCCATTCAAGAGATGGATAGCTTCTATGGTAGTTTTT	
CSN6, SGN6	ENSG00000168090
GATCCCCGTTGAACCCTATGACCAAGTTCAAGAGACTTGGTCATAGGGTTCAACTTTTT	
GATCCCCGATTATCATTGACAAGGAATTCAAGAGATTCCTTGTCAATGATAATCTTTTT	
GATCCCCCATCTCAGACCACTGGATCTTCAAGAGAGATCCAGTGGTCTGAGATGTTTTT	
GATCCCCCGCATTGGTGTAGACCACGTTCAAGAGACGTGGTCTACACCAATGCGTTTTT	
DUB-3	ENSG00000182945
GATCCCCCTACATGCTGTCCCGGGAGTTCAAGAGACTCCCGGGACAGCATGTAGTTTTT	
GATCCCCGCAGGAAGATGCCCATGAATTCAAGAGATTCATGGGCATCTTCCTGCTTTTT	
GATCCCCGGACACCACCCTCATCCACTTCAAGAGAGTGGATGAGGGTGGTGTCCTTTTT	
GATCCCCCAAGCAGGTAGATCATCACTTCAAGAGAGTGATGATCTACCTGCTTGTTTTT	
eIF-epsilon	ENSG00000175390
GATCCCCGTGGCTGTTGACATGGAATTTCAAGAGAATTCCATGTCAACAGCCACTTTTT	
GATCCCCGCCTACGTCAGCACTTTAATTCAAGAGATTAAAGTGCTGACGTAGGCTTTTT	
GATCCCCCGCATCGGAGTTGACCTGATTCAAGAGATCAGGTCAACTCCGATGCGTTTTT	
GATCCCCGATGAAGTGGCTGTTGACATTCAAGAGATGTCAACAGCCACTTCATCTTTTT	
eIF-3-gamma	ENSG00000147677
GATCCCCGAAGGACAAGGAACTGAAGTTCAAGAGACTTCAGTTCCTTGTCCTTCTTTTT	
GATCCCCGTGCAGATAGATGGCCTTGTTCAAGAGACAAGGCCATCTATCTGCACTTTTT	
GATCCCCGTCCAATATCAGATGGAAATTCAAGAGATTTCCATCTGATATTGGACTTTTT	
GATCCCCCTTGAAAAGAAGTCAGCTGTTCAAGAGACAGCTGACTTCTTTTCAAGTTTTT	
ENSG00000197767	ENSG00000197767
GATCCCCGATTGCCAAGAATGTGCAATTCAAGAGATTGCACATTCTTGGCAATCTTTTT	
GATCCCCGCTCCCTGCTAAACCTCTCTTCAAGAGAGAGAGGTTTAGCAGGGAGCTTTTT	
GATCCCCGATTGCCAAGAATGTGCAATTCAAGAGATTGCACATTCTTGGCAATCTTTTT	
GATCCCCGCAGGAAGATGCCCATGAATTCAAGAGATTCATGGGCATCTTCCTGCTTTTT	
ENSG00000198817	ENSG00000198817
GATCCCCGCCTATGTCAGCACTTTAATTCAAGAGATTAAAGTGCTGACATAGGCTTTTT	
GATCCCCGATGAAGTGGCTGTTGACATTCAAGAGATGTCAACAGCCACTTCATCTTTTT	
GATCCCCCGCATCGGAGTTGAGCTGATTCAAGAGATCAGCTCAACTCCGATGCGTTTTT	
GATCCCCGAGTGATTGGACTCTTAAGTTCAAGAGACTTAAGAGTCCAATCACTCTTTTT	
HIN-1-like	ENSG00000118976
GATCCCCCTAATCTGGAACCTAATGTTTCAAGAGAACATTAGGTTCCAGATTAGTTTTT	
GATCCCCGTTGGAGACAAATGTCAAGTTCAAGAGACTTGACATTTGTCTCCAACTTTTT	
GATCCCCCTGCTGTTGCTGCTGCTGATTCAAGAGATCAGCAGCAGCAACAGCAGTTTTT	
GATCCCCGACAACGTGAGTTCTCTAGTTCAAGAGACTAGAGAACTCACGTTGTCTTTTT	
HIN-6	ENSG00000189401
GATCCCCGACCAGCTGGTGTTCAGCGTTCAAGAGACGCTGAACACCAGCTGGTCTTTTT	
GATCCCCGACCTGGCCAAGATGAATCTTCAAGAGAGATTCATCTTGGCCAGGTCTTTTT	
GATCCCCCGACGACTTCATGATCTACTTCAAGAGAGTAGATCATGAAGTCGTCGTTTTT	
GATCCCCGAAGCCGATCATCCTGGTCTTCAAGAGAGACCAGGATGATCGGCTTCTTTTT	
IFP38	ENSG00000187684
GATCCCCGCCTATGTCAGCACTTTAATTCAAGAGATTAAAGTGCTGACATAGGCTTTTT	
GATCCCCGTTTCTCCAAATGAGCTCATTCAAGAGATGAGCTCATTTGGAGAAACTTTTT	
GATCCCCCGGCCATATGAGCATCAAATTCAAGAGATTTGATGCTCATATGGCCGTTTTT	
GATCCCCGTGTTCACACCTTTGACAGTTCAAGAGACTGTCAAAGGTGTGAACACTTTTT	
JAMM2	ENSG00000162601
GATCCCCCAGAGAATGGCCTTATTCCTTCAAGAGAGGAATAAGGCCATTCTCTGTTTTT	
GATCCCCGAATTCTAGCAGTGATCTCTTCAAGAGAGAGATCACTGCTAGAATTCTTTTT	

Table 1. Cont.

DUB Enzyme (Putative)/Sense Oligo Sequences	Ensembl Gene ID
GATCCCCCTGGTGTGATGCAAAGGACTTCAAGAGAGTCCTTTGCATCACACCAGTTTTT	
GATCCCCCAGAGAATGGCCTTATTCCTTCAAGAGAGGAATAAGGCCATTCTCTGTTTTT	
JAMM3	ENSG00000008382
GATCCCCGTAACATCCTTTGCAGCCATTCAAGAGATGGCTGCAAAGGATGTTACTTTTT	
GATCCCCGAGGAGATCTACCAGAGCCTTCAAGAGAGGCTCTGGTAGATCTCCTCTTTTT	
GATCCCCCATCGACGCACAGATGGACTTCAAGAGAGTCCATCTGTGCGTCGATGTTTTT	
GATCCCCCACCCTGGTGGAAGTAACATTCAAGAGATGTTACTTCCACCAGGGTGTTTTT	
JOSD1	ENSG00000100221
GATCCCCATGGCAACTACGATGTGAATTCAAGAGATTCACATCGTAGTTGCCATTTTTT	
GATCCCCAGGCTATGAAGCTGTTTGGTTCAAGAGACCAAACAGCTTCATAGCCTTTTTT	
GATCCCCCTCAAGATGCCCGAGTGGATTCAAGAGATCCACTCGGGCATCTTGAGTTTTT	
GATCCCCACGTCTTCCAGGACAGCAATTCAAGAGATTGCTGTCCTGGAAGACGTTTTTT	
JOSD2	ENSG00000161677
GATCCCCCCGGCAACTATGATGTCAATTCAAGAGATTGACATCATAGTTGCCGGTTTTT	
GATCCCCCGTTCTGCAGCAGCAGCTCTTCAAGAGAGAGCTGCTGCTGCAGAACGTTTTT	
GATCCCCCTATGATGTCAATGTGATCTTCAAGAGAGATCACATTGACATCATAGTTTTT	
GATCCCCCCTGGACTCCAAGCTGCGGTTCAAGAGACCGCAGCTTGGAGTCCAGGTTTTT	
OTUD1	ENSG00000165312
GATCCCCCTTCCGACTGAGCGAGCACTTCAAGAGAGTGCTCGCTCAGTCGGAAGTTTTT	
GATCCCCGATGCCCGCCTTCTCCTCCTTCAAGAGAGGAGGAGAAGGCGGGCATCTTTTT	
GATCCCCGCAGGACAAGTATCTGCGGTTCAAGAGACCGCAGATACTTGTCCTGCTTTTT	
GATCCCCGCCGGTGATCGTCTCCAGGTTCAAGAGACCTGGAGACGATCACCGGCTTTTT	
OTUD5	ENSG00000068308
GATCCCCCAGGAAGCGGAAAAACAATTTCAAGAGAATTGTTTTTCCGCTTCCTGTTTTT	
GATCCCCTGCCGACTACTTCTCCAACTTCAAGAGAGTTGGAGAAGTAGTCGGCATTTTT	
GATCCCCGGAGGATGGCGCCTGTCTCTTCAAGAGAGAGACAGGCGCCATCCTCCTTTTT	
GATCCCCCAGGAATACCTAGACAGTATTCAAGAGATACTGTCTAGGTATTCCTGTTTTT	
OTUD6B	ENSG00000155100
GATCCCCCGGATAGCTGAAGCTGAAATTCAAGAGATTTCAGCTTCAGCTATCCGTTTTT	
GATCCCCTAGAGATAATACAGGCAGATTCAAGAGATCTGCCTGTATTATCTCTATTTTT	
GATCCCCCAAACCCTAATACAGGAGATTCAAGAGATCTCCTGTATTAGGGTTTGTTTTT	
GATCCCCCCACTAATACTTGTATATATTCAAGAGATATATACAAGTATTAGTGGTTTTT	
POH1, RPN11	ENSG00000115233
GATCCCCCAAGTCTATATCTCTTCCCTTCAAGAGAGGGAAGAGATATAGACTTGTTTTT	
GATCCCCCAAGCCATCTATCCAGGCATTCAAGAGATGCCTGGATAGATGGCTTGTTTTT	
GATCCCCGGCCGGAGATGGTTGTTGGTTCAAGAGACCAACAACCATCTCCGGCCTTTTT	
GATCCCCCAGCTGGCAATAAAGAATGTTCAAGAGACATTCTTTATTGCCAGCTGTTTTT	
PRP8	ENSG00000174231
GATCCCCGGACAACCCCAACCTGCTGTTCAAGAGACAGCAGGTTGGGGTTGTCCTTTTT	
GATCCCCCCAGATTCCCAATCGTAGATTCAAGAGATCTACGATTGGGAATCTGGTTTTT	
GATCCCCGATGTATGAGAAGATCGACTTCAAGAGAGTCGATCTTCTCATACATCTTTTT	
GATCCCCGATTCATGGGATCGTGGCATTCAAGAGATGCCACGATCCCATGAATCTTTTT	
STAMBP, AMSH	ENSG00000124356
GATCCCCGAAGAAGGAAGCAGAGGAATTCAAGAGATTCCTCTGCTTCCTTCTTCTTTTT	
GATCCCCCAGTCTCATCCATACAGCCTTCAAGAGAGGCTGTATGGATGAGACTGTTTTT	
GATCCCCGTTCCAGGAAACTGGATTCTTCAAGAGAGAATCCAGTTTCCTGGAACTTTTT	
GATCCCCGGCAGAGCTGTTAAAACGATTCAAGAGATCGTTTTAACAGCTCTGCCTTTTT	
AMSH-like	ENSG00000138134
GATCCCCCTCATGTTGCCAGAGGCCATTCAAGAGATGGCCTCTGGCAACATGAGTTTTT	
GATCCCCGAAACTGAAGGAGATTGCATTCAAGAGATGCAATCTCCTTCAGTTTCTTTTT	

Table 1. Cont.

DUB Enzyme (Putative)/Sense Oligo Sequences	Ensembl Gene ID
GATCCCCCAATTCCTTGCTGAATGTATTCAAGAGATACATTCAGCAAGGAATTGTTTTT	
GATCCCCGCATAAAGACACTGGCATCTTCAAGAGAGATGCCAGTGTCTTTATGCTTTTT	
TL132-like	ENSG00000189423
GATCCCCGACACTCATATTAAGCCTATTCAAGAGATAGGCTTAATATGAGTGTCTTTTT	
GATCCCCCCCAAACTGCAAGTGGTACTTCAAGAGAGTACCACTTGCAGTTTGGGTTTTT	
GATCCCCGATGGCAGACACAAGCAGGTTCAAGAGACCTGCTTGTGTCTGCCATCTTTTT	
GATCCCCGTGAAGAAGACAGCACTGATTCAAGAGATCAGTGCTGTCTTCTTCACTTTTT	

doi:10.1371/journal.pbio.1000545.t001

Supporting Information

Figure S1 shRNAs affecting eIF3f level inhibit translation. U2OS cells were transfected with ΔE-encoding vector together with three increasing doses of sh eIF3f P1. After 24 h, immunostaining was performed with anti-myc antibody, and nuclei were stained with Hoechst. The images were acquired using an Axio Imager microscope with a 20× magnification objective. The percentage of myc-positive cells was calculated in each case after counting 163, 226, 155, and 214 cells, respectively. This representative of several experiments shows that eIF3f inhibition affects the translation efficiency of ΔE-encoding vector. The same type of result was obtained with all isolated shRNAs targeting eIF3f at different doses. Note also that at the lower dose (Dose 1 in the second lane), the subcellular localization of myc staining was affected compared to ΔE alone (first lane), Notch being partially retained in extra-nuclear structures.
Found at: doi:10.1371/journal.pbio.1000545.s001 (0.36 MB DOC)

Figure S2 sh eIF3f #3 does not affect Ndfip2 ubiquitination. U2OS cells were transfected with vectors encoding GFP-tagged Ndfip2 and 6xHis-tagged Ubiquitin. We added shRNA #3 in the presence or not of the murine shRNA #3 insensitive meIF3f. Proteins were extracted in denaturing conditions and ubiquitinated products were purified on Nickel-charged beads. Whole cell extracts (WCE) and ubiquitinated products (Nickel) were analyzed by Western blot using the anti-GFP antibody to quantify the levels of ubiquitinated Ndfip2. These data suggest that neither sh eIF3f #3 nor meIF3f overexpression has an effect on Ndfip2 ubiquitination.
Found at: doi:10.1371/journal.pbio.1000545.s002 (0.96 MB PPT)

Figure S3 eIF3f does interact with DTX but not with Itch/AIP4. HEK-293T cells were transfected with vectors encoding HA-tagged meIF3f and VSV-tagged DTX or Flag-tagged Itch/AIP4. 24 h after trasnsfection, cells were lysed and proteins were extracted. meIF3f was immunoprecipitated using anti-HA antibody. Finally, whole cell extracts (WCE) and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using the indicated antibodies. These data show that DTX is co-immunoprecipitated with eIF3f (Lane B), whereas Itch/AIP4 is not (Lane C).
Found at: doi:10.1371/journal.pbio.1000545.s003 (0.99 MB PPT)

Figure S4 A chimera between ubiquitin and Notch IC is partially located outside of the nucleus and presents a transcriptional activity defect. (A) U2OS cells were transfected with vectors encoding NIC (first lane), NIC(KR), where the Lysine 1749 of murine Notch1 was mutated to Arginine [8], or UBIC (obtained by inserting a PCR-amplified NIC(KR) at the AgeI site of UbG76V, K29/48R-GFP [28], therefore NIC being in frame 3′ to the ubiquitin sequence and the GFP being off-frame). After 24 h, immunostaining was performed with rabbit anti-Notch-IC antibody [57]. Nuclei were stained with Hoechst. The percentage of cells presenting extra-nuclear staining was calculated after counting more than 100 random transfected cells on three independent experiments. It was 4% for both NIC and NIC(KR) on average, and 18% for UBIC. These data suggest that monoubiquitination is sufficient to partially hinder NIC nuclear import. (B) U2OS cells were transfected with increasing doses of NIC (A to C), NIC(KR) (D to F), or UBIC (G to I) together with a CSL-Luciferase reporter and a pRL-TK vector encoding Renilla luciferase used as an internal control. After 24 h, relative luciferase activity was measured and cell extracts were analyzed by Western blot. CSL activation was repressed in a dose-dependent manner with UBIC, respectively, reaching 66%, 79%, and 80% of reduction compared to the similar doses of NIC.
Found at: doi:10.1371/journal.pbio.1000545.s004 (4.97 MB PPT)

Figure S5 shRNAs targeting eIF3f have no effect on NIC-mediated transcriptional activation. U2OS cells were transfected with vectors encoding CSL-firefly luciferase (Notch reporter) and TK-renilla luciferase (internal control reporter), together with NIC (Lane A) and increasing doses of eIF3f shRNA P2 (B–D), shRNA #1 (E–G), or a control pool targeting AMSH (H–J). 24 h after transfection, relative luciferase activity was measured and cell extracts were analyzed by Western blot. These data show that NIC-mediated CSL activation is not affected by shRNAs targeting eIF3f. This suggests that CSL-activation decrease observed in coculture experiments in the presence of eIF3f shRNAs is not due to an effect of these shRNAs on Notch-associated transcription factors.
Found at: doi:10.1371/journal.pbio.1000545.s005 (0.54 MB PPT)

Acknowledgments

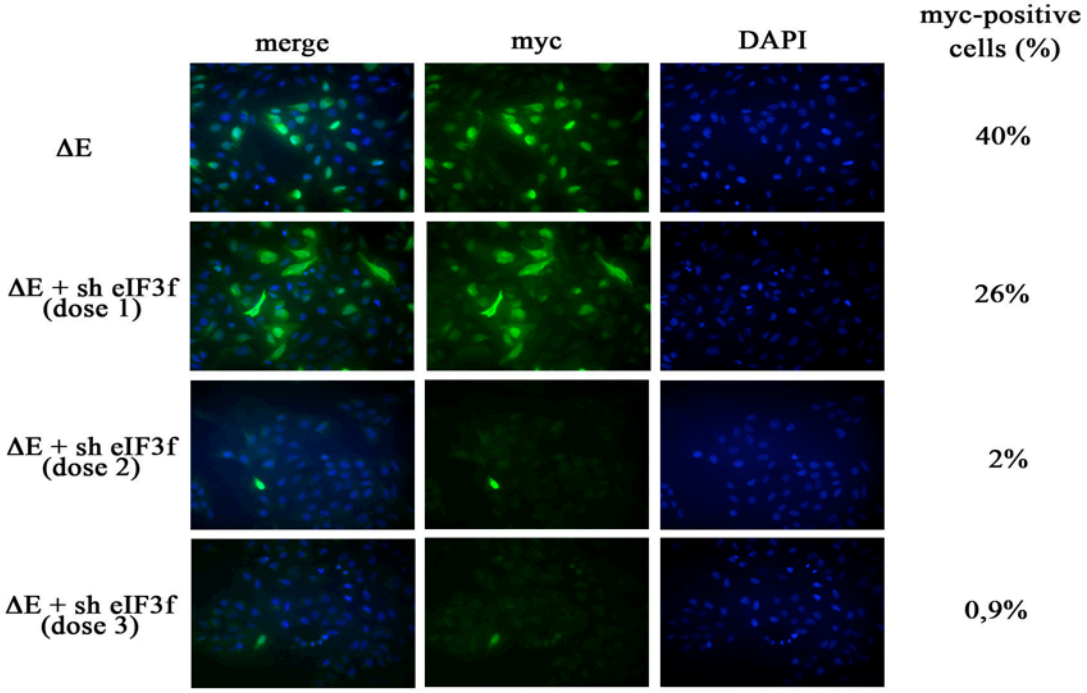
We thank S. Leibovitch (Montpellier, France), S. Kumar (Adelaide University, Australia), and J. Aster (Boston, USA) for generous gifts of materials; E. Six for technical advice; and F. Logeat, L. Pintard, R. Haguenauer-Tsapis, and F. Schweisguth for helpful discussions and for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

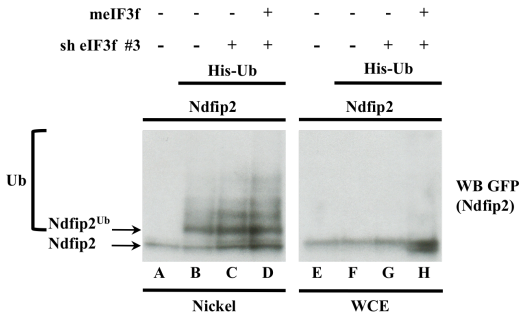
The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: JM CB. Performed the experiments: JM PC SG CB. Analyzed the data: JM SG CB. Contributed reagents/materials/analysis tools: JM PC SFH AMD RB MGM CB. Wrote the paper: JM AI CB.

References

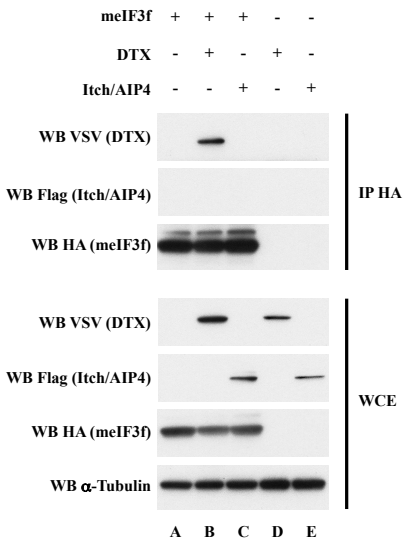
1. Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 678–689.
2. Brou C (2009) Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. Exp Cell Res 315: 1549–1555.
3. D'souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008) The many facets of Notch ligands. Oncogene 27: 5148–5167.
4. Heuss SF, Ndiaye-Lobry D, Six EM, Israël A, Logeat F (2008) The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 11212–11217.
5. Rajan A, Tien A-C, Haueter CM, Schulze KL, Bellen HJ (2009) The Arp2/3 complex and WASp are required for apical trafficking of Delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors. Nat Cell Biol 11: 815–824.
6. Tolia A, De Strooper B (2009) Structure and function of gamma-secretase. Semin Cell Dev Biol 20: 211–218.
7. Yan Y, Denef N, Schupbach T (2009) The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for Notch signaling and endosomal trafficking in drosophila. Dev Cell 17: 387–402.
8. Gupta-Rossi N, Six E, LeBail O, Logeat F, Chastagner P, et al. (2004) Monoubiquitination and endocytosis direct γ-secretase cleavage of activated Notch receptor. J Cell Biol 166: 73–83.
9. Komander D, Clague MJ, Urbe S (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 550–563.
10. Dirac AM, Nijman SM, Brummelkamp TR, Bernards R (2005) Functional annotation of deubiquitinating enzymes using RNA interference. Methods Enzymol 398: 554–567.
11. Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem Sci 31: 553–562.
12. Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, et al. (2008) Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 18139–18144.
13. Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV (2006) Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. PLoS Biol 4: e267. doi:10.1371/journal.pbio.0040267.
14. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ (2004) JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. PLoS Biol 2: E2. doi:10.1371/journal.pbio.0020002.
15. Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman MH (2002) MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. BMC Biochem 3: 28.
16. Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 1683–1688.
17. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, et al. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature 398: 518–522.
18. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, et al. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell 5: 207–216.
19. Shearwin-Whyatt L, Brown D, Wylie F, Stow J, Kumar S (2004) N4WBP5A (Ndfip2), a Nedd4-interacting protein, localizes to multivesicular bodies and the Golgi, and has a potential role in protein trafficking. J Cell Sci 117: 3679–3689.
20. Cope GA, Suh GSB, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, et al. (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. Science 298: 608–611.
21. McCullough J, Clague M, Urbe S (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. J Cell Biol 166: 487–492.
22. Scheel H, Hofmann K (2005) Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. BMC Bioinformatics 6: 71.
23. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, et al. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Science 298: 611–615.
24. Gastaldello S, Hildebrand S, Faridani O, Callegari S, Palmkvist M, et al. (2010) A deneddylase encoded by Epstein-Barr virus promotes viral DNA replication by regulating the activity of cullin-RING ligases. Nat Cell Biol 12: 351–361.
25. Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W (2007) The p53—Mdm2—HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. Oncogene 26: 7262–7266.
26. Popov N, Wanzel M, Madiredjo M, Zhang D, Beijersbergen R, et al. (2007) The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. Nat Cell Biol 9: 765–774.
27. Chastagner P, Israel A, Brou C (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. EMBO Rep 7: 1147–1153.
28. Lindsten K, de Vrij FMS, Verhoef LGGC, Fischer DF, van Leeuwen FW, et al. (2002) Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. J Cell Biol 157: 417–427.
29. Honjo T (1996) The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. Genes Cells 1: 1–9.
30. Minoguchi S, Taniguchi Y, Kato H, Okazaki T, Strobl L, et al. (1997) RBP-L, a transcription factor related to RBP-Jkappa. Mol Cell Biol 17: 2679–2687.
31. Six E, Ndiaye D, Sauer G, Laabi Y, Athman R, et al. (2004) The Notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration. J Biol Chem 279: 55818–55826.
32. Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, et al. (2001) Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. J Biol Chem 276: 34371–34378.
33. Wu G, Lyapina S, Das I, Li J, Gurney M, et al. (2001) SEL-10 is an inhibitor of Notch signaling that targets Notch for ubiquitin-mediated protein degradation. Mol Cell Biol 21: 7403–7415.
34. Aster J, Robertson E, Hasserjian R, Turner J, Kieff E, et al. (1997) Oncogenic forms of Notch1 lacking either the primary binding site for RBP-Jk or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jk and activate transcription. J Biol Chem 272: 11336–11343.
35. Takeyama K, Aguiar R, Gu L, He C, Freeman G, et al. (2003) The BAL-binding protein BBAP and related Deltex family members exhibit ubiquitin-protein isopeptide ligase activity. J Biol Chem 278: 21930–21937.
36. Cayli S, Klug J, Chapiro J, Fröhlich S, Krasteva G, et al. (2009) COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/Valosin-containing Protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP. J Biol Chem 284: 34944–34953.
37. Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J-i, Saijo M, et al. (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. Cell 113: 357–367.
38. Hetfeld BKJ, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, et al. (2005) The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. Curr Biol 15: 1217–1221.
39. Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, et al. (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in Drosophila by transgenic RNAi. Nature 458: 987–992.
40. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, et al. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. Cell 123: 773–786.
41. Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JDF, Odenwaelder P, Wilkinson KD, et al. (2009) Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. EMBO Rep 10: 466–473.
42. Zhu P, Zhou W, Wang J, Puc J, Ohgi KA, et al. (2007) A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. Mol Cell 27: 609–621.
43. Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A, Mimura H, Yamashita M, et al. (2008) Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. Nature 455: 358–362.
44. Sobhian B, Shao G, Lilli DR, Culhane AC, Moreau LA, et al. (2007) RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. Science 316: 1198–1202.
45. Pick E, Pintard L (2009) In the land of the rising sun with the COP9 signalosome and related Zomes. Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3. EMBO Rep 10: 343–348.
46. Valente ST, Gilmartin GM, Venkatarama K, Arriagada G, Goff SP (2009) HIV-1 mRNA 3′ end processing is distinctively regulated by eIF3f, CDK11, and splice factor 9G8. Mol Cell 36: 279–289.
47. Csibi A, Cornille K, Leibovitch M-P, Poupon A, Tintignac LA, et al. (2010) The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. PLoS ONE 5: e8994. doi:10.1371/journal.pone.0008994.
48. Lee JP, Brauweiler A, Rudolph M, Hooper JE, Drabkin HA, et al. (2010) The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways. Mol Cancer Res 8: 93–106.
49. Shi J, Hershey JWB, Nelson MA (2009) Phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 3f by cyclin-dependent kinase 11 during apoptosis. FEBS Letters 583: 971–977.
50. Sha Z, Brill LM, Cabrera R, Kleifeld O, Scheliga JS, et al. (2009) The eIF3 interactome reveals the translasome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. Mol Cell 36: 141–152.
51. Hernández G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R, et al. (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in Drosophila. Mech Dev 122: 529–543.
52. Li J, Li WX (2006) A novel function of Drosophila eIF4A as a negative regulator of Dpp/BMP signalling that mediates SMAD degradation. Nat Cell Biol 8: 1407–1414.
53. Warner JR, Mcintosh KB (2009) How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? Mol Cell 34: 3–11.
54. Brummelkamp T, Nijman S, Dirac A, Bernards R (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-[kappa]B. Nature 424: 797–805.
55. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 296: 550–553.
56. Schroeter E, Kisslinger J, Kopan R (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature 393: 382–386.
57. Logeat F, Bessia C, Brou C, Lebail O, Jarriault S, et al. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 8108–8112.



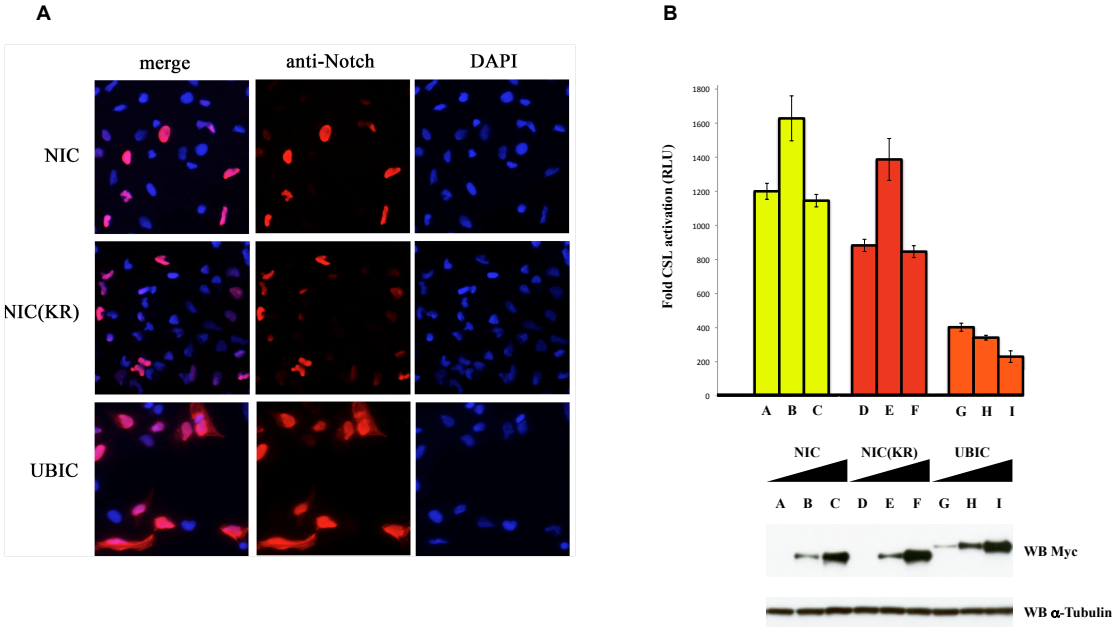
Article – Figure S1 : shRNAs affecting eIF3f level inhibit translation



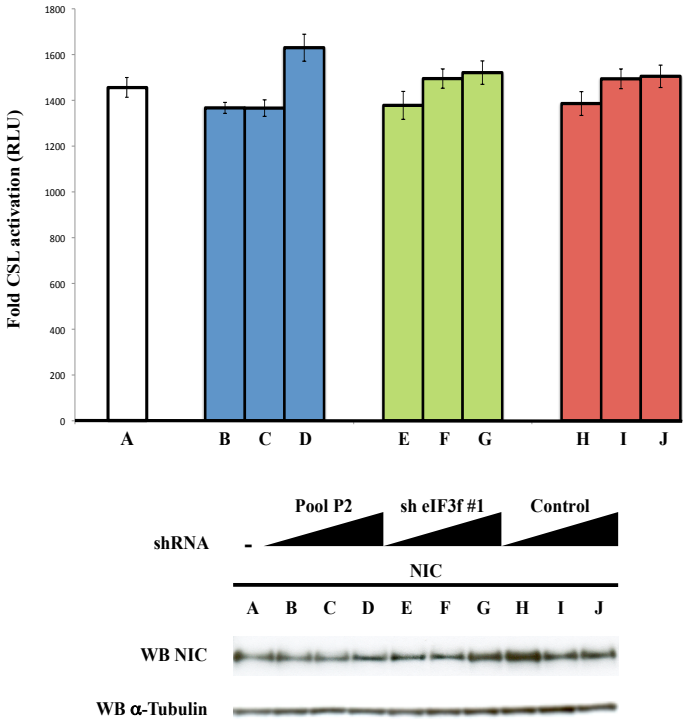
Article – Figure S2 : sh eIF3f #3 does not affect Ndfip2 ubiquitination



Article – Figure S3 : eIF3f does interact with Deltex but not with Itch/AIP4



Article – Figure S4 : A chimera between ubiquitin and Notch-IC is partially located outside of the nucleus (A) and presents a transcriptional activity defect (B)



Article – Figure S5 : shRNAs targeting eIF3f have no effect on NIC-mediated transcriptional activation

2

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH NON ACTIVE ET REGULANT LA VOIE DE DEGRADATION LYSOSOMIALE DU RECEPTEUR NOTCH

RESULTATS NON PUBLIES

2

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH NON ACTIVE ET REGULANT LA VOIE DE DEGRADATION LYSOSOMIALE DU RECEPTEUR NOTCH

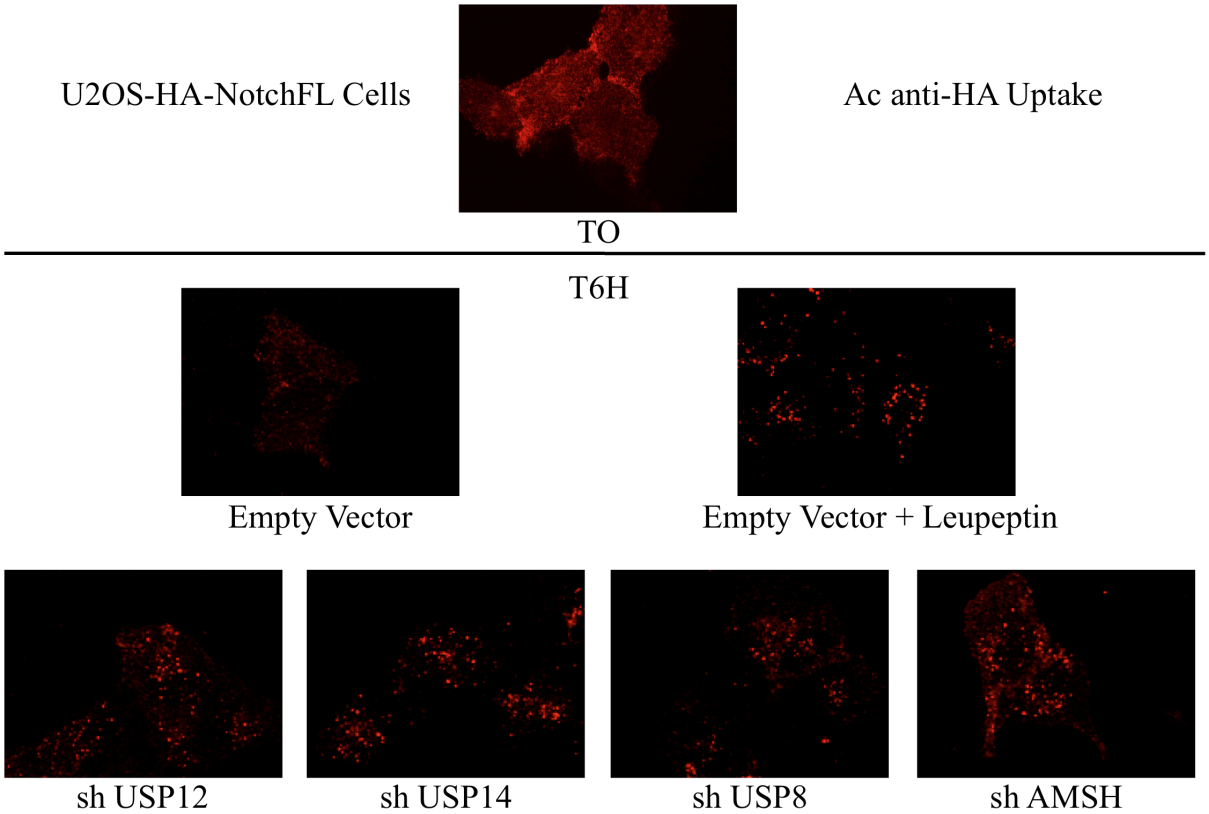
I. Identification des déubiquitinases candidates

1. **Crible en immunofluorescence et identification des DUBs candidates**
2. **Quelques données sur les DUBs candidates**

II. Etude préliminaire de l'effet des déubiquitinases sur Notch-FL non activé

III. Etude du rôle d'USP12 sur Notch-FL non activé

1. **Effet d'USP12 sur la déubiquitination de Notch-FL**
2. **Interaction entre USP12 et Notch**
3. **Conclusions sur USP12**



Résultats non publiés – Figure 1 :
Crible en immunofluorescence de la banque shDUB sur le trafic intracellulaire de Notch non activé et identification des quatre DUBs candidates

IDENTIFICATION DES DUBS AGISSANT SUR LE RECEPTEUR NOTCH NON ACTIVE ET REGULANT LA VOIE DE DEGRADATION LYSOSOMIALE DU RECEPTEUR NOTCH

I. Identification des déubiquitinases candidates :

1. Crible en immunofluorescence et identification des DUBs candidates :

Nous avons dans un premier temps effectué l'uptake sur les cellules Notch-FLHA nous permettant de suivre, après marquage des récepteurs Notch membranaires avec un anticorps anti-HA fluorescent, le trafic intracellulaire de ces récepteurs jusqu'à leur dégradation dans les lysosomes. Effectivement, au temps initial, le marquage HA apparaît membranaire, et, après 6 heures d'uptake, il disparaît quasiment totalement (Résultats non publiés – Figure 1).

En traitant les cellules avec un inhibiteur des protéases lysosomiales, la Leupeptine, on observe toujours un marquage après 6 heures d'uptake, avec une accumulation du récepteur Notch dans des endosomes. Ceci indique bien que la disparition du signal dans les cellules contrôles est dûe à une dégradation dans les lysosomes du récepteur Notch (Résultats non publiés – Figure 1).

Nous avons alors transfecté les cellules avec chacun des 91 pools de la banque shDUB avant d'effectuer l'uptake de Notch-FLHA.
Ce crible nous a permis d'identifier 4 pools de shRNA qui aboutissent à un résultat apparemment semblable après les 6 heures d'uptake. En effet, avec ces quatre différents pools, on observe un marquage Notch dans des endosomes au temps 6 heures, un délai où le récepteur est dégradé dans les cellules contrôles (Résultats non publiés – Figure 1).
Ces pools de shRNA semblent donc affecter le trafic intracellulaire du récepteur Notch-FL après son endocytose, et les 4 déubiquitinases candidates dont ils ciblent l'expression sont :

- USP8
- AMSH
- USP14
- USP12

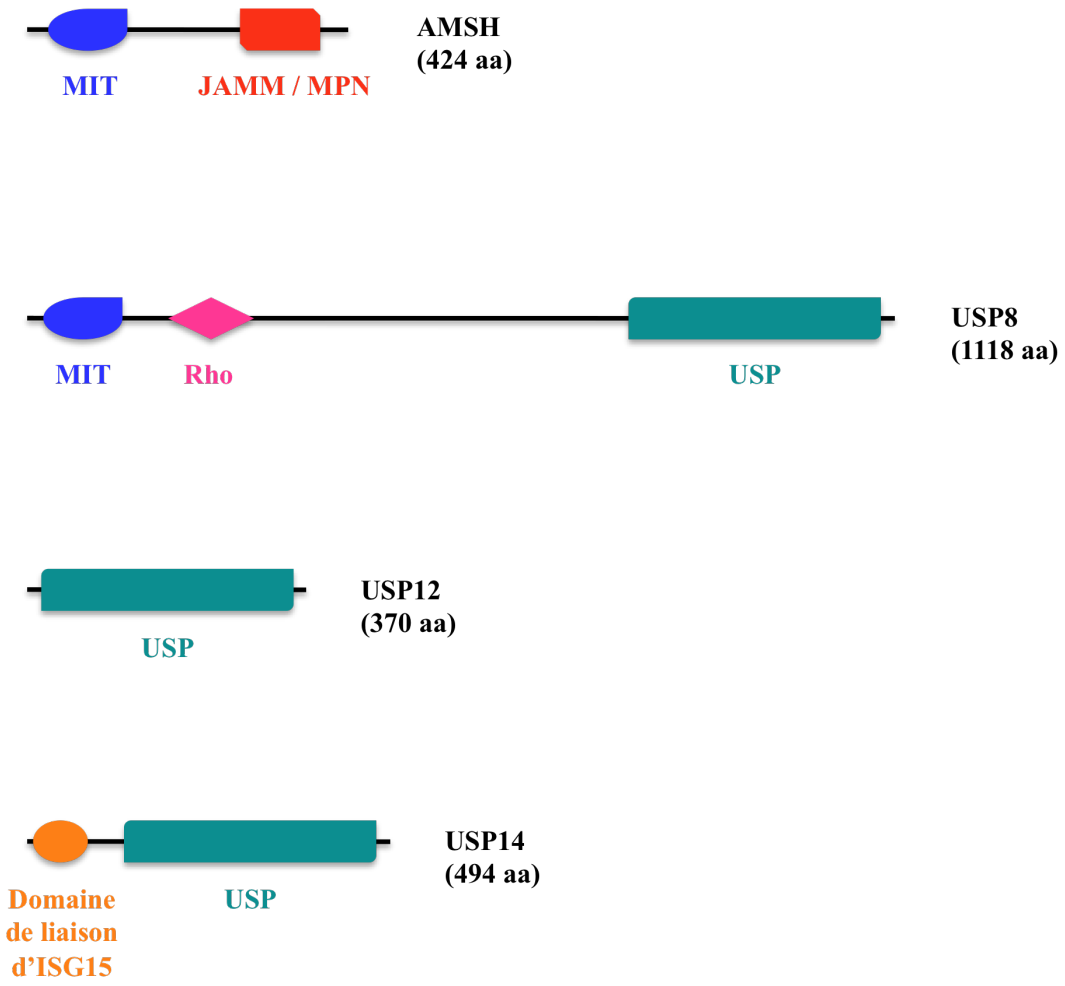


Figure 31 : Structure des déubiquitinases candidates pour la régulation du trafic intracellulaire de Notch-FL : AMSH, USP8/UBPY, USP12 et USP14
MIT : Microtubule Interacting and Trafficking/Transport ; JAMM : JAB1-MPN-Mov34 metalloenzyme ; MPN : Mpr1-Pad1-N-Terminal ; Rho : Rhodanese, domaine d'interaction avec NRDP1 ; USP : Ubiquitin Specific Protease ; ISG15 : Interferon-Stimulated Gene-15, Ubiquitin-like protein modifier.

2. Quelques données sur les DUBs candidates :

USP8 et AMSH sont des déubiquitinases connues pour être associées aux endosomes précoces (appelés aussi endosomes de tri) et, je vous l'ai décrit un peu plus tôt, pour agir sur les récepteurs à activité tyrosine kinase, comme l'EGFR après son activation, son endocytose et son ubiquitination.

Alors que la déubiquitination de l'EGFR par USP8 favorise son trafic vers les corps multivésiculaires et sa dégradation finale dans les lysosomes, sa déubiquitination par AMSH active plutôt son recyclage vers la membrane plasmique.

USP8 semble par ailleurs agir de façon similaire sur d'autres substrats tels le récepteur CXCR4, dont on sait qu'il est endocytosé, polyubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase Itch et dégradé en conséquence dans les lysosomes (Berlin et al., 2010a).

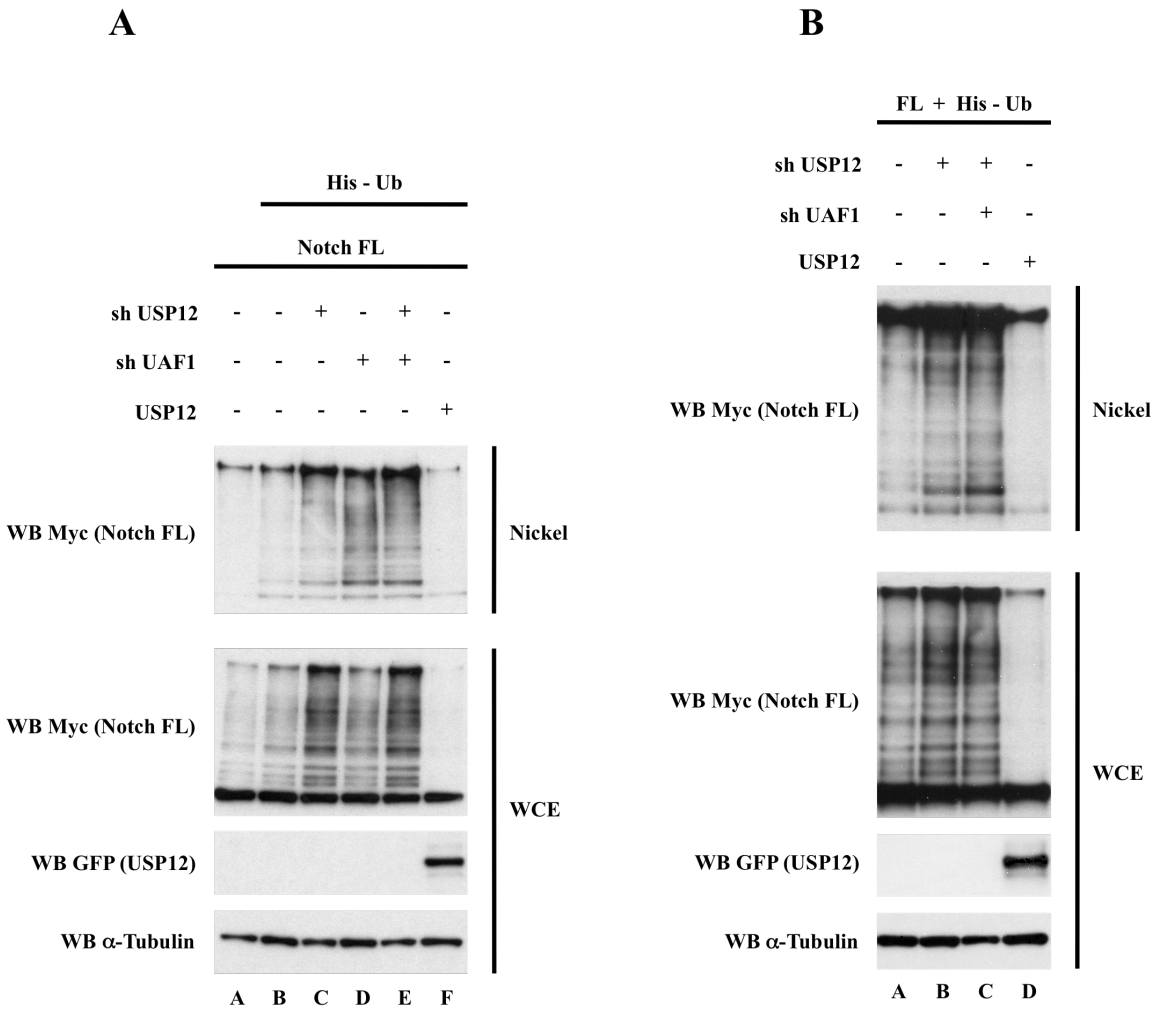
Au final, il n'est pas étonnant de retrouver ces deux déubiquitinases localisées dans les endosomes comme des candidates dans la déubiquitination et la régulation du trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé.

USP14 est une déubiquitinase surtout connue, comme nous l'avons vu précédemment, pour être associée au protéasome. USP14 interagit avec le protéasome, ce qui l'active et lui permet de déubiquitiner les subtrats ubiquitinés qu'elle recrute. Par ailleurs, ce recrutement des protéines ubiquitinées par USP14 est responsable d'un changement de conformation au niveau du protéasome, ce qui permet l'accès au cœur catalytique du protéasome et la dégradation de ces protéines une fois déubiquitinées (Peth et al., 2009).

Mais, plus récemment, des travaux ont montré qu'USP14 est impliqué dans la déubiquitination et la dégradation lysosomiale conséquente du récepteur CXCR4 suite à sa polyubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase Itch, dont on rappelle qu'elle polyubiquitine aussi le récepteur Notch (Mines et al., 2009).

Il n'est donc pas forcément surprenant non plus de retrouver USP14 comme une déubiquitinase possiblement impliquée dans la voie Notch.

La dernière déubiquitinase, USP12, reste plus mystérieuse que les autres candidates. Presque rien n'est connu quant à ses substrats ou les processus qu'elle régule. L'on sait toutefois que l'activité d'USP12 est obligatoirement liée à son interaction avec un co-facteur, appelé UAF1, qui est par ailleurs capable d'interagir et d'activer deux autres DUBs très proches d'USP12 : USP1 et USP46 (Cohn et al., 2009; Kee et al., 2010).



Résultats non publiés – Figure 2 :
Des shRNA ciblant le complexe USP12/UAF1 et la surexpression d'USP12 affectent l'ubiquitination de Notch non activé

Très récemment, des travaux ont montré qu'USP12, tout comme USP46, est capable de déubiquitiner les histones H2A et H2B *in vitro* et *in vivo* (Joo et al., 2011).

II. Etude préliminaire de l'effet des déubiquitinases sur Notch non activé :

Nous avons commencé à étudier les quatre déubiquitinases candidates de façon simultanée.

Tout d'abord, nous avons testé l'effet des déubiquitinases sur l'ubiquitination de Notch-FL non activé. Nous avons co-transfecté les 4 candidates avec Notch-FL, puis purifié les protéines ubiquitinées en conditions dénaturantes et finalement analysé les niveaux d'ubiquitination de Notch par Western Blot. De façon intéressante, nous avons observé une très forte diminution de l'ubiquitination de Notch-FL avec deux déubiquitinases : AMSH et USP12 – les autres n'entraînant aucune modification (Résultat non présenté).

Nous nous sommes alors intéressés plus particulièrement à ces deux déubiquitinases. Dans la suite de la présentation, je me focaliserai sur les résultats concernant USP12, la déubiquitinase qui, selon les résultats actuels, semble être la candidate favorite pour la régulation de Notch-FL non activé.

III. Etude du rôle d'USP12 sur Notch-FL non activé :

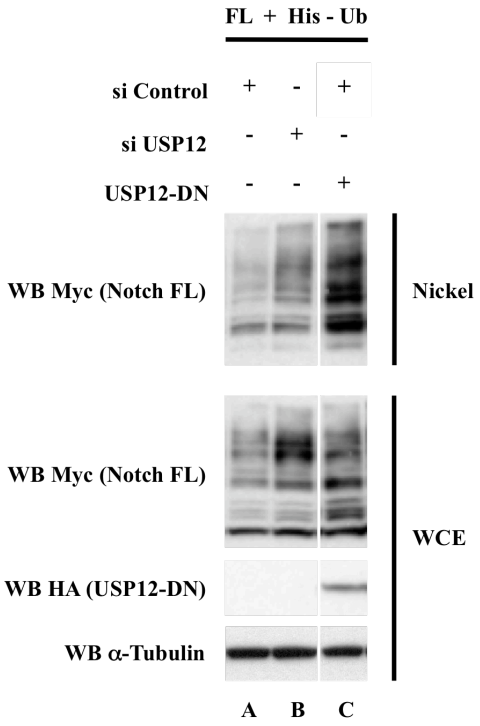
1. Effet d'USP12 sur la déubiquitination de Notch-FL :

Comme je le précisais un peu plus tôt, nous avons immédiatement testé l'effet éventuel des déubiquitinases sur l'ubiquitination de Noth-FL.

Nous avons dans un premier temps co-transfecté des cellules 293T avec :

- un vecteur d'expression codant pour Notch-FL taggé par six épitopes Myc, et
- des shRNAs ciblant USP12 et/ou UAF1 (le co-facteur d'USP12 indispensable à son activité catalytique), ou
- un vecteur codant pour une forme active d'USP12 taggée avec la GFP
- un vecteur codant pour une ubiquitine taggée par six épitopes Histidine (His-Ub)

Après extraction des protéines en conditions dénaturantes, les six épitopes Histidine nous permettent de purifier les protéines ubiquitinées sur Nickel toujours en conditions dénaturantes.



Résultats non publiés – Figure 3 :
Un siRNA ciblant USP12 et la surexpression d'une forme catalytiquement inactive d'USP12 affectent l'ubiquitination de Notch non activé

Finalement, nous avons analysé les extraits totaux et les purifications sur Nickel par Western Blot en utilisant un anticorps anti-Myc pour quantifier les niveaux d'ubiquitination de Notch-FL (et uniquement Notch-FL étant données les conditions expérimentales) (Résultats non publiés – Figures 2 A et B).

Dans les deux expériences présentées, les shRNA ciblant USP12 et UAF1 mènent à une augmentation nette de l'ubiquitination de Notch-FL (Résultats non publiés – Figure 2A lignes C-E et Figure 2B lignes B-C). Au contraire, la surexpression d'USP12 entraîne une forte diminution du niveau d'ubiquitination de Notch-FL (Résultats non publiés – Figures 2A ligne F et Figure 2B ligne D).

L'ensemble de ces observations suggère qu'USP12 est bien impliquée dans la déubiquitination du récepteur Notch-FL non activé, et que son effet dépend de son co-facteur activateur UAF1.

Nous avons également répété ces expériences de purification de protéines ubiquitinées en testant cette fois, sur l'ubiquitination de Notch-FL :

- un siRNA commercial ciblant USP12
- une forme catalytiquement inactive d'USP12, dont la cystéine du site actif est mutée en sérine, appelée USP12-DN

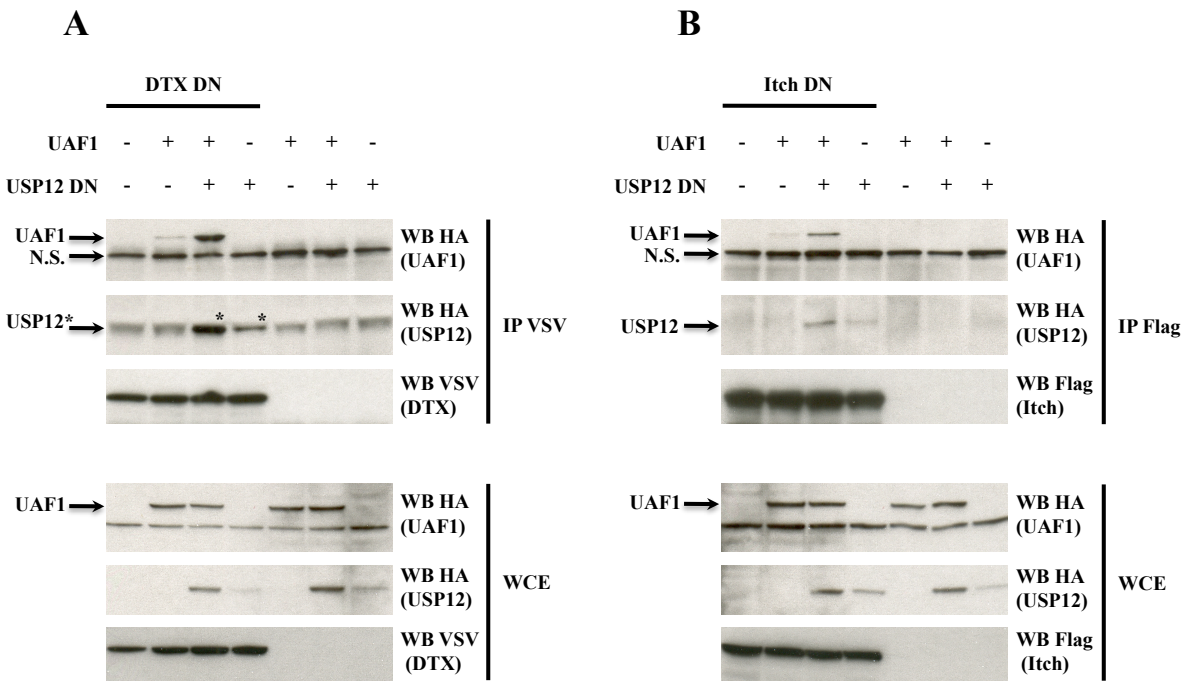
Nous avons à nouveau observé une augmentation de l'ubiquitination de Notch-FL avec le siUSP12 et USP12-DN (Résultats non publiés – Figure 3).

USP12 semble donc bien être une déubiquitinase qui agit sur la déubiquitination de Notch-FL, sans pour l'instant pouvoir préciser si cet effet est direct ou indirect, ni même affirmer que l'ubiquitination affectée est celle qui dépend de l'E3 ubiquitine ligase Itch.

2. Interaction entre USP12 et Notch :

Nous n'avons pas pu montrer d'interaction entre Notch-FL et USP12 dans des expériences de co-immunoprécipitation, tout comme entre Notch-FL et les trois autres déubiquitinases candidates d'ailleurs (Résultat non présenté).

L'utilisation de la forme USP12-DN n'a pas donné de coIP observable non plus (Résultat non présenté).



Résultats non publiés – Figure 4 :
Co-immunoprécipitation entre USP12 et les E3 ubiquitine ligases Itch et Deltex1

Nous avons donc cherché à identifier un intermédiaire entre USP12 et Notch-FL, et, comme dans le cas d'eIF3f, nous avons en priorité testé les E3 ubiquitine ligases impliquées dans la voie Notch et les E3 ubiquitine ligases structuralement proches à savoir Deltex1, c-Cbl, Itch, Nedd4 et Nedd4.2.
En immunoprécipitant USP12, nous avons observé une coIP de Itch et Deltex1 avec USP12, mais pas de coIP pour Nedd4, Nedd4.2 et c-Cbl (Résultat non présenté).

Nous avons vérifié à plusieurs reprises ces co-immunoprécipitations, également dans le sens inverse, notamment en utilisant les formes catalytiquement inactives USP12-DN, Deltex-DN et Itch-DN (Résultats non publiés – Figures 4 A et B).
En immunoprécipitant Deltex-DN, d'une part, ou Itch-DN, d'autre part, nous avons observé une co-immunoprécipitation d'USP12-DN (Résultats non publiés – Figures 4A et 4B, lignes C-D), mais également une co-immunoprécipitation d'UAF1 surexprimé (Résultats non publiés – Figures 4A et 4B, lignes B-C). UAF1 est co-immunoprécipité en absence d'USP12-DN, mais son interaction avec Deltex-DN ou Itch-DN est renforcée par USP12-DN, ce qui laisse supposer qu'UAF1 est en partie recruté à ces deux E3 ubiquitine ligase via USP12-DN.
Par ailleurs, nous pouvons observer que USP12-DN est stabilisé lorsqu'il est co-exprimé avec UAF1.

Il semble donc bien qu'il existe une interaction entre Itch et le complexe USP12/UAF1, de même que cette interaction existe avec Deltex1.

Cependant, malgré plusieurs expériences de co-immunoprécipitation réalisées, nous ne sommes pas parvenus à montrer la précipitation de Notch-FL avec USP12 en présence de Itch ou Deltex1. Nous n'avons donc, pour l'instant, pas observé d'interaction entre USP12 et Notch-FL.

3. Conclusions sur USP12 :

Pour l'instant, nous pouvons dire qu'USP12 est bien impliqué dans la déubiquitination de Notch-FL non activé, que ce soit de façon directe ou indirecte. Nous avons identifié des interactants d'USP12 qui sont impliqués dans la voie Notch, sans toutefois préciser le rôle éventuel de ces interactions dans la déubiquitination de Notch.

Il reste donc encore du travail avant de déterminer par quels mécanismes USP12 agit sur Notch-FL et de préciser les conséquences de la déubiquitination de Notch sur son trafic intracellulaire et, plus globalement, sur la voie de signalisation Notch.
J'aborderai ceci plus en détail dans la partie discussion.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai pu identifier eIF3f comme une nouvelle déubiquitinase qui agit sur le récepteur Notch activé et qui régule positivement la voie d'activation de Notch.
Par ailleurs, quatre déubiquitinases ont été sélectionnées comme possiblement impliquées dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé, dont une en particulier, USP12, semble bien agir sur l'ubiquitination de Notch.

Revenons sur ces deux parties de mon projet de thèse et discutons des résultats obtenus dans ces deux études, qu'ils soient publiés ou non.

1

DE LA NECESSITE DE L'UBIQUITINATION ET DE LA DEUBIQUITINATION DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

DE LA NECESSITE DE L'UBIQUITINATION ET DE LA DEUBIQUITINATION DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

Mon travail de thèse avait pour but d'identifier les déubiquitinases impliquées dans la régulation de la voie de signalisation Notch, corollaire de notre hypothèse de départ selon laquelle une étape de déubiquitination est requise après chaque processus d'ubiquitination affectant le récepteur Notch.

Ces processus d'ubiquitination du récepteur Notch sont donc la base de mon projet de thèse, pourtant, selon les cas, ils sont plus ou moins controversés dans la littérature.

La polyubiquitination du récepteur Notch non activé est assez documentée. En particulier, la polyubiquitination du récepteur par l'E3 ubiquitine ligase Su(dx)/Itch/AIP4, comme je le précisais dans l'introduction, a été démontrée à la fois chez la drosophile (Wilkin et al., 2004) et chez les mammifères par notre laboratoire (Chastagner et al., 2008).

Le laboratoire a de plus précisé la fonction de cette polyubiquitination qui contrôle le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé vers les corps multivésiculaires et sa dégradation finale dans les lysosomes, régulant ainsi la quantité de Notch potentiellement activable exprimé à la surface des cellules (Chastagner et al., 2008). Ce rôle de régulateur négatif de la voie Notch a également été confirmé pour Itch dans les cellules souches hématopoïétiques (Rathinam et al., 2011).

Le rôle de cette polyubiquitination par Su(dx)/Itch/AIP4 est d'autant plus admis par la communauté Notch que des processus semblables, dont certains sont contrôlés par la même E3 ubiquitine ligase, sont retrouvés dans le cas d'autres récepteurs membranaires.
Certain groupe a montré le rôle d'AIP4 dans la polyubiquitination et la dégradation de la protéine transmembranaire CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4), récepteur de la chimiokine CXCL12 (C-X-C motif ligand 12) (Marchese et al., 2003). C'est également le cas pour le récepteur Erb-B4 (Omerovic et al., 2007).

L'idée d'une déubiquitination consécutive du récepteur Notch qui contrôlerait son trafic intracellulaire est également renforcée par des exemples similaires qui ont été publiés, parfois récemment. Je vous ai déjà présenté l'exemple bien connu du récepteur EGFR qui, suite à son activation et sa multiubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl, est endocytosé et peut être déubiquitiné par deux DUBs :

- USP8, qui entraîne son entrée dans les corps multivésiculaires et sa dégradation par les lysosomes (Berlin et al., 2010b; Row et al., 2006)
- AMSH, qui favorise son recyclage vers la membrane plasmique (McCullough et al., 2004)

Dans les deux cas, l'étape de déubiquitination est requise pour l'achèvement du processus concerné.

Le récepteur CXCR4, dont on rappelle qu'il est polyubiquitiné par Su(dx)/Itch/AIP4, est également régulé par USP8 qui active sa dégradation dans les lysosomes, sans toutefois le déubiquitiner (Berlin et al., 2010a).

Tout ceci laisse penser qu'au moins une étape de déubiquitination du récepteur Notch non activé intervient et régule de façon requise son trafic intracellulaire vers la dégradation ou, peut-être, le recyclage.

Si la polyubiquitination du récepteur Notch non activé semble ne pas trop susciter débat, le cas est tout autre pour la monoubiquitination du récepteur Notch activé.

Effectivement, notre laboratoire a montré il y a quelques années que le récepteur Notch de mammifères doit être monoubiquitiné et endocytosé avant d'être clivé par le complexe γ-secrétase qui produit la forme Notch-ICD transcriptionnellement active. Or, cette monoubiquitination est la base de la majeure partie de mon travail de thèse.

Pourtant, cette étape d'ubiquitination reste controversée, surtout parce qu'elle n'est pas davantage illustrée par d'autres groupes, dans d'autres modèles comme la drosophile. Pourtant, le fait que cette monoubiquitination ne soit pas identifiée chez la drosophile ne peut pas être utilisé pour réfuter l'existence d'un tel processus chez les mammifères.

Même si la voie Notch et la majeure partie de ses régulateurs sont très conservés entre la drosophile et les mammifères, on peut comprendre aisément que les différences génétiques entre les deux organismes sont suffisamment importantes pour ne pas exclure la présence de régulateurs uniquement retrouvés chez les mammifères, par exemple.

Controversée, l'endocytose du récepteur Notch l'est aussi. Des travaux chez la drosophile ont montré qu'elle est requise à la fois dans les cellules émettrices et réceptrices du signal pour une signalisation efficace (Seugnet et al., 1997).

Toujours chez la drosophile, le rôle de l'endocytose de Notch au cours de sa voie d'activation a également été mis en évidence récemment (Vaccari et al., 2008). Il a aussi été proposé que

le clivage γ-secrétase intervient à la membrane plasmique ou bien dans des endosomes (Lopez-Schier and St Johnston, 2002).
Mais, contrairement à l'endocytose des ligands, l'endocytose du récepteur Notch n'est généralement pas considérée comme nécessaire à la voie d'activation Notch, aussi bien chez la drosophile que ches les mammifères (Kaether et al., 2006).

Nous avons évidemment considéré ces observations du laboratoire suffisamment pertinentes pour engendrer ce projet d'identification des déubiquitinases régulant la voie d'activation Notch.
Et au final, les résultats obtenus pendant ma thèse soutiennent l'existence d'une monoubiquitination du récepteur Notch activé avant le clivage par le complexe γ-secrétase.
Effectivement, nous avons identifié eIF3f dont le knock-down par shRNA mène à une accumulation d'une forme monoubiquitinée de Notch-ΔE. Par ailleurs, nous avons observé une colocalisation d'eIF3f avec Notch-ΔE en présence de Deltex1 dans des endosomes. L'ensemble de ces résultats confirme l'hypothèse d'une monoubiquitination et d'une endocytose du récepteur Notch activé.

2

eIF3f, UNE DEUBIQUITINASE REGULANT LA VOIE D'ACTIVATION NOTCH

I. eIF3f a une activité déubiquitinase intrinsèque

II. eIF3f agit sur l'activation du récepteur Notch avant le clivage γ-secrétase

1. **eIF3f agit sur le récepteur Notch non clivé par le complexe γ-secrétase**
2. **eIF3f est un régulateur positif de la voie de signalisation Notch**

III. eIF3f est recruté à Notch activé via Deltex1

IV. Le rôle physiologique d'eIF3f

V. Le complexe eIF3 est un Zome à part entière

VI. eIF3f agit-il au sein ou en dehors du complexe eIF3 ?

VII. eIF3f agit-il sur d'autres subtrats ?

EIF3F, UNE DEUBIQUITINASE REGULANT LA VOIE D'ACTIVATION NOTCH

De façon assez surprenante, en tout cas au départ, le crible de la banque shDUB nous a permis d'identifier eIF3f comme une déubiquitinase candidate agissant sur le récepteur Notch activé. Ce n'était pas le candidat le plus évident à étudier, et cela pour plusieurs raisons.

I. eIF3f a une activité déubiquitinase intrinsèque :

Lorsque nous avons identifié eIF3f, nous avons tout de suite été confrontés à un premier problème, ou défi, selon le point de vue. Effectivement, eIF3f était connue pour être une sous-unité du complexe d'initiation de la traduction eIF3, et son rôle était clairement identifié comme crucial au sein du complexe pour une traduction protéique efficace.
Mais eIF3f n'était pas connue pour avoir une activité déubiquitinase, ni même aucune autre activité protéase.

Toutefois, et c'est ce qui explique la présence de deux pools de shRNA ciblant son expression dans la banque shDUB, eIF3f pouvait être considérée comme une déubiquitinase putative en raison de la présence dans sa séquence protéique d'un domaine JAMM / MPN semblable à celui des déubiquitinases de la classe des métalloprotéases.

Ce domaine ne contient pas la séquence d'acides aminés parfaitement alignée à celle présente dans les quelques protéines du groupe JAMM / MPN dont on sait qu'elles ont une activité catalytique de déubiquitination ou de déneddylation et qui forme le groupe MPN+.
Pourtant, les acides aminés essentiels à l'activité protéase du domaine sont présents : deux résidus Histidine et des résidus acides forment une signature des métalloprotéases $HEX_2HX_2GX_2H$, rendant possible la coordination d'un ion zincique et donc une activité catalytique.
Nous avons muté 6 acides aminés, incluant les deux résidus Histidine et les deux résidus acides du site catalytique putatif, et nous avons étudié en parallèle la forme sauvage et cette forme mutante d'eIF3f (respectivement nommée eIF3f WT et eIF3f Mut).

Nos premières expériences suggèrent qu'eIF3f est lui-même capable d'agir comme une déubiquitinase pendant l'activation de la voie Notch.

En effet, dans les expériences de purifications de protéines ubiquitinées, la forme eIF3f WT, contrairement à la forme eIF3f Mut, est capable de complémenter l'effet des shRNA ciblant eIF3f sur l'accumulation de Notch monoubiquitiné et de restaurer la déubiquitination de Notch.

A ce stade là, nous ne pouvions pas exclure complètement que l'effet observé sur la déubiquitination de Notch activé était dû à l'action d'une autre déubiquitinase associée à eIF3f. La déneddylase CSN5, par exemple, en plus de sa propre activité catalytique, est capable de s'associer avec la déubiquitinase USP15, cette association étant requise pour la déubiquitination de protéines polyubiquitinées qui interagissent avec la protéine p97/VCP (Cayli et al., 2009).

Lorsqu'on connaît les similitudes entre eIF3f et CSN5, chacune de ces protéines contenant un domaine JAMM / MPN et appartenant à un complexe de la famille PCI / Zomes, cette idée reste parfaitement envisageable.

Toutefois, on peut penser que si tel avait été le cas, nous aurions dû détecter, lors du crible en immunofluorescence, cette déubiquitinase dont l'inhibition de l'expression par shRNA aurait dû mener aux mêmes effets sur Notch que le knock-down d'eIF3f.

Nous ne pouvions pas non plus exclure, a priori, que l'effet observé était celui d'eIF3h, l'autre sous-unité à domaine JAMM / MPN du complexe eIF3, qui est directement associée à eIF3f au sein du complexe, et dont l'activité déubiquitinase putative aurait pu être affectée par le knock-down d'eIF3f. Nous avons rapidement mis cette hypothèse à l'écart puisque eIF3h ne possède pas les résidus polaires et acides nécessaires à une activité protéase dans son domaine JAMM / MPN.

De façon moins réjouissante, nous ne pouvions pas non plus ignorer la possibilité que l'inhibition de l'expression d'eIF3f par shRNA fût susceptible d'affecter la traduction d'une déubiquitinase agissant sur Notch. Cette hypothèse aurait été une des explications de l'accumulation de Notch monoubiquitiné en présence des shRNA ciblant eIF3f. Mais, encore une fois, nous aurions dû, dans ce cas, identifier cette déubiquitinase lors du crible de la banque shDUB.

Les doutes et les incertitudes du début ne se sont réellement effacés qu'avec la démonstration tant attendue de l'activité déubiquitinase intrinsèque d'eIF3f.

Effectivement, en réalisant des expériences en bactéries, nous avons montré que la forme entière d'eIF3f ou bien son domaine MPN isolé ont une activité déubiquitinase et,

puisque la forme mutante eIF3f Mut est inactive, que cette activité implique la présence des acides aminés polaires considérés que nous avons mutés.

Vous aurez remarqué que l'activité catalytique observée avec eIF3f est relativement faible par rapport à celle obtenue avec le contrôle BPLF1, et cela pour plusieurs raisons possibles. Tout d'abord, l'on peut envisager qu'eIF3f a une spécificité pour les résidus du substrat proximaux à l'ubiquitine, ce qui limiterait l'activité sur des substrats spécifiques et empêcherait une déubiquitination de substrats non spécifiques.

Ensuite, on peut imaginer que l'expression d'eIF3f dans des bactéries ne mène pas au même repliement de la protéine et qu'elle ne possède pas une conformation tridimensionnelle adéquate et optimale pour l'activité catalytique.

Finalement, et cela peut être lié à l'explication précédente, eIF3f nécessite peut-être la présence d'un co-facteur pour avoir une activité enzymatique maximale. Dans le cas particulier d'eIF3f, l'intégration de la protéine au sein du complexe eIF3 est peut-être requise pour son activité déubiquitinase. On peut cependant penser que, si tel avait été le cas, l'inhibition de l'expression d'eIF3h avec le pool de shRNA aurait indirectement affecté l'activité d'eIF3f et aurait mené au même effet que le pool sheIF3f.

En plus de ces expériences en bactéries, nous avons confirmé par la fixation de l'Ubiquitine-Vinylsulfone qu'eIF3f WT, contrairement à eIF3f Mut, porte une activité déubiquitinase dans des bactéries mais aussi dans des cellules de mammifères.

Nous avons donc identifié pour la première fois eIF3f comme une métalloprotéase capable d'une activité déubiquitinase, eIF3f agissant sur le récepteur Notch activé monoubiquitiné et régulant ainsi la voie d'activation de Notch.

Toutefois, nous n'avons pas précisé davantage les mécanismes d'action d'eIF3f.

En particulier, nous n'avons pas pu montrer de spécificité pour la déubiquitination de Notch activé monoubiquitiné.

Parmi les déubiquitinases connues de la famille JAMM / MPN, AMSH et AMSH-like semblent déubiquitiner spécifiquement les chaînes de polyubiquitine K63 (Komander et al., 2009), alors que MYSM1 est spécifique de la monoubiquitination de l'histone H2A (Zhu et al., 2007).

La spécificité des enzymes de la famille AMSH pour les chaînes K63 semble due à l'interaction de ces DUBs avec l'ubiquitine proximale via un domaine qui n'est pas conservé

dans la séquence d'eIF3f (Sato et al., 2008). Or, comme nous l'avons déjà abordé succinctement, la spécificité d'une DUB pour un substrat donné peut venir de domaines variés au sein de sa séquence protéique.

Par ailleurs, nous avons montré qu'eIF3f n'interagit avec Notch activé que dans un complexe tripartite où l'E3 ubiquitine ligase Deltex1 sert de pont entre Notch et eIF3f.
Dans ce cas précis, comme dans le cas des autres complexes DUB / E3 ubiquitine ligase / Substrat, l'interaction enzyme - substrat est plutôt une association protéique, l'interaction proprement dite avec le substrat ne dépendant pas directement d'un domaine de la DUB.

L'étude de la spécificité d'eIF3f pour le récepteur Notch activé monoubiquitiné aurait nécessité la reconstitution de ce complexe *in vitro* et aurait été très difficile à mettre précisément au point.

II. eIF3f agit sur l'activation du récepteur Notch avant le clivage γ-secrétase :

1. eIF3f agit sur le récepteur Notch non clivé par le complexe γ-secrétase :

Nos expériences ont montré qu'eIF3f agit sur le niveau d'ubiquitination du récepteur Notch activé. Plus précisément, nous avons observé que l'effet d'eIF3f sur l'ubiquitination de Notch est spécifique des formes de Notch activées, encore ancrées à la membrane plasmique et non clivées par le complexe γ-secrétase (Notch-ΔE et Notch-ΔE-LLFF).

Par ailleurs, en mettant en évidence le rôle de Deltex1 dans le recrutement de Notch à eIF3f, nous avons également observé que seules ces mêmes formes de Notch activées et non clivées par le complexe γ-secrétase sont intégrées au complexe tripartite, ce qui permet leur interaction avec eIF3f.

Ces données, associées à l'activité déubiquitinase nouvellement démontrée d'eIF3f, suggèrent fortement qu'eIF3f agit sur Notch avant la coupure γ-secrétase, bien que nous n'ayons pas identifié formellement quelle forme de Notch est le substrat d'eIF3f.

Nous ne pouvons pas exclure totalement qu'eIF3f agit sur une forme monoubiquitinée de Notch-ICD, forme produite par le clivage γ-secrétase de Notch-ΔE non déubiquitiné, et que

nous observons en présence des shRNA ciblant eIF3f dans les expériences de purification de protéines ubiquitinées.

Cette forme n'a jamais été observée auparavant, en tout cas cela n'a jamais été publié. Une construction mimant cette monoubiquitination de Notch-ICD, appelée UBIC, est partiellement cytoplasmique et a une activité transcriptionnelle largement diminuée par rapport à la forme Notch-ICD.

Nous ne pouvons pas exclure qu'eIF3f agit sur Notch-ICD, certes, mais plusieurs observations vont à l'encontre de cette hypothèse.

Tout d'abord, nous avons vu qu'eIF3f colocalise avec Notch dans des endosomes, en présence de Deltex1, ce qui suggère qu'eIF3f agit sur son substrat dans ces structures intracellulaires. Or, la forme Notch-ICD observée en immunofluorescence en présence des shRNA ciblant eIF3f – en supputant qu'elle est le produit du clivage γ-secrétase de Notch-ΔE non déubiquitiné – n'est pas associée à des endosomes.

Ensuite, comme nous l'avons observé dans les expériences de co-immunoprécipitation, ni la forme Notch-ICD surexprimée, ni la forme Notch-ICD issue du clivage γ-secrétase de Notch-ΔE n'intéragissent avec eIF3f en présence de Deltex1.
En admettant que la forme Notch-ICD surexprimée ne soit pas en mesure d'interagir avec eIF3f vu sa localisation strictement nucléaire, nous devrions observer une interaction entre eIF3f et la forme Notch-ICD produite à partir de Notch-ΔE, forme qui est générée dans les endosomes d'où elle est libérée dans le cytoplasme avant d'être rapidement transportée dans le noyau, d'autant que, rappelons-le, eIF3f est notamment associé aux endosomes.

Pour finir, comme je le précisais un peu plus en amont, l'accumulation de formes monoubiquitinées de Notch avec les shRNA ciblant eIF3f n'a été observée que pour des formes de Notch ancrées à la membrane plasmique, notamment Notch-ΔE-LLFF qui ne produit pas de forme Notch-ICD.

2. eIF3f est un régulateur positif de la voie de signalisation Notch :

Nous avons reconstitué une activation physiologique de la voie Notch en utilisant un système de coculture entre des cellules exprimant stablement le récepteur Notch1 d'une part et le ligand Delta-like1 d'autre part, et nous avons montré que l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur spécifique de Notch est réduite lorsqu'on exprime la forme eIF3f Mut

catalytiquement inactive, ou bien lorsqu'on exprime des shRNA ciblant l'expression d'eIF3f endogène. Ces résultats montrent qu'eIF3f régule positivement la voie d'activation de Notch.

Les expériences avec les shRNA inhibant l'expression d'eIF3f étaient délicates dans la mesure où l'on sait qu'ils peuvent avoir des effets globaux sur la traduction protéique dans les cellules. Toutefois, nous avons effectué plusieurs contrôles nous permettant d'affirmer que les effets observés sur l'activité transcriptionnelle de Notch sont spécifiques de la voie de signalisation et non pas des conséquences d'un défaut de traduction.

Tout d'abord, nous avons vérifié par Western Blot que les niveaux d'expression de Notch ne sont pas affectés par les différentes doses de shRNA transfectées dans les cellules exprimant stablement Notch1. La quantité de Notch potentiellement activable n'est donc pas modifiée par ces shRNA.

Par ailleurs, afin d'éviter tout effet traductionnel éventuel sur des co-facteurs de transcription de Notch qui serait indétectable dans ces expériences, nous avons vérifié que ces mêmes shRNA ne modifient pas l'activité transcriptionnelle d'une forme Notch-ICD surexprimée dont on rappelle qu'elle est strictement nucléaire.

Nous avons donc conclu qu'eIF3f agit véritablement comme un régulateur positif de la voie d'activation de Notch. La forme activée de Notch a effectivement besoin d'être déubiquitinée pour les étapes finales de la voie de signalisation, et cette déubiquitination est effectuée par eIF3f, une déubiquitinase nouvellement caractérisée.

III. eIF3f est recruté à Notch activé via Deltex1 :

Nous avons montré que la protéine eIF3f est recrutée à Notch activé, uniquement en présence de Deltex1, dans un complexe tripartite où Deltex1 sert d'intermédiaire entre la déubiquitinase et son substrat.

L'interaction entre eIF3f et Deltex1 est forte, et nous l'avons observée par co-immunoprécipitation dans les deux sens en surexpression mais aussi dans des cellules exprimant stablement des niveaux faibles des deux protéines. Les expériences sur les protéines endogènes sont impossibles dans la mesure où, s'il existe un anticorps anti-eIF3f efficace, aucun anticorps spécifique de Deltex1 n'était disponible (la présence de quatre

isoformes très proches de Deltex ne facilite pas la fabrication d'anticorps spécifique d'un isoforme).
Notons que le laboratoire est très récemment parvenu à obtenir des anticorps spécifiques de Deltex1, ce qui devrait aider à l'étude de cette protéine.

Nous avons cherché à identifier le ou les domaines d'eIF3f impliqué(s) dans cette interaction en construisant différents mutants de délétion d'eIF3f que nous avons testés dans des expériences de co-immunoprécipitation avec Deltex1.
Ces expériences ont montré que chacun des mutants de délétion est capable d'interagir avec Deltex1. Or, ces mutants n'ont pour seule séquence commune qu'une région de 5 acides aminés qu'il est difficile de considérer comme un domaine d'interaction.

L'hypothèse la plus probable est qu'il existe plusieurs domaines d'interaction avec Deltex au sein de la séquence d'eIF3f, et que l'absence d'un de ces domaines n'altère pas significativement cette interaction.

Par ailleurs, remarquons que, de façon très intéressante, Deltex1 est une E3 ubiquitine ligase de la famille RING, et il a été publié qu'eIF3f interagit avec une autre E3 ubiquitine ligase RING appelée TRC8 (Lee et al., 2010b). Peut-être existe-t-il une affinité particulière d'eIF3f pour cette famille d'enzyme, et peut-être cette affinité est-elle spécifique du domaine RING de ces E3 ubiquitine ligases ?

Le recrutement exclusif de Notch activé, ancré à la membrane plasmique et non clivé par la γ-secrétase que nous avons observé semble bien spécifique du complexe tripartite eIF3f/Deltex1/Notch.
En effet, Deltex est connu pour interagir avec les répétitions ankyrines du récepteur Notch (Diederich et al., 1994) présentes sur chacune des différentes formes de Notch testées dans les expériences de co-immunoprécipitation, formes avec lesquelles Deltex est donc susceptible d'être associé. Pourtant seules les formes Notch-ΔE et Notch-ΔE-LLFF sont recrutées dans ce complexe avec eIF3f.

Deltex, comme nous l'avons vu précédemment, reste un cas à part dans la voie de signalisation Notch, et son rôle de régulateur tantôt positif tantôt négatif de la voie Notch n'est pas précis.
Dans le cadre de mes résultats, en permettant le recrutement d'eIF3f et la déubiquitination du récepteur Notch activé préalablement au clivage protéolytique par le complexe γ-secrétase, Deltex1 apparaît plutôt comme un régulateur positif de la voie de signalisation Notch.

Cela reste toutefois un rôle de plus pour cette protéine qui, au final, semble agir dans la voie comme une protéine d'échafaudage qui permet le recrutement à Notch de protéines régulant son trafic ou son activation.
Effectivement, les résultats du laboratoire montrent plusieurs interactions avec des protéines impliquées plus ou moins directement dans la régulation de la voie Notch comme les β-Arrestines, Ndfip1 et 2. Ces résultats, pour l'instant non publiés, appuient l'hypothèse d'une protéine plateforme.

Le laboratoire étudie aussi la topologie de Deltex1. Deltex1 est associé aux endosomes (Chastagner et al., 2006) et d'autres résultats non publiés indiquent que Deltex1 est une protéine transmembranaire dont la topologie exacte n'est pas encore déterminée.

Si Deltex1 est effectivement une protéine membranaire associée aux endosomes, on peut penser que Deltex et Notch interagissent dans les endosomes, Deltex permettant le recrutement de protéines qui vont réguler le destin de Notch lors de son activation – ce serait le cas pour eIF3f, dans les endosomes, avant le clivage γ-secrétase – ou bien en absence d'activation. Ce modèle pourrait expliquer les rôles de régulateur tantôt positif tantôt négatif donnés à Deltex dans la voie de signalisation Notch.

L'existence d'un premier anticorps anti-Deltex1 au laboratoire permettra certainement de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action de Deltex sur le récepteur Notch.

IV. Le rôle physiologique d'eIF3f :

Nos résultats identifient eIF3f comme un régulateur positif de la voie Notch dans un contexte de coculture entre des cellules exprimant le ligand Delta-like1 et des cellules exprimant le récepteur Notch1, contexte qui récapitule l'activation physiologique de la voie de signalisation Notch depuis l'interaction ligand – récepteur jusqu'à l'activation transcriptionnelle par Notch-ICD.

Nous avons cherché à vérifier l'implication physiologique d'eIF3f dans la voie Notch en utilisant deux organismes modèles pour l'étude de la voie de signalisation Notch :

- la mouche *Drosophila melanogaster*, en collaboration avec le laboratoire de François Schweisguth à l'Institut Pasteur
- et le nématode *Caenorhabditis elegans*, en collaboration avec le laboratoire de Lionel Pintard à l'Institut Jacques Monod

Chez la mouche, nous avons utilisé des souches de drosophile portant des délétions chromosomiques incluant un des deux gènes codant pour eIF3f. Nous les avons croisées avec des drosophiles ne portant qu'un seul allèle fonctionnel du gène *notch*. Au final, nous avons analysé la descendance pour déterminer si la perte d'un gène codant pour eIF3f aggrave le phénotype Notch des drosophiles.
Nous n'avons pas observé d'altération de la voie Notch dans les drosophiles délétées pour un allèle eIF3f.

Notons toutefois que les deux protéines eIF3f, chez la drosophile, ne possèdent pas un domaine JAMM / MPN conservé. Effectivement, l'un des deux allèles ne possède pas du tout ce domaine, et l'autre – celui qui était délété dans les souches utilisées – possède un domaine JAMM / MPN dont la séquence est peu conservée et ne possède pas les acides aminés requis à une activité métalloprotéase.

Chez *C. elegans*, nous avons utilisé un siRNA ciblant l'expression de l'unique gène codant pour eIF3f et observé si cette déplétion mène à un phénotype perte de fonction Lin-12 (l'homologue de Notch chez *C. elegans*). Un siRNA contrôle ciblant l'expression d'eIF3h a été utilisé en contrôlé.
Nous n'avons pas observé d'effet spécifique d'eIF3f dans la signalisation Lin-12, la déplétion d'eIF3f menant plutôt à un effet traductionnel important identique à celui observé avec la déplétion d'eIF3h – ce que l'on peut comprendre dans la mesure où un seul gène *eIF3f* est présent dans le génome de *C. elegans*.

Nous ne sommes donc pas parvenu à démontrer un rôle physiologique d'eIF3f dans la voie de signalisation Notch chez un organisme modèle.

V. Le complexe eIF3 est un Zome à part entière :

Comme je le présentais en introduction, le complexe d'initiation de la traduction eIF3 fait partie de la famille des complexes Zomes ou PCI, avec le COP9 Signalosome et le Proteasome Lid Complex.
Ces trois complexes présentent de fortes similitudes aussi bien dans leur organisation structurale que dans l'activité catalytique protéase portée par l'une de leur deux sous-unités à domaines JAMM / MPN – pour rappel, CSN5 est une déneddylase et Rpn11 une déubiquitinase.

Le complexe eIF3 semblait presque marginal dans la mesure où aucune activité de ce genre n'était connue en son sein.
L'identification d'une activité déubiquitinase pour eIF3f, l'une de ses deux sous-unités JAMM / MPN, renforce la similarité entre ces trois complexes, et, désormais, eIF3 apparaît plus Zome que jamais.
De plus, cela ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude du complexe eIF3 ou dans l'étude comparative du groupe PCI.

VI. eIF3f agit-il au sein ou en dehors du complexe eIF3 ?

eIF3f appartenant au complexe d'initiation de la traduction eIF3, et sachant que les déubiquitinases de la classe JAMM sont souvent associées à des complexes multiprotéiques, il serait intéressant de savoir si eIF3f peut agir comme une déubiquitinase en dehors du complexe eIF3 ou bien si, au contraire, son activité DUB requiert sa présence au sein de ce complexe, sans exclure la possibilité que l'activité DUB soit effective dans les deux cas.

Dans la famille des Zomes, l'activité catalytique de Rpn11 ou de CSN5 est uniquement observée lorsque ces protéines sont associées au Proteasome Lid Complex ou au COP9 Signalosome, respectivement. CSN5 est pourtant retrouvé en dehors du COP9 signalosome, seul ou associé à quelques interactants non identifiés encore, mais n'a alors pas d'activité catalytique (Pick and Pintard, 2009).

Nous nous sommes logiquement demandé si eIF3f pouvait également être dissocié du complexe eIF3. En préparant des extraits protéiques de cellules et en séparant les complexes protéiques selon leur densité – qui reflète partiellement leur taille – sur gradient de glycérol, nous avons montré qu'il existe un pool d'eIF3f endogène en dehors du complexe eIF3, peut-être sous forme de monomère ou de dimère, ou bien associé à une autre protéine. Les deux autres sous-unités du complexe dont nous avons analysé la répartition, eIF3a et eIF3h, elles, ne semblent être retrouvées qu'au sein du complexe eIF3. Ce résultat laisse donc penser qu'il existe deux pools d'eIF3f, et que l'activité déubiquitinase portée par eIF3f est peut-être caractéristique du pool libre d'eIF3f, ou à l'inverse des protéines eIF3f associées au complexe d'initiation de la traduction, ou bien encore de chacun des deux pools.

Une activité déubiquitinase observée uniquement à l'intérieur d'eIF3 renforcerait l'homologie du complexe avec les deux autres Zomes.

Toutefois, une activité hors d'eIF3 reste envisageable, et pourrait coïncider avec certaines de nos observations.

En effet, nous avons vu que, pour observer un effet spécifique sur Notch sans une altération plus globale de la traduction cellulaire, il nous faut utiliser des shRNA à l'efficacité spécifique mais limitée.

En supposant que le pool d'eIF3f libre soit moins stable que celui associé au complexe eIF3, on peut penser qu'un shRNA dont l'efficacité est relativement moyenne sur l'expression d'eIF3f affecte principalement et premièrement le pool libre. Dans le cas où ce pool libre porterait l'activité déubiquitinase, cette hypothèse serait en accord avec nos résultats : ces shRNA seraient suffisants pour altérer la déubiquitination de Notch activé sans affecter la quantité globale d'eIF3f ni la traduction protéique.

Ces hypothèses restent à confirmer, et connaître lequel (ou lesquels) des pools d'eIF3f est catalytiquement actif pourrait apporter de nouveaux éléments permettant de préciser les mécanismes d'action de cette métalloprotéase.

VII. eIF3f agit-il sur d'autres subtrats ?

La caractérisation d'une activité déubiquitinase pour eIF3f et l'identification d'un pool libre d'eIF3f dans les cellules soulèvent de nouvelles questions, notamment concernant ses éventuels substrats autres que le récepteur Notch activé.

Nous l'avons vu un peu plus tôt, eIF3f possède un certain nombre d'interactants autres que les sous-unités du complexe eIF3, comme CDK11, 9G8, mTor, S6K1, l'E3 ubiquitine ligase MAF ou TRC8, protéines dont il régule l'activité plus ou moins directement.

Il est intéressant de se demander si l'action d'eIF3f sur ces protéines fait intervenir son activité déubiquitinase, si ces protéines sont des substrats d'eIF3f, ou encore si ces interactions impliquent le complexe eIF3 ou plutôt le pool d'eIF3f libre.

La question de la nécessité de l'activité déubiquitinase se pose également au sein du complexe eIF3 et de son rôle pour l'initiation de la traduction qui fait peut-être appel à des processus d'ubiquitination / déubiquitination mettant en jeu eIF3f.

3

LES DEUBIQUITINASES REGULANT LE TRAFIC INTRACELLULAIRE DE NOTCH NON ACTIVE

I. Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs fonctions dans le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé ?

1. **Des déubiquitinases généralement impliquées dans le trafic intracellulaire ?**
2. **Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs ubiquitinations de Notch ?**
3. **Des déubiquitinases agissant directement ou indirectement sur le récepteur Notch ?**

II. USP12, une déubiquitinase agissant sur le récepteur Notch non activé ?

1. **USP12 est impliqué dans la déubiquitination de Notch**
2. **Interaction entre USP12 et Notch**
3. **A quel stade a lieu la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ?**
4. **Quelles sont les conséquences de la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ?**

III. USP8, AMSH et USP14 : des déubiquitinases impliquées dans la voie Notch ?

LES DEUBIQUITINASES REGULANT LE TRAFIC INTRACELLULAIRE DE NOTCH NON ACTIVE

Le crible de la banque shDUB sur l'uptake du récepteur Notch non activé nous a permis d'identifier quatre déubiquitinases possiblement impliquées dans la déubiquitination de Notch, il s'agit d'USP8, AMSH, USP14 et USP12.

La validation de ces DUBs est en cours et, selon les premiers résultats obtenus dans les différents types d'expériences que nous avons réalisées, USP12 semble particulièrement se détacher des autres candidates.
Quels sont les rôles possibles de ces déubiquitinases dans la voie de signalisation Notch ? Quels éléments manquent, à ce stade, pour valider l'implication d'USP12 comme une déubiquitinase agissant sur le récepteur Notch non activé ?

I. Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs fonctions dans le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé ?

Parmi les quatre déubiquitinases identifiées par le crible, l'on retrouve USP8 / UBPY et AMSH dont le rôle dans la régulation du trafic intracellulaire de récepteurs transmembranaires a déjà été mis en évidence.
Nous l'avons effectivement déjà vu à quelques reprises, USP8 agit sur plusieurs substrats – dont l'EGFR – en favorisant la dégradation lysosomiale des récepteurs, alors qu'AMSH agit sur l'EGFR en activant son recyclage vers la membrane.

Les deux autres déubiquitinases USP12 et USP14, sont beaucoup moins connues que USP8 et AMSH, mais pourraient participer à une déubiquitination plus spécifique de Notch non activé régulant un de ces trois mécanismes du trafic intracellulaire de Notch.

USP14, en plus de son rôle lié au protéasome, déubiquitine le récepteur CXCR4 polyubiquitiné par Su(dx) / Itch / AIP4, ce qui favorise sa dégradation dans les lysosomes. Il pourrait avoir le même rôle dans la voie Notch.

USP12 n'a pas de fonction connue dans le trafic intracellulaire de protéines transmembranaires, ces seuls substrats nouvellement identifiés étant les Histones H2A et H2B (Joo et al., 2011). Une fonction dans la voie Notch reste donc plus qu'envisageable.

Le fait que plusieurs DUBs, dont certaines ont déjà une fonction connue, soient retrouvées comme des candidates dans la voie Notch soulève plusieurs points intéressants.

1. Des déubiquitinases généralement impliquées dans le trafic intracellulaire ?

Tout d'abord, l'identification d'USP8 et de AMSH comme candidates dans la voie Notch suggère que ces deux déubiquitinases – dont la localisation endosomale et l'association avec le complexe ESCRT-0 via la protéine STAM sont bien connues (Wright et al., 2011) – agissent probablement de façon peu spécifique sur un certain nombre de protéines ubiquitinées en cours de tri dans les endosomes précoces.

Ces deux DUBs pourraient également réguler le trafic des protéines ubiquitinées de façon indirecte et non spécifique en déubiquitinant les deux protéines constituant le complexe ESCRT-0, à savoir STAM et Hrs, dont l'activité est modulée par leur ubiquitination. Cela semble être le cas dans la régulation du trafic de CXCR4 par ces deux déubiquitinases, selon les résultats d'un même laboratoire (Berlin et al., 2010a; Sierra et al., 2010).

2. Plusieurs déubiquitinases pour plusieurs ubiquitinations de Notch ?

Ensuite, d'un point de vue Notch-centrique, on peut penser que le récepteur Notch non activé peut être le substrat de plusieurs déubiquitinases dont les conséquences sur son trafic sont éventuellement différentes, ces DUBs pouvant agir sur des types différents d'ubiquitination.

Effectivement, si la polyubiquitination Itch-dépendante est maintenant bien décrite, tout comme son rôle dans la dégradation lysosomiale de Notch, il n'est pas exclu que le récepteur subisse d'autres ubiquitinations. En particulier, des polyubiquitinations avec d'autres types de chaînes que les K29, catalysées par d'autres E3 ubiquitine ligases que Su(dx) / Itch / AIP4, pourraient être effectuées sur Notch. D'ailleurs, des résultats préliminaires du laboratoire vont dans ce sens.

Ces différentes ubiquitinations pourraient appeler l'action de plusieurs déubiquitinases, dont USP8 et AMSH.

Concernant les processus potentiellement régulés par ces ubiquitinations / déubiquitinations, on pense à la dégradation lysosomiale ou au recyclage vers la membrane du récepteur endocytosé.

On peut penser aussi que l'endocytose de Notch est liée à une ubiquitination, préalable à la polyubiquitination par Su(dx) / Itch / AIP4, qui pourrait être également contrariée par l'action d'une déubiquitinase. Mais jusqu'à présent, la nécessité de l'ubiquitination pour les étapes précoces de l'internalisation de Notch n'a pas été démontrée.

Un crible d'une banque d'ARN interférent ciblant les E3 ubiquitine ligases – que nous possédons au laboratoire – dans le même uptake en immunofluorescence que celui que j'ai utilisé pourrait nous permettre d'identifier d'autres E3 ubiquitine ligases impliquées dans l'endocytose et le trafic du récepteur Notch non activé, ouvrant les portes à plusieurs étapes de déubiquitination.

3. Des déubiquitinases agissant directement ou indirectement sur le récepteur Notch ?

L'on peut penser que, parmi les déubiquitinases identifiées par le crible, certaines déubiquitinent à proprement parler le récepteur Notch, qui serait un substrat direct, alors que d'autres agissent indirectement sur le trafic de Notch par leur action sur d'autres protéines.

Ces autres protéines pourraient être généralement impliquées dans le trafic intracellulaire, comme c'est le cas des protéines Hrs et STAM dont on a vu qu'elles sont déubiquitinées par USP8 et AMSH.

Il pourrait également s'agir de protéines agissant spécifiquement sur Notch.
En particulier les E3 ubiquitine ligases ubiquitinant Notch, et régulant ainsi son trafic, ont peut-être une activité dépendante de leur ubiquitination. De cette manière, des déubiquitinases agissant sur ces E3 ubiquitine ligases pourraient réguler indirectement le niveau d'ubiquitination et en conséquence le trafic du récepteur Notch non activé.
Il ne faut pas exclure l'existence d'autres cibles directes que les E3 ubiquitine ligases pour les déubiquitinases, cibles susceptibles de réguler le destin intracellulaire de Notch. On peut penser à des protéines adaptatrices permettant de recruter Notch à la machinerie d'endocytose et de tri cellulaire, ou de recruter des E3 ubiquitine ligases au récepteur Notch, même si, pour l'instant, l'implication de telles molécules n'est pas connue.

II. USP12, une déubiquitinase agissant sur le récepteur Notch non activé ?

Dès le début de l'étude des quatre déubiquitinases identifiées par le crible, les résultats de nos premières expériences ont mis en évidence USP12 comme étant une bonne candidate dans la régulation du récepteur Notch non activé.
A ce stade de l'étude d'USP12, quelles sont les premières conclusions possibles, que reste-t-il à montrer pour affirmer qu'USP12 régule le trafic intracellulaire de Notch ?

1. USP12 est impliqué dans la déubiquitination de Notch :

Nos résultats ont montré par diverses observations qu'USP12 est impliqué dans la régulation de l'ubiquitination du récepteur Notch non activé.
En effet, la surexpression d'USP12 entraîne une très forte diminution de la polyubiquitination de Notch-FL.
Par ailleurs, on observe au contraire une accumulation de formes polyubiquitinées de Notch-FL avec :

- un shUSP12 et un siUSP12 (ciblant deux séquences différentes sur l'ARNm d'USP12)
- la surexpression d'une forme catalytiquement inactive d'USP12 (USP12-DN, dont la Cystéine du site actif est mutée en Sérine)
- un shUAF1 (ciblant l'expression du co-facteur indispensable à l'activité d'USP12) seul ou co-exprimé avec le shUSP12

L'ensemble de ces résultats montre qu'USP12 est capable d'inhiber la polyubiquitination de Notch-FL, via son domaine catalytique USP et son activité catalytique qui requiert UAF1.

Si l'implication d'USP12 et de son activité DUB dans l'ubiquitination de Notch-FL est validée, il est impossible d'affirmer qu'USP12 déubiquitine directement le récepteur Notch. On peut effectivement penser qu'USP12, en déubiquitinant une autre protéine qui régule la voie Notch – comme par exemple une E3 ubiquitine ligase de Notch – empêche la polyubiquitination de Notch-FL sans pour autant agir directement comme une déubiquitinase sur le récepteur.

Le seul moyen d'affirmer qu'USP12 déubiquitine directement Notch-FL est d'utiliser une expérience de déubiquitination *in vitro*. Cette expérience est prévue prochainement, en

collaboration avec Martin Cohn de l'Université d'Oxford au Royaume-Uni. Nous testerons l'effet de l'expression d'USP12 ou d'USP12-DN sur la déubiquitination *in vitro* de Notch-FL polyubiquitiné, substrat que nous aurons préalablement purifié.

2. Interaction entre USP12 et Notch :

Nous n'avons pas observé d'interaction entre USP12 et Notch-FL dans des expériences de co-immunoprécipitation, même en utilisant la forme mutante USP12-DN susceptible de stabiliser l'association enzyme – substrat généralement connue pour être très labile.
Cela peut avoir plusieurs significations ou explications :

- il existe effectivement une interaction directe entre Notch et USP12, mais elle n'est pas observable dans les expériences de co-immunoprécipitation effectuées
- il existe une interaction entre Notch et USP12, mais celle-ci dépend d'une protéine intermédiaire qui permet le recrutement de la déubiquitinase à son substrat, intermédiaire qui manque dans nos expériences
- il n'y a pas d'interaction entre Notch et USP12, et l'effet observé sur l'ubiquitination de Notch est indirect via l'action d'USP12 sur un autre protéine cible impliquée dans la voie Notch

Nous avons alors testé l'interaction d'USP12 avec un certain nombre de protéines pouvant servir au recrutement de Notch-FL à USP12 ou bien pouvant être des substrats d'USP12.

Nous avons observé une interaction d'USP12 et de son co-facteur UAF1 avec les E3 ubiquitine ligases Su(dx) / Itch / AIP4 et Deltex1, toutes deux connues pour être des régulateurs de la voie Notch. En particulier pour Su(dx) / Itch / AIP4, cette interaction semble spécifique dans la mesure où les autres E3 ubiquitine ligases de la même famille – Nedd4 et Nedd4.2 – dont les séquences peptidiques sont très proches de celle de Su(dx) / Itch / AIP4, n'interagissent pas avec USP12.

Toutefois, ces interactions ne permettent pas de recruter Notch-FL à USP12 dans un complexe tripartite dans lequel Deltex1 ou Su(dx) / Itch / AIP4 sert d'intermédiaire entre l'enzyme et le substrat.

Et par ailleurs, d'après nos observations, USP12 ne semble pas agir sur le niveau d'ubiquitination de Deltex1 et de Su(dx) / Itch / AIP4, ces E3 ubiquitine ligases n'étant donc

pas des cibles directes d'USP12. En supposant que le niveau d'ubiquitination de ces enzymes contrôle leur activité catalytique, cela élimine l'hypothèse qu'USP12 inhibe la polyubiquitination de Notch-FL par ces deux E3 ubiquitine ligases.

Nous n'avons pas déterminé le rôle éventuel de ces interactions dans l'effet d'USP12 sur Notch.

Puisque les interactions avec Deltex1 et Su(dx) / Itch / AIP4 n'ont pas été concluantes, nous avons commencé à tester quelques autres protéines pour leur capacité à interagir avec USP12, en particulier les protéines impliquées dans l'endocytose ou celle de la machinerie ESCRT.

Ces protéines sont susceptibles d'interagir avec Notch lors du recrutement du récepteur à la machinerie ESCRT et de son trafic intracellulaire – même si ces interactions ne sont pas proprement décrites – et pourraient servir d'intermédiaires pour recruter USP12 au récepteur Notch. Elles pourraient également être les substrats d'USP12 et voir leurs niveaux d'ubiquitination réguler en conséquence le trafic de Notch.
USP12 agirait dans ces cas comme USP8 et AMSH qui, rappelons-le, sont recrutés à l'EGFR, leur substrat, via leur interaction avec la protéine STAM mais qui sont également capables de déubiquitiner STAM et de réguler ainsi indirectement le trafic du récepteur CXCR4.

A plus grande échelle, un moyen de caractériser des protéines qui interagissent avec USP12 (substrats d'USP12 ou intermédiaires entre USP12 et Notch), serait d'effectuer des cribles double hybride ou de déterminer l'interactome d'USP12, ce qui demande un investissement plus poussé.

Il semble donc difficile de montrer une interaction entre Notch et USP12, et peut-être qu'au final, seule la démonstration d'une activité DUB in vitro sur Notch-FL permettra d'affirmer qu'USP12 est recruté au récepteur Notch non activé.

Que l'on maintienne l'hypothèse qu'USP12 est directement impliqué dans la déubiquitination du récepteur Notch non activé, ou bien que le niveau d'ubiquitination de Notch soit indirectement régulé par USP12, il reste un certain nombre de points à éclaircir.

3. A quel stade a lieu la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ?

Dans le crible de la banque shDUB, le résultat observé avec le pool shUSP12 est une accumulation de Notch dans des endosomes et une absence de dégradation dans les lysosomes.
Il nous faut préciser la nature de ces endosomes pour déterminer à quel stade du trafic intracellulaire du récepteur intervient la déubiquitination de Notch-FL par USP12.

En utilisant les cellules U2OS-FLHA transfectées avec un shUSP12 ou un siUSP12, ou bien des cellules exprimant stablement un shUSP12, nous devrions pouvoir observer des colocalisations de Notch-FL avec des marqueurs d'un type donné d'endosomes, et ainsi de caractériser la nature des structures où Notch non activé est accumulé et où se produit probablement la déubiquitination – endosomes précoces, de tri, de recyclage, MVBs ?

La présence d'USP12 associé à ces mêmes structures serait idéale, mais les premières observations, réalisées en conditions de surexpression, semblent aller dans le sens d'une localisation cytoplasmique d'USP12. Il n'est toutefois pas exclu que la localisation d'USP12 dépende de son recrutement à ses substrats : ainsi retrouve-t-on USP12 nucléaire lorsqu'il déubiquitine les histones H2A et H2B (Joo et al., 2011).

Les cellules Knock Out pour Itch dont nous disposons au laboratoire pourraient être utiles pour préciser si USP12 agit avant ou après Itch. Dans ces cellules, la dégradation lysosomiale de Notch est inhibée et le récepteur s'accumule dans des endosomes. Si la transfection d'un shUSP12 ou d'un siUSP12 mène à un effet différent, cela indiquera probablement qu'USP12 agit avant la polyubiquitination de Notch par Su(dx) / Itch / AIP4

4. Quelles sont les conséquences de la déubiquitination de Notch dépendante d'USP12 ?

L'identification du compartiment subcellulaire dans lequel Notch-FL est accumulé lorsque l'expression d'USP12 est inhibée pourra peut-être nous renseigner sur le processus contrôlé par cette déubiquitination au cours du trafic intracellulaire de Notch non activé.

USP12 peut éventuellement être nécessaire au trafic du récepteur entre les endosomes de tri et les corps multivésiculaires, et finalement être requis pour la dégradation lysosomiale

de Notch. USP12 peut également intervenir pour le recyclage de Notch-FL vers la membrane plasmique.

Dans tous les cas, nous devrons déterminer les conséquences de cette déubiquitination sur la voie de signalisation Notch d'un point de vue plus global.

D'une part, il faudra préciser si la quantité globale de récepteur Notch exprimé dans les cellules est modifiée par le knock-down d'USP12. Les résultats observés dans les expériences de purification de protéines ubiquitinées suggèrent que la quantité totale de Notch-FL non ubiquitiné n'est pas modifiée par USP12, USP12-DN, le siUSP12 ou les shUSP12 et shUAF1.

Il faudra toutefois s'intéresser plus précisément à la quantité de Notch exprimé à la surface des cellules et potentiellement activable et vérifier si cette quantité est régulée par USP12.

Des expériences de biotinylation des protéines de surface, éventuellement suivies de cinétique d'endocytose ou de recyclage, devraient nous permettre de quantifier Notch à la surface des cellules

D'autre part, en liaison avec ce dernier point, il faudra savoir si l'activation du récepteur Notch est modifiée en absence d'USP12. Nous pourrons utiliser les systèmes de co-culture cellules Notch / cellules Delta-like pour étudier cela.

III. USP8, AMSH et USP14 : des déubiquitinases impliquées dans la voie Notch ?

Depuis les résultats obtenus avec les pools de shRNA ciblant l'expression de ces deux DUBs lors du crible de la banque shDUB, nous n'avons pas obtenu de résultat suggérant un rôle d'USP8 ou USP14 dans la déubiquitination de Notch-FL non activé : aucun effet sur l'ubiquitination de Notch, pas d'interaction…

Concernant AMSH, nous avons observé un effet sur l'ubiquitination de Notch-FL uniquement lors de la surexpression de la DUB, mais pas d'effet des shRNA ciblant son expression. Notons que nous n'avons pas pu contrôler l'efficacité des shRNAs issus du pool sur l'expression de la protéine endogène. Nous n'avons pas vu non plus d'interaction entre Notch et AMSH.

Bien que laissées de côté, jusqu'à maintenant, pour étudier plus précisément USP12, il ne faut pas définitivement enterrer ces trois déubiquitinases, et en particulier AMSH, qui,

comme c'est parfois le cas dans la régulation du trafic intracellulaire d'autres récepteurs membranaires comme CXCR4, ont parfois un rôle plus global dans le trafic sans forcément modifier le niveau d'ubiquitination de ces récepteurs, mais plutôt en agissant sur l'ubiquitination des protéines des complexes ESCRT.

Tout comme pour USP12, il faudra valider l'effet observé avec les pools de shRNA lors du crible, déterminer à quel stade du trafic intracellulaire ces DUBs interviennent, et quelles sont les conséquences de leur action sur la voie Notch (quantité de récepteur à la membrane, activation de Notch).

4

LA BANQUE SHDUB ET LES CRIBLES CHOISIS POUR IDENTIFIER LES DEUBIQUITINASES IMPLIQUEES DANS LA VOIE NOTCH

I. La banque shDUB

II. Les cribles en immunofluorescence

LA BANQUE SHDUB ET LES CRIBLES CHOISIS POUR IDENTIFIER LES DEUBIQUITINASES IMPLIQUEES DANS LA VOIE NOTCH

Le matériel et les stratégies choisis pour identifier les déubiquitinases régulant la voie de signalisation Notch avaient toute leur importance dans le projet de thèse. Quelles sont leurs limites ?

I. La banque shDUB :

La banque de shRNA ciblant les 91 déubiquitinases connues ou putatives du génome humain a été construite par le laboratoire de René Bernards, au Netherlands Cancer Institute d'Amsterdam (Dirac et al., 2005).

Les déubiquitinases ciblées ont été identifiées par homologie de séquence entre les domaines catalytiques. Pour chacune d'entre elles, le laboratoire a sélectionné quatre séquences cibles spécifiques et chacune a été clônée dans un vecteur pSuper. Finalement, les quatre vecteurs ont été rassemblés en un pool ciblant l'expression de la même déubiquitinase. La banque shDUB est donc constituée de 91 pools de 4 shRNAs.

La première limite de l'utilisation de cette banque est que son efficacité sur l'extinction de l'expression des DUBs cibles n'a jamais été testée extensivement. Lorsque nous utilisons la banque, nous ne savons donc pas si l'expression de chaque protéine cible considérée est diminuée, et encore moins en quelle proportion.
Toutefois, avant le début du projet, cette banque avait déjà été utilisée, en particulier par le laboratoire de René Bernards, et avait notamment permis l'identification de déubiquitinases comme CYLD agissant dans la voie de signalisation NF-κB (Brummelkamp et al., 2003).

La deuxième limite de cette banque réside dans l'efficacité de la transfection des shRNA dans les cellules utilisées pour les cribles. Il n'y a pas moyen de déterminer quelles cellules ont reçu des shRNA, et encore moins dans quelles cellules la quantité des shRNA efficaces est suffisante pour permettre une extinction de l'expression des DUB cibles.

En conséquence, la pénétrance de l'effet des pools de shRNA est difficilement appréhendable, tant elle peut être faible et varier d'un point à l'autre. La sélection des candidats s'est essentiellement basée sur deux critères : la reproductibilité de l'effet observé

avec les pools de shRNA, et le test de shRNA isolés (issus des pools considérés ou bien différents).

II. Les cribles en immunofluorescence :

Dans le but d'identifier des déubiquitinases qui régulent la voie de signalisation Notch, nous avons mis au point deux cribles de la banque shDUB, l'un concernant la voie d'activation du récepteur Notch, l'autre se rapportant au trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé.

Le crible en immunofluorescence choisi pour étudier la déubiquitination du récepteur Notch activé nous permet de :

- visualiser si la forme Notch-ICD est produite par la coupure γ-secrétase de Notch-ΔE
- et vérifier la localisation intracellulaire de Notch-ICD

Le crible nous permet donc d'identifier les déubiquitinases potentiellement impliquées dans la production de Notch-ICD par la γ-secrétase, la libération de Notch-ICD des vésicules d'endocytose et l'entrée de Notch-ICD dans le noyau.
Par contre, il ne nous permet pas de couvrir les étapes nucléaires de la voie Notch, comme l'activité transcriptionnelle de Notch-ICD, son interaction avec ses co-facteurs de transcription, et sa stabilité.

Le crible idéal aurait été d'étudier l'activité transcriptionnelle de Notch-ICD sur un gène rapporteur dans des cellules transfectées avec chacun des pools de la banque shDUB, cette activité étant le reflet de l'ensemble des étapes préalables de la voie d'activation Notch. Ce crible aurait permis l'identification des déubiquitinases éventuellement impliquées dans chacune des étapes en amont de l'activation transcriptionnelle par Notch-ICD.
A l'époque, la technique de coculture entre des cellules Delta-like – cellules Notch n'était pas maîtrisée dans le laboratoire, mais, a posteriori, celle-ci semble la plus adaptée pour couvrir au maximum les étapes de la voie d'activation physiologique de la voie Notch.

Le crible choisi semblait le meilleur compromis quant au nombre d'étapes de la signalisation étudiées et aux compétences techniques pour le réaliser.

Le crible utilisé pour déterminer quelles déubiquitinases régulent le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé nous permet de :

- marquer le récepteur Notch exprimé à la membrane plasmique à un moment donné

- et suivre son endocytose et sa dégradation lysosomiale

Il rend possible l'identification de DUB impliquées dans l'endocytose du récepteur Notch et dans son trafic intracellulaire (tri, recyclage vers la membrane plasmique, dégradation dans les lysosomes…).

Effectivement, puisque l'on peut observer le récepteur non activé depuis la membrane jusqu'à sa disparition par dégradation, ce crible couvre toutes les étapes du trafic intracellulaire, tous les processus envisageables après l'internalisation de Notch.

La limite du crible est que, dans le cas d'une perturbation du trafic intracellulaire du récepteur Notch avec un pool de shRNA, il ne précise pas quelle étape est dérégulée.

C'est d'ailleurs le cas de figure retrouvé lors de l'identification des quatre déubiquitinases candidates, dont la déplétion par shRNA, nous l'avons vu, mène dans tous les cas à une accumulation de Notch dans des endosomes, sans que la nature de ces endosomes ni le processus intracellulaire affecté (dégradation, recyclage) ne soient identifiables.

5

BILAN GENERAL

BILAN GENERAL

Dans le but d'identifier des déubiquitinases qui régulent la voie de signalisation Notch, nous avons mis au point deux protocoles nous permettant de tester une banque de shRNA ciblant l'expression de toutes les déubiquitinases connues ou putatives du génome humain.
Chacun des protocoles porte sur un aspect particulier de la voie de signalisation Notch lié à un processus d'ubiquitination déjà établi :

- la voie d'activation Notch, mettant en jeu une monoubiquitination du récepteur Notch activé
- le trafic intracellulaire de Notch non activé, mettant en jeu au moins une polyubiquitination du récepteur

Les deux cribles ont été réalisés et ont permis la caractérisation d'au moins une déubiquitinase agissant comme un modulateur de la voie d'activation de Notch, et de quatre déubiquitinases candidates pour la régulation du trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé.
Concernant l'activation de Notch, nous avons montré qu'eIF3f, une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3, qui n'était pas connue jusque là pour être une protéase, porte une activité déubiquitinase intrinsèque. Cette activité catalytique est impliquée dans la régulation positive de la voie Notch. En effet, eIF3f est recrutée au récepteur Notch via son intercation avec l'E3 ubiquitine ligase et agit sur le récepteur Notch préalablement à la coupure γ-secrétase, favorisant ainsi la production de la forme transcriptionnellement active de Notch.
Le trafic intracellulaire du récepteur Notch non activé, quant à lui, pourrait être régulé par l'action de plusieurs déubiquitinases agissant plus ou moins directement, plus ou moins spécifiquement sur Notch, voire à des étapes différentes du trafic : USP8, AMSH, USP14 et USP12.

L'action des déubiquitinases sur le récepteur Notch constitue, au même titre que les étapes d'ubiquitination, de nouveaux points de contrôle importants de la voie de signalisation Notch. Les déubiquitinases peuvent contrôler la voie d'activation Notch, mais encore la quantité de récepteur Notch potentiellement activable à la surface des cellules.

Ces processus de déubiquitination rendent plus complexe et plus fine la modulation de la voie de signalisation Notch, selon le niveau d'expression des déubiquitinases, la régulation de leur activité (dont on ne sait pas forcément grand chose), et la somme des autres régulateurs de la voie Notch présents, autrement dit, comme toujours avec Notch, selon le contexte physiologique considéré.

Qui plus est, comme pour tous les régulateurs d'une voie de signalisation essentielle, des altérations du fonctionnement de ces déubiquitinases pourraient être responsables de dérégulations de la voie Notch (hyperactivation, inhibition) impliquées dans les diverses pathologies dont j'ai pu décrire quelques exemples.

De ce point de vue, le cas eIF3f est particulier, dans la mesure où un dysfonctionnement d'eIF3f (mutations par exemple) risque d'avoir des conséquences générales sévères sur la traduction et la viabilité cellulaire plus que des effets spécifiques sur la voie Notch. Sauf si l'activité déubiquitinase est affectée et que celle-ci n'est pas nécessaire à l'action d'eIF3f dans l'initiation de la traduction.

Les études ultérieures, se concentrant sur l'action de ces déubiquitinases dans la voie Notch ou bien étudiant la voie Notch plus généralement, permettront peut-être de déterminer les aspects physiologiques et physiopathologiques des processus de déubiquitination dans la voie de signalisation Notch.

BIBLIOGRAPHIE

Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N., Pan, H., Haltiwanger, R., and Bellen, H. (2008). Rumi Is a CAP10 Domain Glycosyltransferase that Modifies Notch and Is Required for Notch Signaling. Cell *132*, 247-258.

Amati, B., and Sanchez-Arevalo Lobo, V.J. (2007). MYC degradation: deubiquitinating enzymes enter the dance. Nat Cell Biol *9*, 729-731.

Ambroggio, X.I., Rees, D.C., and Deshaies, R.J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. PLoS Biol *2*, E2.

Amerik, A., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Cell Res *1695*, 189.

Aravind, L. (2001). The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. Trends Biochem Sci *26*, 273-275.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. Science *268*, 225-232.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M., and Lake, R. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science *284*, 770-776.

Ascano, J., Beverly, L., and Capobianco, A. (2003). The C-terminal PDZ-Ligand of JAGGED1 Is Essential for Cellular Transformation. J Biol Chem *278*, 8771-8779.

Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis Tsakonas, S., and Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by Dishevelled. Science *271*, 1826-1832.

Balakirev, M.Y., Tcherniuk, S.O., Jaquinod, M., and Chroboczek, J. (2003). Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. EMBO Rep *4*, 517-522.

Bardin, A., and Schweisguth, F. (2006). Bearded Family Members Inhibit Neuralized-Mediated Endocytosis and Signaling Activity of Delta in Drosophila. Dev Cell *10*, 245-255.

Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J., and Haass, C. (1997). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate Caenorhabditis elegans Notch signalling independently of proteolytic processing. Genes Funct *1*, 149-159.

Berlin, I., Higginbotham, K.M., Dise, R.S., Sierra, M.I., and Nash, P.D. (2010a). The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome. J Biol Chem *285*, 37895-37908.

Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P.D. (2010b). Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex. J Biol Chem *285*, 34909-34921.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. Annu Rev Cell Dev Biol *22*, 339-373.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 207-217.

Blanpain, C., Lowry, W.E., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. Genes Dev *20*, 3022-3035.

Blaumueller, C., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. Cell *90*, 281-291.

Bray, S., and Bernard, F. (2010). Notch targets and their regulation. Curr Top Dev Biol *92*, 253-275.

Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 678-689.

Brooks, C.L., Li, M., and Gu, W. (2004). Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export? Cell Cycle *3*, 436-438.

Brou, C. (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. Exp Cell Res *315*, 1549-1555.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J., Cumano, A., Roux, P., Black, R., and Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell *5*, 207-216.

Browning, K.S., Gallie, D.R., Hershey, J.W., Hinnebusch, A.G., Maitra, U., Merrick, W.C., and Norbury, C. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. Trends Biochem Sci *26*, 284.

Brummelkamp, T., Nijman, S., Dirac, A., and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-[kappa]B. Nature *424*, 797-805.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science *296*, 550-553.

Bryant, J., Goodyear, R.J., and Richardson, G.P. (2002). Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. Br Med Bull *63*, 39-57.

Burnett, B., Li, F., and Pittman, R.N. (2003). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. Hum Mol Genet *12*, 3195-3205.

Busseau, I., Diederich, R.J., Xu, T., and Artavanistsakonas, S. (1994). A member of the notch group of interacting loci, deltex encodes a cytoplasmic basic protein. Genetics *136*, 585-596.

Cayli, S., Klug, J., Chapiro, J., Fröhlich, S., Krasteva, G., Orel, L., and Meinhardt, A. (2009). COP9 Signalosome Interacts ATP-dependently with p97/Valosin-containing Protein (VCP) and Controls the Ubiquitination Status of Proteins Bound to p97/VCP. J Biol Chem *284*, 34944-34953.

Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2006). Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. EMBO Rep *7*, 1147-1153.

Chastagner, P., Israël, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. PLoS ONE *3*, e2735.

Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M., Feder, J., Nelkin, B., Baylin, S., and Ball, D. (1997). Conservation of the drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer - a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. Proc Natl Acad Sci USA *94*, 5355-5360.

Chen, W., and Casey Corliss, D. (2004). Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. Dev Biol *267*, 361-373.

Chen, X., Zhang, B., and Fischer, J.A. (2002). A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. Genes Dev *16*, 289-294.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Cell *79*, 13-21.

Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A.L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. Bioessays *22*, 442-451.

Clague, M.J., and Urbe, S. (2006). Endocytosis: the DUB version. Trends Cell Biol *16*, 551-559.

Cohn, M.A., Kee, Y., Haas, W., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2009). UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. J Biol Chem *284*, 5343-5351.

Conlon, R.A., Reaume, A.G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. Development *121*, 1533-1545.

Cornell, M., Evans, D., Mann, R., Fostier, M., Flasza, M., Monthatong, M., Artavanis-Tsakonas, S., and Baron, M. (1999). The Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene, a regulator of the Notch receptor signaling pathway, is an E3 class ubiquitin ligase. Genetics *152*, 567-576.

Coumailleau, F., Furthauer, M., Knoblich, J.A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. Nature *458*, 1051-1055.

Csibi, A., Cornille, K., Leibovitch, M.-P., Poupon, A., Tintignac, L.A., Sanchez, A.M.J., and Leibovitch, S.A. (2010). The Translation Regulatory Subunit eIF3f Controls the Kinase-Dependent mTOR Signaling Required for Muscle Differentiation and Hypertrophy in Mouse. PLoS ONE *5*, e8994.

Csibi, A., Leibovitch, M.P., Cornille, K., Tintignac, L.A., and Leibovitch, S.A. (2009). MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. J Biol Chem *284*, 4413-4421.

D'souza, B., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. Oncogene *27*, 5148-5167.

de la Pompa, J., Wakeham, A., Correia, K., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T., Rossant, J., and Conlon, R. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. Development *124*, 1139-1148.

De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active [gamma]-Secretase Complex. Neuron *38*, 9-12.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J., Schroeter, E., Schrijvers, V., Wolfe, M., Ray, W., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature *398*, 518-522.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature *391*, 387-390.

Deblandre, G.A., Lai, E.C., and Kintner, C. (2001). Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. Dev Cell *1*, 795-806.

Deftos, M.L., He, Y.W., Ojala, E.W., and Bevan, M.J. (1998). Correlating notch signaling with thymocyte maturation. Immunity *9*, 777-786.

Demehri, S., and Kopan, R. (2009). Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate. Development *136*, 891-896.

Demehri, S., Liu, Z., Lee, J., Lin, M.H., Crosby, S.D., Roberts, C.J., Grigsby, P.W., Miner, J.H., Farr, A.G., and Kopan, R. (2008). Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. PLoS Biol *6*, e123.

Demehri, S., Turkoz, A., and Kopan, R. (2009). Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. Cancer Cell *16*, 55-66.

Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. Annu Rev Biochem *78*, 399-434.

Diederich, R., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. Development *120*, 473-481.

Dirac, A.M., Nijman, S.M., Brummelkamp, T.R., and Bernards, R. (2005). Functional annotation of deubiquitinating enzymes using RNA interference. Methods Enzymol *398*, 554-567.

Doldan, A., Chandramouli, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Cunningham, J.T., Nelson, M.A., and Shi, J. (2008a). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. Mol. Carcinog. *47*, 235-244.

Doldan, A., Chandramouli, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Leong, S.P.L., Nelson, M.A., and Shi, J. (2008b). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. Mol. Carcinog. *47*, 806-813.

Donoviel, D., Hadjantonakis, A., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P., and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. Genes & Development *13*, 2801-2810.

Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument, B., Tempst, P., Honjo, T., and Vales, L. (1994). The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. Mol Cell Biol *14*, 3310-3319.

Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D., and Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. Genes Dev *18*, 2474-2478.

A B C D ***E*** *F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

Ellisen, L., Bird, J., West, D., Soreng, A., Reynolds, T., Smith, S., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell *66*, 649-661.

Emerick, K.M., Rand, E.B., Goldmuntz, E., Krantz, I.D., Spinner, N.B., and Piccoli, D.A. (1999). Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. Hepatology *29*, 822-829.

A B C D E ***F*** *G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*

Ferrando, A.A. (2009). The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 353-361.

Fischer, A., and Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. Nucleic Acids Res *35*, 4583-4596.

Fisher, A.L., Ohsako, S., and Caudy, M. (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. Mol Cell Biol *16*, 2670-2677.

Fostier, M., Evans, D., Artavanis-Tsakonas, S., and Baron, M. (1998). Genetic characterization of the Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene: A regulator of Notch signaling. Genetics *150*, 1477-1485.

Friedmann, D.R., and Kovall, R.A. (2010). Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. Protein Sci *19*, 34-46.

Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C., and Jones, K.A. (2002). Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. Genes Dev *16*, 1397-1411.

Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. Mol Cell *16*, 509-520.

Gho, M., Bellaïche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the Drosophila microchaete lineage : a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. Development *126*, 3573-3584

Godin, I., and Cumano, A. (2007). [Hematopoietic stem cells: where do they come from at last?]. Med Sci (Paris) *23*, 681-684.

Goodrich, J.S., Clouse, K.N., and Schupbach, T. (2004). Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in Drosophila oogenesis. Development *131*, 1949-1958.

Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. Nat Struct Mol Biol *14*, 295-300.

Greenwald, I. (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. Curr Opin Genet Dev *4*, 556-562.

Greenwald, I. (1998). LIN-12/NOTCH SIGNALING - LESSONS FROM WORMS AND FLIES [Review]. Genes Dev *12*, 1751-1762
Gridley, T. (2010). Notch signaling in the vasculature. Curr Top Dev Biol *92*, 277-309.

Gulino, A., Di Marcotullio, L., and Screpanti, I. (2010). The multiple functions of Numb. Exp Cell Res *316*, 900-906.

Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A., and Israel, A. (2001). Functional Interaction between SEL-10, an F-box Protein, and the Nuclear Form of Activated Notch1 Receptor. J. Biol. Chem. *276*, 34371-34378.

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct {gamma}-secretase cleavage of activated Notch receptor. J Cell Biol *166*, 73-83.

Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. EMBO J *24*, 3353-3359.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. Nat Cell Biol *5*, 461-466.

Haines, N., and Irvine, K.D. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 786-797.

Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R., and Tsujimoto, Y. (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. Development *126*, 3415-3424.

Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. EMBO J *25*, 4524-4536.

Hansson, E.M., Lendahl, U., and Chapman, G. (2004). Notch signaling in development and disease. Semin Cancer Biol *14*, 320-328.

Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. Development *122*, 161-171.

Hershey, J.W.B., and Merrick W.C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B. (eds), Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 33–88.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. Annu Rev Biochem *67*, 425-479.

Hicks, C., Johnston, S., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T., and Weinmaster, G. (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. Nat Cell Biol *2*, 515-520.

Higareda-Mendoza, A.E., and Pardo-Galvan, M.A. (2010). Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. Cell Div *5*, 10.

Hinnebusch, A.G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem Sci *31*, 553-562.

Hock, A., and Vousden, K.H. (2010). Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. Int J Biochem Cell Biol *42*, 1618-1621.

Hoflinger, S., Kesavan, K., Fuxa, M., Hutter, C., Heavey, B., Radtke, F., and Busslinger, M. (2004). Analysis of Notch1 Function by In Vitro T Cell Differentiation of Pax5 Mutant Lymphoid Progenitors. J Immunol *173*, 3935-3944.

Honjo, T. (1996). The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. Genes Cells *1*, 1-9.

Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T., Go, M., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). Drosophila Deltex mediates Suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. Development *131*, 5527-5537.

Horvath, C.A., Vanden Broeck, D., Boulet, G.A., Bogers, J., and De Wolf, M.J. (2007). Epsin: inducing membrane curvature. Int J Biochem Cell Biol *39*, 1765-1770.

Hotton, S.K., and Callis, J. (2008). Regulation of cullin RING ligases. Annu Rev Plant Biol *59*, 467-489.

Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. Nat Immunol *5*, 638-644.

Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. Nature *386*, 717-721.

Hsieh, J., Zhou, S., Chen, L., Young, D., and Hayward, S. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 23-28.

Hsieh, J.D., and Hayward, D. (1995). Masking of the CBF1/RBP-Jk transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. Science *268*, 560-563.

Huang, X., and Saint-Jeannet, J.P. (2004). Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. Dev Biol *275*, 1-11.

Hubbard, E., Wu, G., Kitajewski, J., and Greenwald, I. (1997). Sel-10 a negative regulator of lin-12 activity in Caenorhabditis elegans, encodes a member of the CDC4 family of proteins. Genes Dev *11*, 3182-3193.

Huppert, S., Le, A., Schroeter, E., Mumm, J., Saxena, M., Milner, L., and Kopan, R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. Nature *405*, 966-970.

Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. Biochem J *399*, 361-372.

Irvine, K.D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. Curr Opin Genet Dev *9*, 434-441.

Irvine, K.D., and Vogt, T.F. (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. Curr Opin Cell Biol *9*, 867-876.

Iso, T., Sartorelli, V., Poizat, C., Iezzi, S., Wu, H.Y., Chung, G., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2001). HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. Mol Cell Biol *21*, 6080-6089.

Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a000158.

Itoh, M., Palardy, G., Jiang, Y.-J., Maust, D., Yeo, S.-Y., Lorick, K., Wright, G., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A., Lewis, J.*, et al.* (2003). Mind Bomb Is a Ubiquitin Ligase that Is Essential for Efficient Activation of Notch Signaling by Delta. Developmental Cell *4*, 67-82.

Izon, D., Aster, J., He, Y., Weng, A., Karnell, F., Patriub, V., Xu, L., Bakkour, S., Rodriguez, C., Allman, D., and Pear, W. (2002). Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. Immunity *16*, 231-243.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. Nature *377*, 355-358.

Jehn, B., Dittert, I., Beyer, S., von Der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. J Biol Chem *277*, 8033-8040.

Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H., Shawber, C., Norton, C., Serreze, D., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in jagged2 mutant mice. Genes Dev *12*, 1046-1057.

Jiang, Y.J., Brand, M., Heisenberg, C.P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R.N., Warga, R.M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M.*, et al.* (1996). Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, Danio rerio. Development *123*, 205-216.

Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell *102*, 549-552.

Joo, H.Y., Jones, A., Yang, C., Zhai, L., Smith, A.D.t., Zhang, Z., Chandrasekharan, M.B., Sun, Z.W., Renfrow, M.B., Wang, Y.*, et al.* (2011). Regulation of histone H2A and H2B deubiquitination and Xenopus development by USP12 and USP46. J Biol Chem *286*, 7190-7201.

Joshi, I., Minter, L.M., Telfer, J., Demarest, R.M., Capobianco, A.J., Aster, J.C., Sicinski, P., Fauq, A., Golde, T.E., and Osborne, B.A. (2009). Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. Blood *113*, 1689-1698.

Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserve, E. (2000). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. J Clin Invest *105*, 597-605.

Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E.*, et al.* (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature *383*, 707-710.

Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M., and Haass, C. (2006). Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. Traffic *7*, 408-415.

Kao, H., Ordentlich, P., Koyanonakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C., Evans, R., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. Genes Dev *12*, 2269-2277.

Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomuraokazaki, S., Tamura, K., and Honjo, T. (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. Development *124*, 4133-4141.

Kee, Y., Yang, K., Cohn, M.A., Haas, W., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2010). WDR20 regulates activity of the USP12 x UAF1 deubiquitinating enzyme complex. J Biol Chem *285*, 11252-11257.

Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. Mech Dev *115*, 41-51.

Kidd, S., Lieber, T., and Young, M. (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in Drosophila melanogaster embryos. Genes Dev *12*, 3728-3740.

Kim, H., and Siu, G. (1998). The Notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. Mol Cell Biol *18*, 7166-7175.

Kirkin, V., and Dikic, I. (2007). Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. Curr Opin Cell Biol *19*, 199-205.

Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Nakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T.*, et al.* (2001). Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. Int J Dev Neurosci *19*, 21-35.

Klueg, K., and Muskavitch, M. (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in Drosophila. J Cell Sci *112*, 3289-3297.

Koch, U., and Radtke, F. (2010). Notch signaling in solid tumors. Curr Top Dev Biol *92*, 411-455.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbe, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 550-563.

Koo, B.-K., Lim, H.-S., Song, R., Yoon, M.-J., Yoon, K.-J., Moon, J.-S., Kim, Y.-W., Kwon, M.-c., Yoo, K.-W., Kong, M.-P., *et al.* (2005a). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. Development *132*, 3459-3470.

Koo, B.-K., Yoon, K.-J., Yoo, K.-W., Lim, H.-S., Song, R., So, J.-H., Kim, C.-H., and Kong, Y.-Y. (2005b). Mind Bomb-2 Is an E3 Ligase for Notch Ligand. J. Biol. Chem. *280*, 22335-22342.

Koo, B.K., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Im, S.K., Kim, Y.Y., Kim, C.H., Suh, P.G., Jan, Y.N., and Kong, Y.Y. (2007). An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. PLoS ONE *2*, e1221.

Kooh, P., Fehon, R., and Muskavitch, M. (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during Drosophila development. Development *117*, 493-507.

Kovall, R.A., and Hendrickson, W.A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. EMBO J *23*, 3441-3451.

Krebs, L., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T., Hamada, H., and Gridley, T. (2003a). Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. Genes Dev. *17*, 1207-1212.

Krebs, L., Shutter, J., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K., and Gridley, T. (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. Genes Dev. *18*, 2469-2473.

Krebs, L., Xue, Y., Norton, C., Shutter, J., Maguire, M., Sundberg, J., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., *et al.* (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. Genes Dev *14*, 1343-1352.

Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A., and Gridley, T. (2003b). Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. Genesis *37*, 139-143.

Krejci, A., Bernard, F., Housden, B.E., Collins, S., and Bray, S.J. (2009). Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. Sci Signal *2*, ra1.

Krejci, A., and Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. Genes Dev *21*, 1322-1327.

Kusumi, K., Sun, E., Kerrebrock, A., Bronson, R., Chi, D., Bulotsky, M., Spencer, J., Birren, B., Frankel, W., and Lander, E. (1998). The mouse pudgy mutation disrupts delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. Nature Genetics *19*, 274-278.

Lai, E., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y., and Rubin, G. (2005). The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. Development *132*, 2319-2332.

Lai, E.C., Deblandre, G.A., Kintner, C., and Rubin, G.M. (2001). Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. Dev Cell *1*, 783-794.

Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. Current Opinion in Cell Biology *18*, 213-222.

Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005). Two Distinct E3 Ubiquitin Ligases Have Complementary Functions in the Regulation of Delta and Serrate Signaling in Drosophila. PLoS Biology *3*, e96.

Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003a). Notch signaling: endocytosis makes delta signal better. Curr Biol *13*, R273-275.

Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003b). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. Dev Cell *5*, 139-148.

Le Bras, S., Loyer, N., and Le Borgne, R. (2011). The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. Traffic *12*, 149-161.

Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. Genes Dev *9*, 2598-2608.

Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of Notch in drosophila embryos. Curr Biol *8*, 771-774.

Lee, B.H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.C., Elsasser, S., Chen, P.C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., *et al.* (2010a). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. Nature *467*, 179-184.

Lee, J.P., Brauweiler, A., Rudolph, M., Hooper, J.E., Drabkin, H.A., and Gemmill, R.M. (2010b). The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways. Mol Cancer Res *8*, 93-106.

Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. Cell Death Differ *17*, 86-92.

Lee, M.J., Lee, B.H., Hanna, J., King, R.W., and Finley, D. (2011). Trimming of Ubiquitin Chains by Proteasome-associated Deubiquitinating Enzymes. Mol Cell Proteomics *10*, R110 003871.

Lefort, K., and Dotto, G.P. (2004). Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. Semin Cancer Biol *14*, 374-386.

Lehmann, R., Jiménez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. Roux's Arch. Dev. Biol. *192*, 62-74.

Levitan, D., and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a Caenorhabditis elegans S182 Alzheimer's disease gene. Nature *377*, 351-354.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science *327*, 542-545.

Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. Science *302*, 1972-1975.

Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. Genes Dev *7*, 1949-1965.

Lindsell, C., Shawber, C., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. Cell *80*, 909-917.

Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., and Wagers, A. (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. Curr Top Dev Biol *92*, 367-409.

Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell *111*, 209-218.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., Lebail, O., Jarriault, S., Seidah, N., and Israël, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc Natl Acad Sci USA *95*, 8108-8112.

Lopez-Schier, H., and St Johnston, D. (2002). Drosophila Nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of Notch. Dev Cell *2*, 79-89.

Lutolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. Development *129*, 373-385.

Maier, D. (2006). Hairless: the ignored antagonist of the Notch signalling pathway. Hereditas *143*, 212-221.

Maier, M.M., and Gessler, M. (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. Biochem Biophys Res Commun *275*, 652-660.

Makarova, K.S., Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. Trends Biochem Sci *25*, 50-52.

Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J., Stenmark, H., and Benovic, J. (2003). The E3 Ubiquitin Ligase AIP4 mediates ubiquitination and orting of the G Protein-coupled receptor CXCR4. Dev Cell *5*, 709-722.

Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., and Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. EMBO J *26*, 3373-3383.

Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumuller, C.M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development *121*, 2633-2644.

Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A.M., Carcanciu, M.L., Ordentlich, P., Kadesch, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. Nature Genetics *19*, 74-78.

McCullough, J., Clague, M., and Urbe, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. J. Cell Biol. *166*, 487-492.

Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. Nature *339*, 27-30.

Milner, L., Kopan, R., Martin, D., and Bernstein, I. (1994). A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. Blood *83*, 2057-2062.

Mines, M.A., Goodwin, J.S., Limbird, L.E., Cui, F.F., and Fan, G.H. (2009). Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK ativation. J Biol Chem *284*, 5742-5752.

Moloney, D., Panin, V., Johnston, S., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K., Haltiwanger, R., and Vogt, T. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. Nature *406*, 369-375.

Morgan, T.H. (1917). The theory of the gene. Am Nat *51*, 513-544

Morgan, T.H. (1919). The physical basis of heredity. J.B Lippincott Company

Morgan, T.H., Sturtevant, A.H., and Bridges, C.B. (1922). The constitution of the germ-material in relation to heredity. In Year Book Carnegie Institution of Washington *22*, 283-296.

Morgan, T.H., Bridges, C.B., and Schultz, J. (1931). In Year Book Carnegie Institution of Washington *30*, 408-415.

Morrison, S., Perez, S., Qiao, Z., Verdi, J., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. Cell *101*, 499-510.

Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual [beta]-arrestin. Nat Cell Biol *7*, 1191-1201.

Mumm, J., Schroeter, E., Saxena, M., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D., Ray, W., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol Cell *5*, 197-206.

Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. Cell *124*, 973-983.

Nichols, J., Miyamoto, A., Olsen, S., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. J Cell Biol *176*, 445-458.

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J., Mill, P., van Noort, M., Hui, C., Clevers, H., Dotto, G., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. Nat Genet *33*, 416-421.

Nie, J., McGill, M., Dermer, M., Dho, S., Wolting, C., and McGlade, C. (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. EMBO J *21*, 93-102.

Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. Cell *123*, 773-786.

Nutt, S.L., Vambrie, S., Steinlein, P., Kozmik, Z., Rolink, A., Weith, A., and Busslinger, M. (1999). Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. Nat Genet *21*, 390-395.

Okuyama, R., Nguyen, B.C., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M., and Dotto, G.P. (2004). High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. Dev Cell *6*, 551-562.

Omerovic, J., Santangelo, L., Puggioni, E.M., Marrocco, J., Dall'Armi, C., Palumbo, C., Belleudi, F., Di Marcotullio, L., Frati, L., Torrisi, M.R.*, et al.* (2007). The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation. FASEB J *21*, 2849-2862.

Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. Mol Cell Biol *18*, 2230-2239.

Overstreet, E., Fitch, E., and Fischer, J.A. (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. Development *131*, 5355-5366.

Paganin, M., and Ferrando, A. (2011). Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood Rev *25*, 83-90.

Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P.*, et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 18261-18266.

Panin, V.M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D.J., Irvine, K.D., and Haltiwanger, R.S. (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. J Biol Chem *277*, 29945-29952.

Parks, A., Klueg, K., Stout, J., and Muskavitch, M. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. Development *127*, 1373-1385.

Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K., Muskavitch, M., Moschonas, N., and Delidakis, C. (2001). Neuralized encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. Dev Cell *1*, 807-816.

Peth, A., Besche, H.C., and Goldberg, A.L. (2009). Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. Mol Cell *36*, 794-804.

Pick, E., Hofmann, K., and Glickman, M.H. (2009). PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. Mol Cell *35*, 260-264.

Pick, E., and Pintard, L. (2009). In the land of the rising sun with the COP9 signalosome and related Zomes. Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3. EMBO Rep *10*, 343-348.

Pickart, C.M. (2000). Ubiquitin in chains. Trends Biochem Sci *25*, 544-548.

Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. Nature *416*, 451-455.

Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S.J., and Eilers, M. (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. Nat Cell Biol *9*, 765-774.

Posakony, J.W. (1994). Nature versus nurture - asymmetric cell divisions in drosophila bristle development. Cell *76*, 415-418.

Poulson, D.F. (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of Drosophila Melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A *23*, 133-137.

Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., and Liu, Y. (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a Hect-type E3 ubiquitin ligase. J Biol Chem *275*, 35734-35737.

Radtke, F., and Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? Nat Rev Cancer *3*, 756-767.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity *10*, 547-558.

Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. Curr Biol *11*, 1729-1738.

Rand, M., Grimm, L., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S., Sklar, J., and Aster, J. (2000). Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors. Mol. Cell. Biol. *20*, 1825-1835.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P.*, et al.* (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. EMBO J *20*, 3427-3436.

Rathinam, C., Matesic, L.E., and Flavell, R.A. (2011). The E3 ligase Itch is a negative regulator of the homeostasis and function of hematopoietic stem cells. Nat Immunol *12*, 399-407.

Rebay, I., Fleming, R., Fehon, R., Cherbas, L., Cherbas, P., and S., A.-T. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell *67*, 687-699.

Rhyu., M.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. Cell *76*, 477-491

Ronchini, C., and Capobianco, A.J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). Mol Cell Biol *21*, 5925-5934.

Ross, D.A., and Kadesch, T. (2001). The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. Mol Cell Biol *21*, 7537-7544.

Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 398-409

Rotin, D., Staub, O., and Haguenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. J Membr Biol *176*, 1-17.

Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbe, S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. J Biol Chem *281*, 12618-12624.

Ruchoux, M.M., Domenga, V., Brulin, P., Maciazek, J., Limol, S., Tournier-Lasserve, E., and Joutel, A. (2003). Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. Am J Pathol *162*, 329-342.

Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K.*, et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. Immunity *18*, 675-685.

Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). Drosophila Nedd4 Regulates Endocytosis of Notch and Suppresses Its Ligand-Independent Activation. Curr Biol *14*, 2228-2236.

Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. Genes Dev *6*, 2620-2634.

Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. Nature *455*, 358-362.

Scheel, H., Tomiuk, S., and Hofmann, K. (2003). Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. Hum Mol Genet *12*, 2845-2852.

Schroeter, E., Kisslinger, J., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature *393*, 382-386.

Schweisguth, F., Gho, M., and Lecourtois, M. (1996). Control of cell fate choices by lateral signaling in the adult peripheral nervous system of drosophila melanogaster. Dev Genet *18*, 28-39.

Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. Science *286*, 741-746.

Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during notch signaling in drosophila neurogenesis. Dev Biol *192*, 585-598.

Shaye, D.D., and Greenwald, I. (2002). Endocytosis-mediated downregulation of LIN-12/Notch upon Ras activation in Caenorhabditis elegans. Nature *420*, 686-690.

Shih, S.C., Katzmann, D.J., Schnell, J.D., Sutanto, M., Emr, S.D., and Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. Nat Cell Biol *4*, 389-393.

Shtiegman, K., and Yarden, Y. (2003). The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. Semin Cancer Biol *13*, 29-40.

Sierra, M.I., Wright, M.H., and Nash, P.D. (2010). AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. J Biol Chem *285*, 13990-14004.

Six, E., Ndiaye, D., Sauer, G., Laabi, Y., Athman, R., Cumano, A., Brou, C., Israel, A., and Logeat, F. (2004). The Notch Ligand Delta1 Recruits Dlg1 at Cell-Cell Contacts and Regulates Cell Migration. J. Biol. Chem. *279*, 55818-55826.

Smoller, D., Friedel, C., Schmid, A., Bettler, D., Lam, L., and Yedvobnick, B. (1990). The Drosophila neurogenic locus mastermind encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers. Genes and Dev. *4*, 1688-1700.

Sorkin, A., and Goh, L.K. (2009). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Exp Cell Res *315*, 683-696.

Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. Immunity *17*, 781-793.

Spinner, N.B., Colliton, R.P., Crosnier, C., Krantz, I.D., Hadchouel, M., and Meunier-Rotival, M. (2001). Jagged1 mutations in alagille syndrome. Hum Mutat *17*, 18-33.

Stevenson, L.F., Sparks, A., Allende-Vega, N., Xirodimas, D.P., Lane, D.P., and Saville, M.K. (2007). The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. EMBO J *26*, 976-986.

Sun, S.C. (2010). CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. Cell Death Differ *17*, 25-34.

Sundaram, M., and Greenwald, I. (1993). Suppressors of a lin-12 hypomorph define genes that interact with both lin-12 and glp-1 in Caenorhabditis elegans. Genetics *135*, 765-783.

Swiatek, P.J., Lindsell, C.E., Delamo, F.F., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. Genes Dev *8*, 707-719.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S ***T*** *U V W X Y Z*

Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., and Furuse, M. (2009). The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. J Cell Sci *122*, 985-994.

Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. J Biol Chem *269*, 5150-5156.

Takeyama, K., Aguiar, R., Gu, L., He, C., Freeman, G., Kutok, J., Aster, J., and Shipp, M. (2003). The BAL-binding Protein BBAP and related Deltex family members exhibit Ubiquitin-Protein Isopeptide Ligase Activity. J Biol Chem *278*, 21930-21937.

Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). Curr Biol *5*, 1416-1423.

Tax, F.E., Yeargers, J.J., and Thomas, J.H. (1994). Sequence of c elegans lag-2 reveals a Cell-Signalling domain shared with delta and serrate of drosophila. Nature *368*, 150-154.

Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jkappa. Nucleic Acids Res *22*, 965-971.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U ***V*** *W X Y Z*

Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. *180*, 755-762.

Valente, S.T., Gilmartin, G.M., Venkatarama, K., Arriagada, G., and Goff, S.P. (2009). HIV-1 mRNA 3' End Processing Is Distinctively Regulated by eIF3f, CDK11, and Splice Factor 9G8. Mol Cell *36*, 279-289.

van Tetering, G., van Diest, P., Verlaan, I., van der Wall, E., Kopan, R., and Vooijs, M. (2009). Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. J BIol Chem *284*, 31018-31027.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Science *298*, 611-615.

Vodovar, N., and Schweisguth, F. (2008). Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? J Biol *7*, 7.

Vollrath, B., Pudney, J., Asa, S., Leder, P., and Fitzgerald, K. (2001). Isolation of a murine homologue of the Drosophila neuralized gene, a gene required for axonemal integrity in spermatozoa and terminal maturation of the mammary gland. Mol Cell Biol *21*, 7481-7494.

Wallberg, A.E., Pedersen, K., Lendahl, U., and Roeder, R.G. (2002). p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. Mol Cell Biol *22*, 7812-7819.

Weber, S., Niessen, M.T., Prox, J., Lullmann-Rauch, R., Schmitz, A., Schwanbeck, R., Blobel, C.P., Jorissen, E., de Strooper, B., Niessen, C.M., and Saftig, P. (2011). The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. Development *138*, 495-505.

Wee, S., Geyer, R.K., Toda, T., and Wolf, D.A. (2005). CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability. Nat Cell Biol *7*, 387-391.

Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 169-178.

Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 599-609.

Weng, A., Ferrando, A., Lee, W., Morris, J., Silverman, L., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S., Look, A., and Aster, J. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science *306*, 269-271.

Wilkin, M., Carbery, A.-M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S., Higgs, J., Myat, A., Evans, D., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of Notch Endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins. Curr Biol *14*, 2237-2244.

Wilkin, M., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., and Baron, M. (2008). Drosophila HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway. Developmental Cell *15*, 762-772.

Wilson, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. J Exp Med *194*, 1003-1012.

Wilson, J.J., and Kovall, R.A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. Cell *124*, 985-996.

Wright, G., Leslie, J., Ariza-McNaughton, L., and Lewis, J. (2004). Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development. Development *131*, 5659-5669.

Wright, M.H., Berlin, I., and Nash, P.D. (2011). Regulation of Endocytic Sorting by ESCRT-DUB-Mediated Deubiquitination. Cell Biochem Biophys *60*, 39-46.

Wu, E., Croucher, P., and McKie, N. (1997). Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. Biochem Biophys Research Comm *235*, 437-442.

Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R., and Kitajewski, J. (2001). SEL-10 Is an Inhibitor of Notch Signaling That Targets Notch for Ubiquitin-Mediated Protein Degradation. Mol Cell Biol *21*, 7403-7415.

Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. Nat Genet *26*, 484-489.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W ***X*** *Y Z*

Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). deltex, a locus interacting with the neurogenic genes, Notch, Delta and mastermind in Drosophila melanogaster. Genetics *126*, 665-677.

Xu, T., Rebay, I., Fleming, R.J., Scottgale, T.N., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The notch locus and the genetic circuitry involved in early Drosophila neurogenesis. Genes and Development *4*, 464-475.

Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C., Norton, C., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand JAGGED1. Human Molecular Genetics *8*, 723-730.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X ***Y*** *Z*

Yamada, K., Fuwa, T.J., Ayukawa, T., Tanaka, T., Nakamura, A., Wilkin, M.B., Baron, M., and Matsuno, K. (2011). Roles of Drosophila deltex in Notch receptor endocytic trafficking and activation. Genes Cells *16*, 261-272.

Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H., and Nakafuku, M. (2001). Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. J Biol Chem *276*, 45031-45040.

Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C., and Boulianne, G. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development. Curr Biol *11*, 1675-1679.

Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2007). A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. Mol Cell *27*, 609-621.

Zhu, Q., and Wani, A.A. (2010). Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. J Cell Physiol *223*, 283-288.

ANNEXE

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2011/04/04/M110.190769.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 21, pp. 18720–18730, May 27, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

The Adaptor-associated Kinase 1, AAK1, Is a Positive Regulator of the Notch Pathway*[S]

Received for publication, October 1, 2010, and in revised form, March 4, 2011 Published, JBC Papers in Press, April 4, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.190769

Neetu Gupta-Rossi[‡1], **Sara Ortica**[‡], **Vannary Meas-Yedid**[§], **Sara Heuss**[‡], **Julien Moretti**[‡], **Jean-Christophe Olivo-Marin**[§], **and Alain Israël**[‡]

From the [‡]*Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire, CNRS URA 2582 and* [§]*Unité d'Analyse d'Images Quantitative, CNRS URA 2582, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France*

The Notch pathway is involved in cell-cell signaling during development and adulthood from invertebrates to higher eukaryotes. Activation of the Notch receptor by its ligands relies upon a multi-step processing. The extracellular part of the receptor is removed by a metalloprotease of the ADAM family and the remaining fragment is cleaved within its transmembrane domain by a presenilin-dependent γ-secretase activity. γ-Secretase processing of Notch has been shown to depend upon monoubiquitination as well as clathrin-mediated endocytosis (CME). We show here that AAK1, the adaptor-associated kinase 1, directly interacts with the membrane-tethered active form of Notch released by metalloprotease cleavage. Active AAK1 acts upstream of the γ-secretase cleavage by stabilizing both the membrane-tethered activated form of Notch and its monoubiquitinated counterpart. We propose that AAK1 acts as an adaptor for Notch interaction with components of the clathrin-mediated pathway such as Eps15b. Moreover, transfected AAK1 increases the localization of activated Notch to Rab5-positive endocytic vesicles, while AAK1 depletion or overexpression of Numb, an inhibitor of the pathway, interferes with this localization. These results suggest that after ligand-induced activation of Notch, the membrane-tethered form can be directed to different endocytic pathways leading to distinct fates.

The Notch gene encodes a receptor, matured by furin, and present at the cell surface as an heterodimer (1, 2). Notch activation is induced upon ligand binding and leads to its extracellular cleavage by TNF-α-converting enzyme (TACE)[2] (3, 4), followed by a second cleavage within the transmembrane domain by a γ-secretase complex. The released intracellular domain of Notch translocates to the nucleus and induces transcription of target genes together with the CSL and Mastermind cofactors. Ligand-induced activation of Notch is strictly regulated at several levels, both at the extracellular and the intracellular levels (5–7).

An increasing number of data reveals that the activity of both Notch receptor and its ligands is regulated by internalization as well as ubiquitination events (8, 9). A large repertoire of Notch pathway regulators has been identified, mainly in invertebrates, and conflicting data have emerged regarding Notch activity and trafficking (5). On one hand, endocytosis appears important for Notch activation in the signal-receiving cell (10–13) while other studies point to an inhibitory effect (14–18). Our data suggest that, in mammalian cells, both monoubiquitination and endocytosis are required before γ-secretase cleavage of ligand-activated Notch (10).

As the Notch pathway is conserved throughout evolution, we scanned the literature for genetic modulators of the pathway in invertebrates to further understand the intracellular events that control Notch activation. Loss of worm *sel-5* (SEL for *suppressor/enhancer of Lin12*) results in suppression of the constitutive activity of *lin-12(d)* (equivalent to the metalloprotease-cleaved Notch or ΔE construct) but not of *lin-12(intra)* (corresponding to the γ-secretase released nuclear form of Notch) (19). SEL-5 kinase is the homolog of *Drosophila* NAK, Numb-associated kinase (20) and human AAK1, adaptor-associated kinase 1 (21, 22). These serine/threonine kinases belong to the Ark1/Prk1 (actin-regulating kinase 1) family involved in cortical actin regulation in yeast and include BIKE (BMP-2-inducible kinase), MPSK1 (myristoylated and palmitoylated serine/threonine kinase 1) and GAK (23, 24). AAK1 and GAK, the cyclin G-associated kinase, phosphorylate the μ subunits of both AP-1 and AP-2 trafficking adaptors (21, 22, 25). AAK1, via phosphorylation of Thr-156 of the μ2 subunit, increases the affinity of AP2 for membranes and induces a conformational change enabling cargo recruitment by this adaptor (26, 27). Clathrin assembly stimulates AAK1 activity thus suggesting a role in clathrin-mediated cargo uptake (28, 29). Besides its function at the internalization step, AAK1 was recently shown to act at the level of early/sorting endosome and to colocalize with EEA1 (30). Based on these observations as well as on the genetic data obtained in invertebrates, we hypothesized that AAK1 could play a positive role in early Notch endocytosis.

Results presented here show that AAK1 directly interacts with Notch ΔE, a membrane-tethered and activated form of Notch that resembles the ligand-induced metalloprotease-processing product, but does not interact with the full-length receptor. Further investigation reveals that increasing AAK1 expression results in stabilization of Notch ΔE and its mono-

* This work was supported in part by the Rubicon EC FP6 Grant and a DIM Stem-Pole grant (to S. O.).

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Table S1 and Figs. S1 and S2.

[1] To whom correspondence should be addressed: Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Tel.: 33-140-613-039; Fax: 33-140-613-040; E-mail: neetu.gupta@pasteur.fr.

[2] The abbreviations used are: TACE, TNF-α-converting enzyme; CME, clathrin-mediated endocytosis; CSL, CBF1/Su(H)/Lag2; DAPT, *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl]-*S*-phenylglycine tert-butyl ester; EEA1, early endosome antigen 1; TfR, transferrin receptor.

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

ubiquitinated form. Moreover, shRNA-mediated AAK1 depletion decreases Notch transcriptional activity in coculture experiments. It has been shown that AAK1 can phosphorylate Numb, a negative regulator of the Notch pathway, and modify its subcellular localization (31). We demonstrate here that AAK1 targets Notch to Rab5-positive endosomes, whereas Numb interferes with this localization. Based on these results we propose that after activation by its ligand, AAK1 promotes Notch activation through stabilization of the monoubiquitinated Notch intermediate and sorting toward Rab5-positive endosomes. On the other hand, Numb interferes with the monoubiquitination step and the Rab5 localization, probably leading to Notch degradation through an alternate sorting pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—All Notch1 constructs, Notch FL, ΔE, ΔE+CT, and IC have been previously described (6, 10, 32–34). GFP-fused Rab5Q79L mutant was a kind gift from C. Schnatwinkel and M. Zerial (MPI, Dresden). His-tagged ubiquitin variants were provided by M. Treier and D. Bohmann (EMBL, Heidelberg). AAK1 was amplified by PCR (primers 5′-NAKSacII and 3′-NAKRI) from the human cDNA clone HH02560, KIAA1048 (Kazusa DNA Research Institute (35)) and cloned into a G-VSV/pcDNA3 vector. Site-directed mutagenesis of AAK1 was used to generate the KI-AAK1 (primers K74A) and the DPF (DPF forward) mutants. The AID-truncated AAK1 (ΔAID) was obtained by introducing a STOP codon in VSV-AAK1 (primer 3′-NAK631). All AAK1 constructs have an N-terminal VSV-tag and were checked by sequencing (Genome Express). shRNA against AAK1 and Numb were generated by cloning the corresponding sequences (shAAK1 forward/reverse and shNumb forward/reverse) into the pSUPER plasmid cloned into pcDNA3 for mammalian expression (pSUPER was a gift from R. Agami). Primer sequences are detailed in a supplemental Table S1.

Antibodies were purchased from Abcam (Numb 14140), Santa Cruz Biotechnology (clone K15, Eps15), Molecular Probes (Alexa-Fluor 488 conjugates), Sigma (actin), Jackson ImmunoResearch (Cy5- and Cy3-labeled secondary antibodies) or ZYMED (anti-transferrin receptor). The anti-Notch antibody has been described previously (2). A rabbit polyclonal antibody (AAK1 39174) was raised against amino acids 2–16 of hAAK1, coupled to KLH (keyhole limpet hemocyanin) via a C-terminal cysteine (Agro-Bio, France). Anti-VSV (P5D4) and anti-Myc (9E10) monoclonal antibodies were used for immunoprecipitations and isolated on protein G-Sepharose (Amersham Biosciences).

In Vitro Experiments: Protein Expression and Isolation—Notch IC, amino acids 1759–2306, was cloned into the pET28a+ vector and expressed in Rosetta(DE3) pLys bacterial strain (Novagen). Bacterial cells were lysed using 50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM imidazole, pH 8. The recombinant proteins were isolated using HIS-Select nickel affinity gel (Sigma). Recombinant GST and GST-AAK1 were isolated as described (21). For *in vitro* interaction experiments, baculovirus expressed GST-AAK1 was incubated with 6His-Notch IC immobilized on HIS-Select Nickel affinity gel (Sigma) for 1 h at room temperature in binding buffer (20 mM HEPES, 20 mM imidazole, 120 mM potassium acetate, 0.1% Triton X-100, pH 8.0). Beads were washed three times (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) and bead-bound proteins solubilized with protein sample buffer before being resolved by SDS-PAGE and immunoblotted for GST-AAK1 or GST alone with AAK1-specific antisera (AAK1-SC (36)).

Cell Culture, Extracts, Immunoprecipitations, and Immunoblots—HEK 293T and HeLa cells were cultured as described previously (10). 293T cells were transiently transfected, lysed 40 h later, and immunoprecipitations carried out (10). Samples were resuspended in Laemmli buffer for SDS-PAGE resolution on 7.5% polyacrylamide gels, and immunoblots performed (3). 5% of total protein lysates were loaded for direct immunoblotting.

Interaction with Endogenous AAK1—HeLa cells were stably transfected with empty pcDNA3-pSUPER (CTL cell line) or shAAK1 using jetPEI reagent as per instructions (PolyPlus-transfection). Cells were G418-selected and clones were checked for AAK1 knockdown by immunofluorescence with the 39174 antibody. CTL and shAAK1 HeLa cell lines were transiently transfected with Notch ΔE and protein extracts were immunoprecipitated with the 39174 antibody or the pre-immune serum from the same rabbit. SDS-PAGE analysis on 8% polyacrylamide gels, and immunoblots were performed with the anti-Myc antibody. The same blot was reprobed for AAK1 (AAK1-SC, (36)). 10% of total protein lysates were loaded for direct immunoblotting.

Cell Surface Labeling—HEK 293T transfected with plasmids encoding Notch ΔE, AAK1, or both plasmids were labeled with Sulfo-NHS-LC biotin (Pierce) as described (2). The extracts were either directly immunoprecipitated with the anti-VSV antibody or incubated with streptavidin-agarose beads. The VSV-precipitates were eluted with 2%SDS and heated at 70 °C. Diluted elutes (0,2% SDS) were then fixed on streptavidin-agarose beads for 1 h. The bound proteins were eluted in Laemmli buffer before SDS-PAGE resolution. At each step, 5% of total protein lysate or precipitate was kept for control immunoblotting.

Ubiquitination Assay—HEK 293T transfected with plasmids encoding Notch ΔE, AAK1, Numb, and/or His-tagged Ub variants were lysed in 8 M urea buffer as described (37). Ubiquitinated proteins were purified on nickel-agarose columns according to manufacturer's instructions (GE Healthcare) and analyzed by immunoblotting. 2.5% of total protein lysate was loaded for direct immunoblotting.

Half-life Monitoring with Cycloheximide—48 h after transfection, 293T cells were incubated in complete DMEM with 50 μg/ml cycloheximide (Sigma). Cells were harvested each hour, lysed, and protein extracts quantified by Bradford. A same amount of each extract was analyzed by SDS-PAGE. Quantity One software (Bio-Rad) was used to assess the amount of ΔE, FL, or transferrin receptor (TfR) remaining at each time point; Actin was used as a loading control.

Reporter Assays—CTL and shAAK1 HeLa cell lines were transiently transfected with CSL-luciferase reporter (38, 39), pRL-TK (Promega) and Notch ΔE. Luciferase-assay was per-

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

formed 24 h post-transfection using the dual-luciferase kit (Promega) following the manufacturer's instructions using a Berthold luminometer.

Coculture Assay—40,000 U2OS cells stably transfected with Notch1-HA, UN1, were seeded in 24-well plates and transiently transfected with Fugene HD (Roche). 200 ng of CSL-reporter plasmid was completed with 300 ng of the gene/shRNA to be tested and pcDNA3. 24 h after transfection, cells were cocultured with 70,000 OP9 cells expressing or not the Delta-1 ligand of Notch (40). Cells were lysed 20 h later, and a luciferase assay performed. DAPT (50 μM) was added 20 h before cell lysis when indicated.

Immunofluorescence, Confocal Microscopy, and Quantitative Image Analysis—HeLa cells were grown on glass coverslips in 24-well plates, transfected with FUGENE 6 (Roche) and processed for immunofluorescence 48 h after transfection (10). Cells were pre-treated with 0.02% saponin. Images were acquired using a confocal laser imaging system (0.2 μm sections, LSM 510, Zeiss). Colocalization quantification was performed using the Icy software (from Quantitative Image Analysis Unit). Spot detection (41) based on Isotropic Undecimated Wavelet Transform (IUWT) was performed on the green channel (GFP-Rab5Q). The created mask area was used to compute the mean intensity in the red channel (ΔE). A spot was colocalized when the ratio of intensity (ΔE/Rab5Q) was higher than 50%.

RESULTS

AAK1 Interacts with the Activated Membrane-anchored Form of Notch, ΔE—Considering published data on Notch endocytosis and AAK1 orthologs, we investigated a possible role for AAK1, the adaptor-associated kinase 1, in Notch activation in mammals. We cotransfected VSV-tagged AAK1 with different Notch constructs and tested their interactions in 293T cells. The Notch constructs used represent either inactive (FL) or active (ΔE/ΔE+CT and IC) forms of the receptor (illustrated Fig. 1*B*). ΔE and ΔE+CT constructs encode truncated forms of mNotch1 (Δ21–1703) that resemble the TACE cleavage product and can be constitutively processed by γ-secretase, thus releasing the active nuclear form (3, 33, 42). ΔE also lacks the C-terminal part as this deletion (at amino acid 2186) removes the PEST domain and thus stabilizes nuclear Notch (6). In transiently transfected 293T cells, both ΔE and ΔE+CT demonstrated interaction with VSV-tagged AAK1 (Fig. 1*A*, *lanes 7* and *8*, IP VSV IB Notch). No interaction could be observed with the non-activated full-length Notch (FL, *lane 6*). The intracellular form of Notch, IC (*lane 9*), did not interact either, but a mutant form that remains cytoplasmic due to the deletion of its NLS sequences did interact with AAK1 (data not shown). These interactions did not take place in the test tube as an AAK1-immunoprecipitation (*lanes 10–13*) done on cell extracts from Notch-transfected cells (shown *lanes 2–5*), mixed, after cell lysis, with extracts from AAK1-transfected cells showed no interaction. The lack of interaction observed with IC is probably due to a difference in the subcellular localization of the two molecules. To make sure that the AAK1/ΔE interaction was not due to the higher expression level of ΔE in comparison with the other Notch constructs (because of ΔE stabilization in the presence of AAK1, see for example Fig. 2*A*), the specificity of the coimmunoprecipitation was confirmed on "normalized" Notch expression levels (supplemental Fig. S1). Taken together, these data restrict the interaction domain of Notch1 with AAK1 to the ankyrin repeats spanning amino acids 1840–2142.

The Notch/AAK1 interaction observed could be indirect and require the recruitment of an adaptor protein. To clarify this issue, we used recombinant proteins for both Notch (6His-tagged Notch IC) and AAK1 (GST-AAK1) and tested the interaction *in vitro* (Fig. 1*C*). Recombinant intracellular Notch could pull down GST-AAK1 but not GST alone, indicating that the interaction was direct. We then checked for an interaction between endogenous AAK1 and overexpressed and activated Notch *in vivo*. We generated HeLa cell lines stably expressing an AAK1-specific shRNA (shAAK1). As shown in Fig. 1*D*, AAK1 was efficiently knocked down by this shRNA. The knocked-down cell line (shAAK1) and a control cell line (CTL) were transiently transfected with ΔE (Myc-tagged, Fig. 1*B*). 500 μg of each cell lysate was immunoprecipitated with an anti-AAK1 antibody (IP AAK1, 1A and 2A) or the corresponding pre-immune serum (IP NS, 1o and 2o), and blotted for ΔE (IB Myc). ΔE expression was controlled (IB Myc direct). ΔE pull-down was reduced to background levels when endogenous AAK1 was knocked down (lane 1A *versus* 1o). The AAK1 band observed (*lane 2A*) migrates around 140 kDa and probably represents AAK1L, the long isoform present in HeLa cells (30). These results thus show that endogenous AAK1 interacts with the membrane-tethered, activated form of Notch.

AAK1 Interaction with ΔE Occurs at the Cell Surface—As AAK1 is an endocytic protein involved in CME, we used a biotinylation assay to test whether AAK1 could interact with ΔE at the cell surface. Extracts from biotin-labeled 293T cells transiently transfected with AAK1, ΔE or both constructs were first immunoprecipitated with an anti-VSV antibody to pull down AAK1-associated proteins. The eluted precipitate was then fixed on streptavidin to isolate the biotinylated (*i.e.* surface-expressed) proteins. AAK1 was equally immunoprecipitated from cells incubated (+) or not (−) with biotin (Fig. 2*A*, *lanes 1*, *2*, *5*, and *6*, IP VSV/IB VSV). ΔE could be isolated from the VSV-precipitated eluates by streptavidin fixation (*lane 6*, IP VSV Strep, IB Myc), indicating that ΔE interaction with AAK1 occurs (at least) at the cell surface. The endogenous transferrin receptor was used as a control for biotinylation and streptavidin purification (IB TfR and Strep IB TfR).

The AP2-interacting Domain of AAK1 Is Required for Interaction with ΔE and Eps15b—The kinase activity and the C-terminal domains of both SEL-5 and NAK appear critical for Notch activation in worms (19) and flies (20). Several interaction motifs for endocytic factors can be found in the C terminus of AAK1 and its orthologs (Ref. 21 and Fig. 2*C*): the DLL clathrin-binding motif (43), two DPF α-adaptin-interaction motifs (44) and the NPF, EH- (45) or AP2-binding motif (46). AAK1 could thus act as an adaptor protein for the recruitment of different endocytic partners to the Notch complex. To identify the domain(s) of AAK1 that may be involved in the interaction with Notch, we generated different mutants (Fig. 2*C*): a mutant lacking the entire AP2-interacting domain (ΔAID, stop codon at amino acid 631) and a point mutant in one of the DPF motifs

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

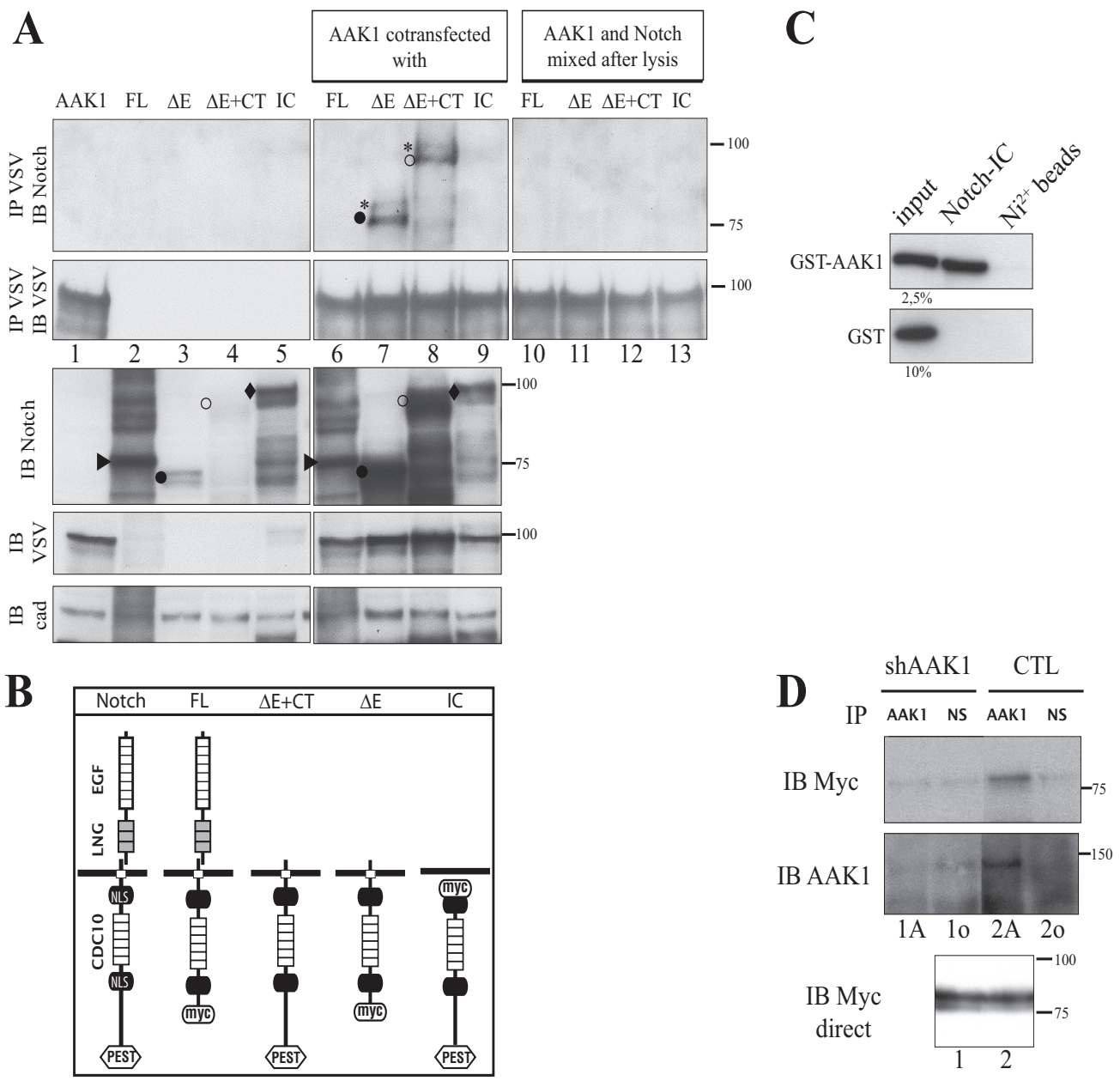


FIGURE 1. **AAK1 directly interacts with the activated form of membrane-anchored Notch.** *A*, AAK1 interacts with Notch in mammalian cells. 293T cells were transiently transfected with plasmids encoding different Notch constructs with or without AAK1 as indicated. *Symbols* on the left of the lanes indicate the expected Notch forms: Notch FL (furin-cleaved form, ▶), ΔE+CT (○), IC (♦; migrates slower than ΔE+CT because of the 6 N-terminal Myc tags)) or ΔE (●). In lanes 10–13, 500 μg of lysate from AAK1-transfected cells (extract loaded in *lane 1*) was mixed with 500 μg of lysate from cells transfected with different Notch constructs as indicated (corresponding to extracts loaded in *lanes 2–5*), and the mixed extracts were immunoprecipitated with anti-VSV. Cell lysates were analyzed by Western blotting for Notch (*IB Notch*) or AAK1 (*IB VSV*) following or not immunoprecipitation with anti-VSV (*IP VSV*). Cadherin was used as a loading control (*IB cad*); an *asterisk* indicates a slower migrating form of ΔE and ΔE+CT (*lanes 7, 8*). *B*, Notch constructs. Full-length Notch receptor domains are depicted: EGF-, LNG-, ankyrin/CDC10-repeats, NLS, and PEST domains. The ΔE constructs represent extracellular-truncated and constitutively active forms of the receptor, with (ΔE+CT) or without (ΔE) the PEST domain (deleted from amino acids 2186). IC is a construct mimicking the γ-secretase cleavage product of Notch; FL is the inactive full-length receptor, deleted of the C-terminal region including the PEST domain. FL and ΔE constructs are C-terminally truncated; N- or C-terminal 6-Myc tags are indicated. *C*, AAK1 directly interacts with the Notch intracellular domain. *In vitro* interaction assay: Purified GST-AAK1 or GST alone were incubated in the presence (Notch-IC) or absence (Ni^{2+} beads) of immobilized intracellular His-tagged Notch IC. AAK1 binding was detected using an AAK1-specific antiserum (*upper panel*); GST binding was tested in parallel (*lower panel*). *D*, Endogenous AAK1 interacts with Notch ΔE. HeLa cells stably transfected with a vector expressing an shRNA specific for AAK1 (*shAAK1*) or the empty pSUPER vector (*CTL*) were transiently transfected with Myc-tagged ΔE. Cell lysates (500 μg) were analyzed after immunoprecipitation with a pre-immune (IP NS, *lanes 1o* and *2o*) or anti-AAK1 serum (IP AAK1, *lanes 1A* and *2A*), followed by immunoblotting for Notch (IB Myc, *upper panel*) and then reblotted for AAK1 (*IB AAK1*). A direct Western blot shows the expression of ΔE in 10% of extract (*IB Myc direct*).

(DPF, DPF777AAA). In transiently transfected 293T cells, WT AAK1 as well as the DPF mutant pulled-down both the membrane-anchored form, ΔE_{TM}, and the monoubiquitinated form (10), ΔE^{U}, of ΔE (Fig. 2*B*, IP AAK1 IB Myc, respectively, *lanes 2* and *4*). The ΔAID mutant did not interact with ΔE (*lane 3*) implying that, in cells, the C-terminal part of AAK1 is important for interaction with Notch.

Eps15 is a UIM-containing protein known to interact with monoubiquitinated receptors and might thus be involved in the Notch endocytic complex (47). We had previously shown that a

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

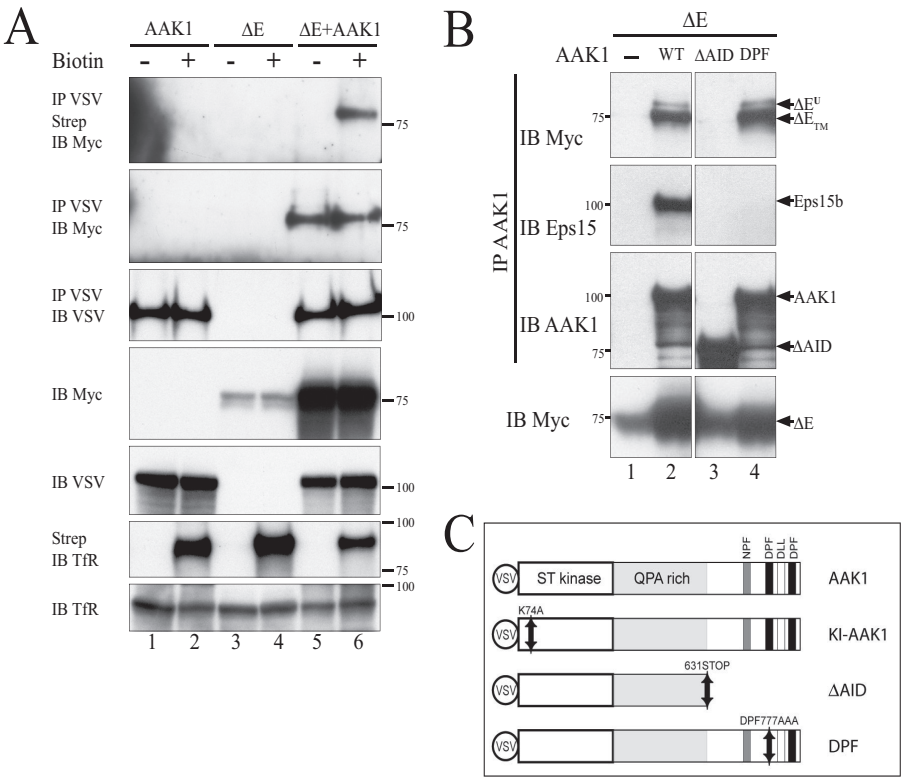


FIGURE 2. **AAK1 acts as an endocytic adaptor for Notch ΔE.** *A*, AAK1 interacts with Notch at the cell surface. 293T cells were transiently transfected with plasmids encoding Myc-tagged ΔE and VSV-tagged AAK1 as indicated. Live cells were labeled with biotin (+) at 4 °C before lysis. 5% of each cell lysate was analyzed by Western blotting for Notch (*IB Myc*) or AAK1 (*IB VSV*). AAK1-bound proteins were pulled-down (*IP VSV*), eluted in 2% SDS and fixed on streptavidin-agarose (*Strep*) to isolate biotin-labeled Notch (*IP VSV/Strep/IB Myc*). VSV- immunoprecipitates were tested for AAK1 (*IP VSV*, *IB VSV*) and Notch (*IP VSV*, *IB Myc*) pull-down. Transferrin receptor was used as a loading (*IB TfR*) and biotin-labeling control (*Strep/IB TfR*). *B*, mapping of the interaction domain of AAK1 with ΔE and Eps15b. 293T cells were transfected with plasmids encoding ΔE and different VSV-tagged AAK1 mutants figured in *C*: truncated (Δ*AID*) or DPF777AAA mutated (*DPF*). Lysates were immunoprecipitated with anti-VSV (*IP AAK1*) and resolved by SDS-PAGE. The same membrane was blotted for Notch (*IB Myc*), stripped and reblotted for Eps15 (*IB Eps15*, K15 antibody) and then for AAK1 (*IB AAK1*, antibody 39174). ΔE expression was controlled by direct immunoblotting with anti-Myc antibody (5% load, *IB Myc*); an *arrow* indicates an ubiquitinated form of ΔE, named ΔE^U (*lanes 2*, *4*). *C*, AAK1 constructs. Wild type (AAK1), AID-deleted (ΔAID), kinase-inactive (K74A mutate, KI-AAK1), or DPF777AAA-mutated (DPF) forms of AAK1 were all VSV-tagged at their N terminus.

dominant-negative form of Eps15 inhibits Notch endocytosis (10). Eps15 is also known to bind NPF-containing proteins through EH-domains (45). One NPF motif being present in the AID of AAK1, we searched for Eps15 in AAK1 immunoprecipitates (IP AAK1 IB Eps15). We could identify only the small isoform of Eps15, recently described as Eps15b (48). This interaction was abolished when AAK1 was deleted of its AID or mutated in the DPF motif (IB Eps15, respectively, *lanes 3* and *4*) but not when the NPF motif was mutated (data not shown). These results indicate that a DPF motif is required for interaction between Eps15b and AAK1.

Active AAK1 Preferentially Interacts with Monoubiquitinated ΔE—AAK1 seemed to pull down a slow-migrating product (*asterisked lanes 7* and *8* in Fig. 1*A*, IP VSV IB Notch; ΔE^U in Fig. 2*B*) co-migrating with a previously described monoubiquitinated form of ΔE, which is barely visible under normal conditions (10). Fig. 3*A* indicates that AAK1 seems to preferentially interact with this form of Notch (compare IB Myc with IP VSV/IB Myc) or to favor its existence. To determine whether the kinase activity of AAK1 is required for this interaction, we used a kinase-inactive mutant of AAK1 (KI, obtained by mutating Lys-74 of the catalytic site to Ala, see Fig. 2*C*). Contrary to WT-AAK1, immunoprecipitation with KI-AAK1 only pulled down ΔE_{TM} (Fig. 3*A*, compare *lanes 2* and *3*), despite a similar if not higher level of expression (IB VSV). As the amount of ΔE is identical in the presence of WT AAK1 or its KI mutant (IB Myc), it can be concluded that AAK1 preferentially interacts with the ΔE^U form, and that this interaction requires its catalytic activity (see "Discussion"). As AAK1 is involved in receptor endocytosis and directly interacts with Notch, we wondered whether Notch could be one of its phosphorylation substrates. *In vitro* kinase assays using immunoprecipitated or recombinant AAK1 showed that this was not the case (data not shown).

To fully exclude the possibility that the kinase activity of AAK1 is required for the ΔE monoubiquitination, we cotransfected His-tagged ubiquitin along with ΔE and WT- or KI-AAK1, and purified the ubiquitin-conjugated proteins on Nickel beads. This purification in urea enables dissociation of any bound interactors, allowing to only visualize the ubiquitination of the protein of interest. ΔE^U can be detected in the presence of either WT- or KI-AAK1 (Fig. 3*B*, *lanes 4* and *5*), indicating that the kinase activity of AAK1 is not directly involved in ΔE monoubiquitination. As ΔE is constitutively cleaved by γ-secretase, we could also observe monoubiquitinated IC (IC^U) with the anti-Myc antibody. The fact that this species has not been detected before is probably the consequence of the overexpression procedure used here. This band was no longer visible when a ΔE construct mutated at the γ-secretase cleavage site (LLFF mutant) was used in a similar assay (data not shown).

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

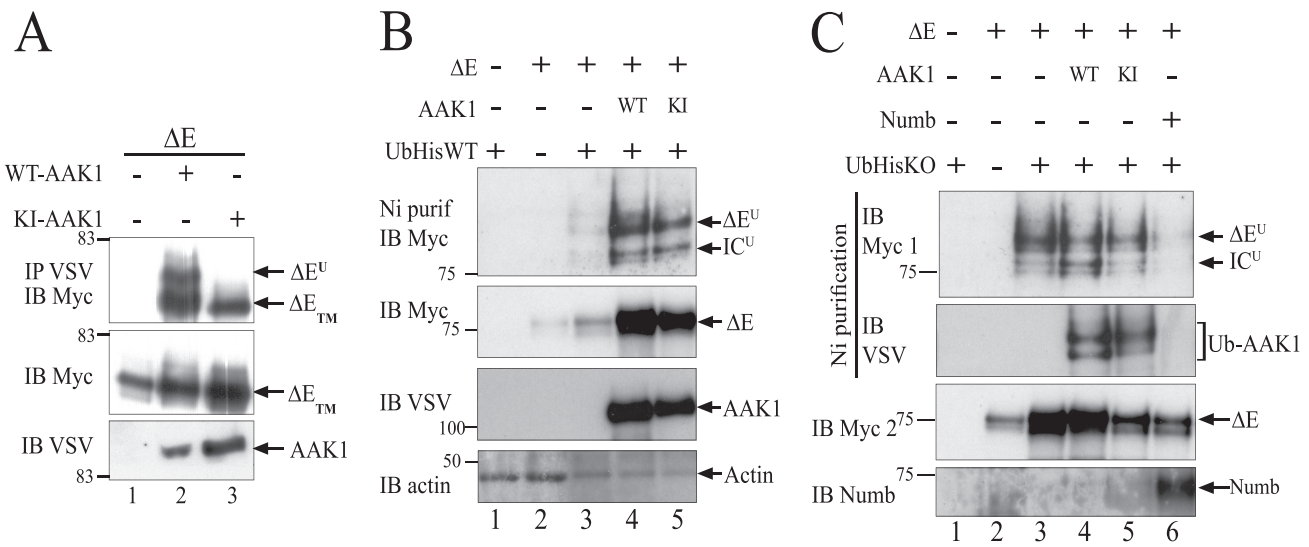


FIGURE 3. **Differential effect of AAK1 and Numb on Notch ΔE.** *A*, active AAK1 preferentially interacts with monoubiquitinated ΔE (ΔE^U). 293T cells were transiently transfected with plasmids encoding ΔE and wild-type (*WT-AAK1*) or kinase-inactive (*KI-AAK1*) AAK1 as indicated. Cell lysates were analyzed by immunoblotting for Notch before (*IB Myc*) or after AAK1 immunoprecipitation (*IP VSV/IB Myc*). The different forms of ΔE (ΔE^U and ΔE_{TM}) are indicated. Expression of AAK1 (*IB VSV*) was verified in the same extracts on 5% of the total lysate. *B*, cotransfection of AAK1 increases the level of Notch ΔE and its monoubiquitinated form. 293T cells were transiently transfected with ΔE along with AAK1 wild-type (WT, *lane 4*), kinase-inactive (KI, *lane 5*) and His-tagged ubiquitin (*UbHisWT*) as indicated. Cell lysates were analyzed by Western blotting for Notch after purification of ubiquitinated species on Nickel beads (*Ni purif*, *IB Myc*). Monoubiquitinated forms of Notch either membrane-anchored (ΔE^U) or γ-secretase cleaved (IC^U) can be visualized (*lanes 4–5*, *upper panel*). 5% of the total lysate was directly blotted for detection of ΔE (*IB Myc*), AAK1 (*IB VSV*), and actin (*IB actin*) as a loading control. *C*, cotransfection of Numb decreases the level of Notch ΔE and its monoubiquitinated form. 293T cells were transfected with plasmids encoding ΔE, Numb, AAK1 (WT or KI) or His-tagged lysine-less Ub (*UbHisKO*) as indicated. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and blotted directly for Notch (*IB Myc 2*), or after purification on nickel beads to visualize monoubiquitinated ΔE (Ni purification IB Myc 1) or AAK1 (Ni purification IB VSV). Ubiquitinated forms of Notch (ΔE^U, IC^U) and AAK1 (Ub-AAK1) are indicated. The expression of Numb was also verified (*IB Numb*).

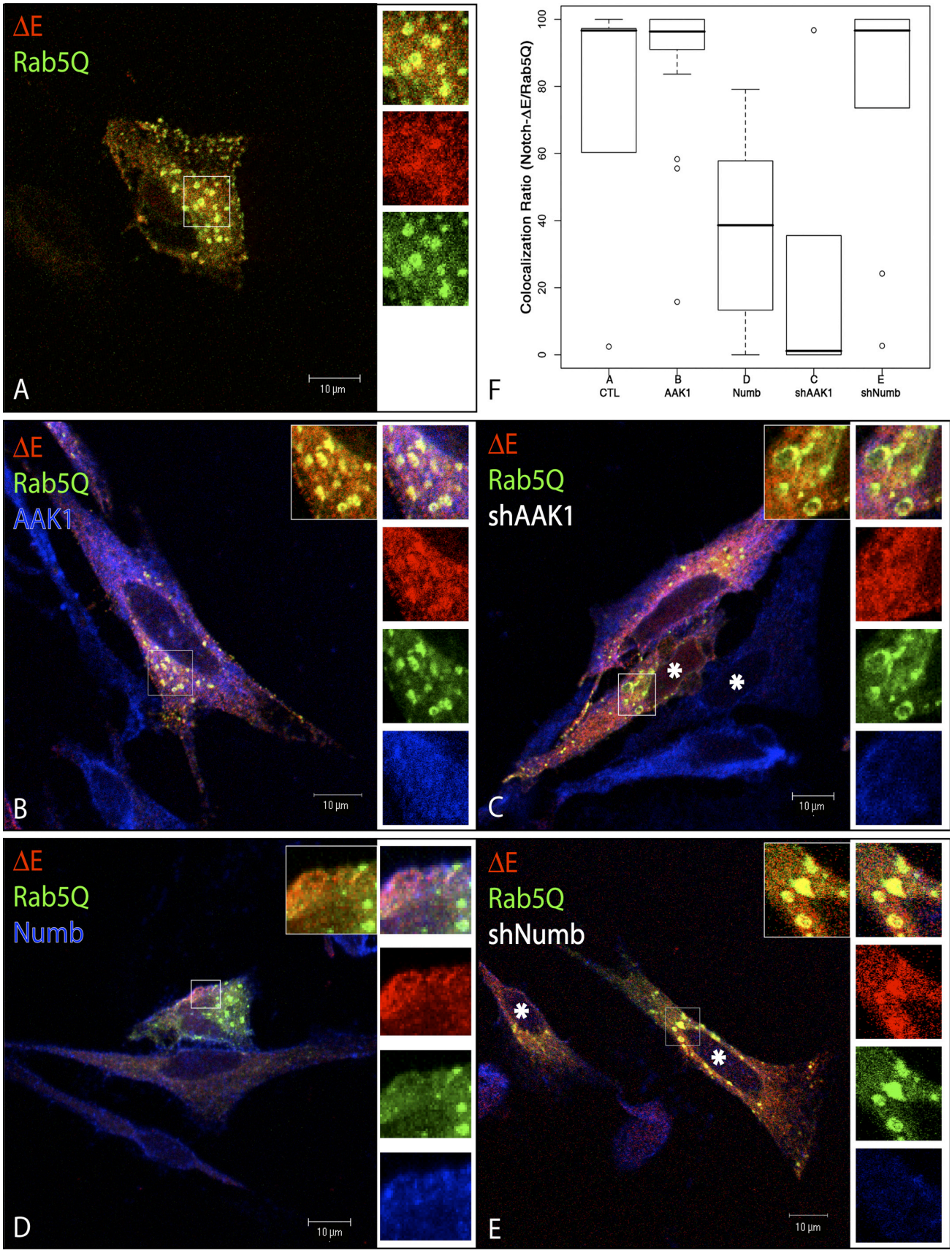
Numb has been shown to inhibit Notch signaling (49) and to increase polyubiquitination of the Notch intracellular domain, leading to its degradation (50, 51). To get a better insight into the respective effects of AAK1 and Numb on ubiquitin-mediated regulation of ΔE, we cotransfected ΔE with a lysine-less mutant of ubiquitin (UbHisKO) in the presence of cotransfected AAK1 or Numb (Fig. 3*C*). UbKO enables the conjugation of a single ubiquitin moiety via its C-terminal glycine residue but prevents further branched polyubiquitination (52). The use of this mutated ubiquitin molecule allows the detection of monoubiquitinated ΔE but prevents Numb-mediated proteasomal degradation. This may confuse the interpretation of the experiment as the detection of monoubiquitinated Notch might either be due to activation-induced *bona fide* monoubiquitination, or to limitation of the degradation-linked polyubiquitin chains caused by Numb. However the results in panel C indicate that under these conditions the presence of Numb does not generate monoubiquitinated Notch. It can thus be concluded that overexpressing UbKO increased the level of ΔE (compare *lanes 2* and *3*, IB Myc2). The presence of AAK1 did not modify the ubiquitination pattern of ΔE (IB Myc1, *lanes 3* and *4*), but the KI mutant of AAK1 seemed to reduce the overall level of expression of ΔE (IB Myc2, compare *lane 5* with *3* and *4*). AAK1 itself seemed to be ubiquitinated as revealed by the VSV blot on Nickel-purified extracts (*lanes 4* and *5*). On the contrary, Numb coexpression prevented the generation of ΔE^U (*lane 6*, IB Myc1) although ΔE was present in the extract at a level similar to that observed in the KI-AAK1 extract (IB Myc2, compare *lanes 6* and *5*).

AAK1 and Numb Drive Differential Trafficking of ΔE—To address the question of ΔE trafficking in the presence of AAK1 or Numb, we transfected HeLa cells with the constitutively active mutant of the small GTPase Rab5, Rab5Q79L (Fig. 4, Rab5Q79L (Rab5Q) is fused to GFP, green). This Rab5 mutant induces the formation of enlarged early endosomes exhibiting distinguishable endosomal microdomains (53). Cotransfected Notch ΔE (red) could be partially detected in the enlarged Rab5Q-positive structures, mostly at the outer side of the vesicles (*panel A*, overlap in yellow; see enlarged inset). In the presence of transfected AAK1 (*panel B*, blue) or shNumb (*panel E*, only the marked cells (*) express the shRNA), enhanced colocalization between ΔE and Rab5Q could be observed (*insets* show the yellow staining indicating colocalization); the quantification data (*panel F*) showed more than 90% colocalization. The colocalization between Rab5Q and ΔE tends to disappear in the presence of shAAK1 (less than 10%) and the endosomes become more donut-shaped (*panel C*, only the marked cells (*) express shAAK1). When cotransfected with Numb (*panel D*, blue), ΔE could be observed in Rab5Q-endocytic structures only to a minor extent (median at 39%). These results suggest that AAK1 and Numb target ΔE to different sorting routes: AAK1 favors the Rab5 endocytic route while Numb diverts it to a different pathway, probably associated with degradation.

AAK1 Stabilizes ΔE but Not Notch FL—To determine whether AAK1 stabilizes Notch as suggested by our previous data, we monitored its half-life in a cycloheximide experiment. We transiently expressed ΔE (red lines) or FL (blue lines) in 293T cells (Fig. 5*A*), alone or together with AAK1 or shAAK1 and quantified the amount of Notch at different time points after cycloheximide treatment. Actin was used as an internal loading control for each time point and transferrin receptor (TfR, black lines) was monitored in parallel. 30–40% of ΔE was

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

degraded within two hours while cotransfection of AAK1 resulted in a half-life longer than 5 h (● *broken lines*). Conversely, cotransfection of shAAK1 decreased the stability of ΔE during the time course of cycloheximide treatment (○ *dotted lines*). On the contrary, both Notch FL and TfR were not affected by the presence or absence of AAK1. These data indi-



Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

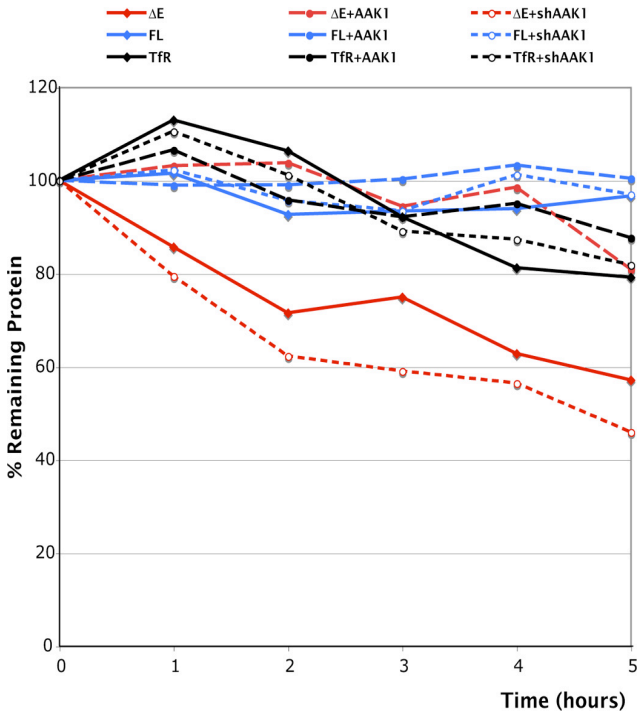


FIGURE 5. **Influence of AAK1 on Notch stability.** 293T cells were transiently transfected with plasmids encoding ΔE (*red*) or Notch FL (*blue*) alone (♦ *solid lines*), along with AAK1 (● *broken lines*), or shAAK1 (○ *dotted lines*). Cells were lysed at the indicated time (hours) after cycloheximide treatment. The same amount of extract (40 μg for all transfections except for ΔE+AAK1 loaded with only 10 μg and ΔE+ shAAK1 loaded with 70 μg of extract) was loaded for each time point and analyzed by SDS-PAGE. The endogenous transferrin receptor (TfR, *black lines*) was monitored in parallel; AAK1 expression was verified and actin was used as an internal loading control for quantification. The intensity of the bands was quantified using the Quantity One software (Bio-Rad).

cate that AAK1 is involved in the stabilization of Notch ΔE but it does not affect the stability of Notch FL or the transferrin receptor.

AAK1 Is Involved in Ligand-induced Activation of Notch—If AAK1 controls the stability of the ligand-activated form of Notch, the transcriptional activity of Notch should also be affected by its presence/absence. To address this issue we performed a reporter gene assay using a CSL-firefly luciferase reporter (38, 39). HeLa cells stably expressing shAAK1 and its control counterpart (see Fig. 1*D*) were transiently transfected with the CSL-reporter gene along with different concentrations of ΔE+CT. A *Renilla* luciferase construct was cotransfected to normalize the transfection levels. In control cells, ΔE+CT increased the activity of the reporter gene by 40–60-fold, in a γ-secretase-dependent manner (Fig. 6*A*, with (+) or without (−) DAPT, a γ-secretase inhibitor). In the presence of shAAK1, this activation was strongly reduced (from 3–7-fold).

To verify that this reduced activation was not due to a clonal effect, we tested Notch activity in a coculture assay using a stable U2OS Notch1-expressing cell line (UN1). The UN1 cells were transiently transfected with the CSL-reporter and either shAAK1, control shRNAs (sh-scrambled, see supplemental Fig. S2 or a 3-nucleotide-mutated shAAK1, sh-mutated), WT AAK1 or KI-AAK1, and cocultured with OP9 cells expressing or not the Notch ligand Delta1 (40). The effect of the different shRNA constructs on AAK1 expression was verified in transfected UN1 cells (supplemental Fig. S2). We observed a 7-fold increase (Fig. 6*B*) in reporter activity when the UN1 cells were cocultured with Delta1-expressing cells (+) compared with control OP9 cells (−). Here again the presence of DAPT (GSI) reduced Notch-dependent activity. Increasing amounts of shAAK1 led to a transcriptional reduction similar to that observed in the presence of GSI, whereas AAK1 overexpression increased reporter activation. Both control shRNAs (sh-scrambled or sh-mutated) led to a non-significant decrease of Notch activity regardless of the amount used in the assay. Inactive AAK1, KI-AAK1, reduced Notch activity in a dose-dependent manner. We can therefore conclude that AAK1 is a positive regulator of Notch activity.

DISCUSSION

Increasing evidence indicates that Notch signaling is controlled by ubiquitination and endocytic events (8, 11, 54). Dynamin is clearly involved in Notch receptor signaling (12) but the exact molecular mechanisms underlying Notch trafficking are still under investigation. Different proteins belonging to the CME pathway have been involved in Notch trafficking in mammals: α-adaptin, Numb, Eps15, and clathrin (10, 55). Recently, signaling by Notch was confirmed to be clathrin-dependent but not AP2-dependent in *Drosophila* ovary (56).

Our previous study had shown that, in mammalian cells, a monoubiquitination step on a juxtamembrane lysine was required for further cleavage of Notch by γ-secretase and activation of the pathway (10). We now demonstrate that the human ortholog of *Drosophila* NAK and worm SEL-5 (19, 20), AAK1, acts as a positive regulator of Notch signaling in mammalian cells, similar to its invertebrate counterparts. AAK1 is involved in CME through phosphorylation of the μ2 subunit of the AP2 adaptor (21, 22), but silencing of this kinase interferes with some AP2-independent events: accumulation of transferrin receptor in perinuclear endosomes, reduced viral entry of vesicular stomatitis virus and inhibition of LDL uptake (30, 57).

FIGURE 4. **AAK1 and Numb differentially regulate ΔE trafficking.** HeLa cells were transiently transfected with ΔE and GFP-fused Rab5Q79L, a constitutively active mutant of Rab5, (Rab5Q, *green*, *A*) along with AAK1 (*B*), shAAK1 (*C*), Numb (*D*), or shNumb (*E*). Cells were fixed, permeabilized, and incubated with anti-Myc to visualize ΔE (*red*), anti-AAK1 (*B* and *C*, *blue*) or anti-Numb (*D* and *E*, *blue*) antibodies. A blow-up of the boxed region is shown on the *right* of each panel, top to bottom: merge of the 3 colors, red, green, blue, along with a merged version of Rab5Q/ΔE only (*inset*). An *asterisk* (*) indicates the cells that have received shAAK1 (*panel C*), or shNumb (*panel E*), as these cells are negative for the corresponding staining (*blue*). Acquisition was done by confocal microscopy (0.2-μm sections, Zeiss LSM510). *F*, quantitative analysis of colocalization. The colocalization quantification results using Icy software are summarized by the boxplot graph. Spot detection based on Isotropic Undecimated Wavelet Transform (IUWT) was performed on the green channel (GFP-Rab5Q vesicles). The mask area thus created was used to compute the mean intensity in the red channel (ΔE) in the selected cell expressing or not AAK1 or Numb. A spot was colocalized when the ratio of intensity (ΔE/Rab5Q) was higher than 50%; the percentage of colocalization per cell was expressed as the ratio of colocalized vesicles over the total number of vesicles detected. The mean intensity was determined for each immunofluorescence experiment described in *panels A–E*; at least 200 vesicles were analyzed. *Boxes* indicate 25, 50 (median), and 75% quartiles; whiskers extend to 1.5× the interquartile range; dots indicate outliners beyond this range.

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

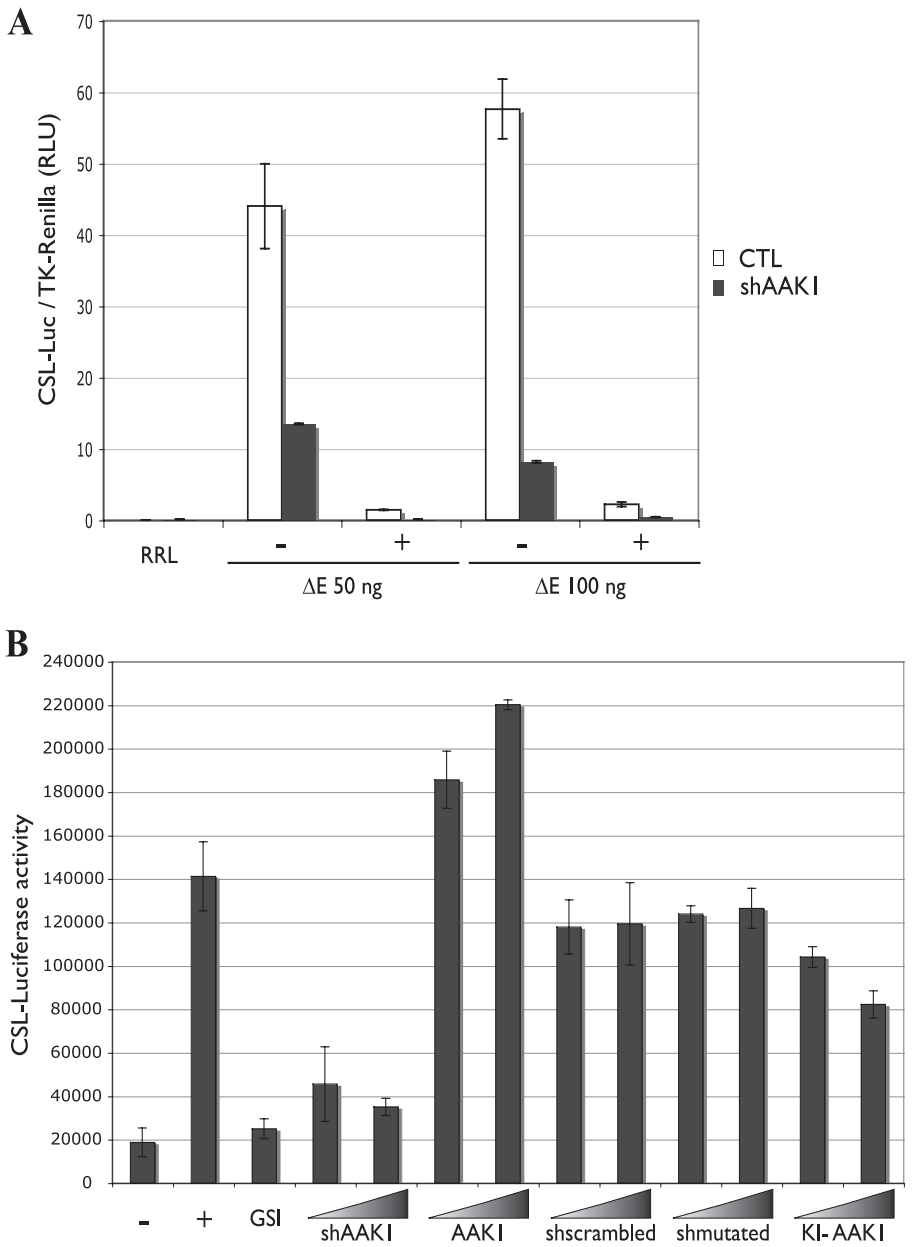


FIGURE 6. **AAK1 is a positive regulator of Notch activity.** *A*, shAAK1 inhibits γ-secretase-dependent transcriptional activity of Notch. HeLa cells stably transfected with an shRNA specific for AAK1 (shAAK1) or the empty pSUPER vector (*CTL*) were transiently transfected with a CSL-firefly luciferase reporter (*CSL-Luc*), pRL-TK *Renilla* luciferase (dual luciferase noted RRL) and different amounts of ΔE+CT (50 or 100 ng) as indicated. A γ-secretase inhibitor (*DAPT*) was added (+) 20 h before cell lysis. Results from four experiments were averaged; error bars represent standard deviation. *B*, AAK1 is a positive regulator of Notch transcriptional activity. A U2OS cell-line stably expressing full-length Notch1 (*UN1*) was transiently transfected with the CSL-firefly luciferase reporter, increasing amounts of shAAK1, a control scrambled AAK1 shRNA (*shscrambled*), a mutated shAAK1 (*shmutated*), wild-type (AAK1), or kinase-inactive (KI-AAK1) AAK1 plasmids as indicated. UN1 cells were cocultured for 20 h with empty OP9 cells (−) or Dll1-expressing OP9 cells (+ and all other points). DAPT (GSI) was added along with the OP9-Dll1 cells when indicated. Results from three experiments were averaged; error bars represent standard deviation.

We demonstrate here that AAK1 directly interacts with ligand-activated Notch (represented here by the ΔE molecule) but not with the inactive full-length receptor. AAK1 interacts with a domain spanning the ankyrin repeats of Notch. AAK1 action on the Notch pathway is unconventional in the sense that its kinase activity is required, but not through direct phosphorylation of the receptor itself.

AAK1 overexpression results in stabilization of activated Notch but not of the inactive receptor. This stabilization results in an increased level of the monoubiquitinated form of ΔE (ΔE^U), which precedes the critical γ-secretase cleavage (10). HeLa cells predominantly express the AAK1L splice variant of AAK1 (30), which exhibits an additional clathrin-binding domain but is functionally equivalent to AAK1. We observed an interaction between endogenous AAK1L and transfected Notch ΔE. The AAK1 kinase activity does not seem to be required for ΔE monoubiquitination, but a transfected kinase dead mutant interacts less efficiently with the monoubiquitinated form of ΔE and leads to reduced Notch activity. A conformational switch between the active and the inactive forms of the kinase may explain these results, as the inactive kinase may not enable interaction with other endocytic adaptors (28) and consequent stabilization of monoubiquitinated Notch. Clathrin binding is known to stimulate AAK1 kinase activity and

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

promote cargo recruitment into coated pits (28, 29). AAK1 also exhibits multiple binding sites for accessory endocytic components such as AP2 and EH-containing proteins (21, 22) and thus acts as a scaffolding hub for the recruitment of several endocytic partners. Notch could thus be targeted to clathrin-coated pits by AAK1. AAK1 fulfills all the requirements of a *bona fide* endocytic adaptor (58) of Notch: it can bind directly the Notch cargo at the cell surface and interacts with clathrin and other endocytic partners.

We have previously shown that dominant-negative Eps15 inhibits the cleavage of Notch ΔE. It now appears that Eps15b, an Eps15 isoform that lacks EH-domains (48), interacts with AAK1 in fibroblasts. Eps15b is the only Eps15 isoform found in AAK1 pull-down, as antibodies against Eps-15 EH-domains did not reveal any additional partner (6G4 antibody, (59)). Whereas one of the DPF-motifs of AAK1 seems to be directly or indirectly involved in AAK1-Eps15b interaction, mutation of the EH domain-binding NPF motif did not interfere with this interaction (45). Both Eps15 and Eps15b contain an ubiquitin-interacting motif that directly recognizes monoubiquitinated cargos (47, 48, 60). Eps15 colocalizes with AP2 at the plasma membrane but Eps15b is localized in EEA1-positive early endosomes (48). Monoubiquitinated Notch could thus interact with Eps15b and be further sorted to late endosomal structures. Interestingly, AAK1 is itself ubiquitinated (Fig. 3*C*) and colocalizes with EEA1 (30), thus suggesting that an AAK1/Eps15b/Notch ΔE complex may form in such structures. Further experiments will determine if Eps15b functions as a sorting signal for monoubiquitinated Notch cargo toward late endosomal structures.

Numb is another endocytic protein that acts as a Notch inhibitor via binding to AP2 in coated pits (14, 55, 61). The C terminus of Numb was shown to be essential for Notch repression in *Drosophila* cells (49), in agreement with the presence of conserved endocytic NPF- and DPF-motifs (55). We present data showing that Numb and AAK1 differentially regulate ΔE. Contrary to AAK1, Numb inhibits ΔE monoubiquitination probably favoring polyubiquitination. Of note, in cells cotransfected with AAK1 and Numb, ΔE^U was successfully pulled-down with AAK1 but not with Numb (data not shown). These results correlate with published data showing that Numb promotes Notch degradation through AIP4-mediated polyubiquitination (50, 51, 62). AAK1 and Numb act antagonistically, probably by inducing different sorting events through recruitment of alternate accessory factors. AAK1 could have a double role in these events: phosphorylation and redistribution of Numb to recycling endosomes on one hand (31); recruitment of Eps15b and stabilization of $\Delta E/\Delta E^U$ on the other hand. Numb phosphorylation releases it from clathrin-coated pits (63, 64). Therefore, Numb phosphorylation may act as an important regulatory process in the Notch pathway. Use of Numb phospho-mutants will allow a better understanding of these events and their contribution to Notch signaling.

To understand the relationship between endocytosis and monoubiquitination of activated Notch, we used a lysine-mutated form of ΔE that was resistant to monoubiquitination (10). We observed an accumulation of this mutant in EEA1-positive endosomes (data not shown) suggesting that internalization can take place before monoubiquitination. In germline cells of flies, Rab5 overexpression results in the accumulation of Notch in enlarged Rab5-positive structures (65). We show here that AAK1 colocalizes with ΔE in Rab5Q79L endosomes whereas overexpression of Numb interferes with this routing. This observation was confirmed by knocking-down Numb or AAK1: Numb knockdown enhanced ΔE/Rab5Q79L colocalization (recovery of 90% colocalization) whereas AAK1 depletion disorganized the Rab5 structures and reduced the presence of ΔE in these endosomes (<10% ΔE/Rab5Q-positive vesicles).

We can therefore propose a model involving differential sorting of activated Notch, depending on the presence of specific endocytic factors (13, 54). Ligand-induced Notch cleavage by a metalloprotease (giving rise to a molecule similar to ΔE_{TM}) is followed by AAK1 binding. AAK1 then phosphorylates Numb, leading to its dissociation from the plasma membrane and from Notch. Actived Notch can then be endocytosed through clathrin-coated pits via active AAK1. Notch monoubiquitination then takes place in EEA1-positive early endosomes and the Notch/AAK1 complex probably includes additional factors such as Eps15b. Of note, Rab5Q79L-generated EEA1 positive enlarged endosomes were also shown to contain Eps15b (48) and may thus account for the presence of activated Notch, probably monoubiquitinated, there. Further processing of Notch by the γ-secretase can then occur and lead to Notch transcriptional activation. In the absence of AAK1, Numb leads to polyubiquitination and degradation of Notch, therefore precluding further Notch activation. An alternate model would be that AAK1 acts only after Notch has been endocytosed. Competition between AAK1 and Numb for Notch could then occur later in the EE and sort the receptor to late endosomal structures such as lysosomes or MVBs (via Numb) or another compartment where γ-secretase is present and active (via AAK1). In this model the observed AAK1 interaction restricted to activated Notch can only be explained by a different localization of the inactive Notch (at the plasma-membrane) *versus* the activated membrane-tethered form (endosomal).

Our results show that fine-tuning of the level of two endocytic adaptors can account for the differential sorting of the Notch receptor: AAK1 leading to activation and Numb involving degradation. Further investigation will determine the other components that regulate this differential sorting of activated Notch.

Acknowledgments—We thank F. Logeat for helpful discussions. We are grateful to M. Treier, C. Schnatwinkel, and M. Zerial for constructs. We thank PFID members for help with confocal imaging and A. Vautrin for establishing the shAAK1 and control cell lines.

REFERENCES

1. Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997) *Cell* **90,** 281–291
2. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israël, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95,** 8108–8112
3. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israël, A. (2000) *Mol. Cell.* **5,** 207–216
4. Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000) *Mol. Cell.* **5,** 197–206

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011

5. Tien, A. C., Rajan, A., and Bellen, H. J. (2009) *J. Cell Biol.* **184,** 621–629
6. Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A., and Israël, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 34371–34378
7. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2009) *Cell* **137,** 216–233
8. Bray, S. J. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7,** 678–689
9. Le Borgne, R. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* **18,** 213–222
10. Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israël, A., and Brou, C. (2004) *J. Cell Biol.* **166,** 73–83
11. Nichols, J. T., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2007) *Traffic* **8,** 959–969
12. Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997) *Dev. Biol.* **192,** 585–598
13. Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E., and Bilder, D. (2008) *J. Cell Biol.* **180,** 755–762
14. Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M., and Knoblich, J. A. (2002) *Dev. Cell* **3,** 221–231
15. Childress, J. L., Acar, M., Tao, C., and Halder, G. (2006) *Curr. Biol.* **16,** 2228–2233
16. Gallagher, C. M., and Knoblich, J. A. (2006) *Dev. Cell* **11,** 641–653
17. Shaye, D. D., and Greenwald, I. (2002) *Nature* **420,** 686–690
18. Sorensen, E. B., and Conner, S. D. (2010) *Traffic* **11,** 1234–1245
19. Fares, H., and Greenwald, I. (1999) *Genetics* **153,** 1641–1654
20. Chien, C. T., Wang, S., Rothenberg, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18,** 598–607
21. Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2002) *J. Cell Biol.* **156,** 921–929
22. Ricotta, D., Conner, S. D., Schmid, S. L., von Figura, K., and Honing, S. (2002) *J. Cell Biol.* **156,** 791–795
23. Cope, M. J., Yang, S., Shang, C., and Drubin, D. G. (1999) *J. Cell Biol.* **144,** 1203–1218
24. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) *Science* **298,** 1912–1934
25. Umeda, A., Meyerholz, A., and Ungewickell, E. (2000) *Eur. J. Cell Biol.* **79,** 336–342
26. Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J. (2002) *Cell* **109,** 523–535
27. Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Späte, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., and Owen, D. J. (2005) *Mol. Cell* **18,** 519–531
28. Conner, S. D., Schröter, T., and Schmid, S. L. (2003) *Traffic* **4,** 885–890
29. Jackson, A. P., Flett, A., Smythe, C., Hufton, L., Wettey, F. R., and Smythe, E. (2003) *J. Cell Biol.* **163,** 231–236
30. Henderson, D. M., and Conner, S. D. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18,** 2698–2706
31. Sorensen, E. B., and Conner, S. D. (2008) *Traffic* **9,** 1791–1800
32. Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995) *Nature* **377,** 355–358
33. Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93,** 1683–1688
34. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998) *Nature* **393,** 382–386
35. Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K., Hirosawa, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1999) *DNA. Res.* **6,** 197–205
36. Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003) *J. Cell Biol.* **162,** 773–779
37. Heuss, S. F., Ndiaye-Lobry, D., Six, E. M., Israël, A., and Logeat, F. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105,** 11212–11217
38. Honjo, T. (1996) *Genes Cells* **1,** 1–9
39. Minoguchi, S., Taniguchi, Y., Kato, H., Okazaki, T., Strobl, L. J., Zimber-Strobl, U., Bornkamm, G. W., and Honjo, T. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17,** 2679–2687
40. Six, E. M., Ndiaye, D., Sauer, G., Laâbi, Y., Athman, R., Cumano, A., Brou, C., Israël, A., and Logeat, F. (2004) *J. Biol. Chem.* **279,** 55818–55826
41. Olivo-Marin, J. C. (2002) *Pattern Recognit.* **35,** 1989–1996
42. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999) *Nature* **398,** 518–522
43. Morgan, J. R., Prasad, K., Hao, W., Augustine, G. J., and Lafer, E. M. (2000) *J. Neurosci.* **20,** 8667–8676
44. Owen, D. J., and Luzio, J. P. (2000) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12,** 467–474
45. Salcini, A. E., Confalonieri, S., Doria, M., Santolini, E., Tassi, E., Minenkova, O., Cesareni, G., Pelicci, P. G., and Di Fiore, P. P. (1997) *Genes Dev.* **11,** 2239–2249
46. Jha, A., Agostinelli, N. R., Mishra, S. K., Keyel, P. A., Hawryluk, M. J., and Traub, L. M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279,** 2281–2290
47. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. P. (2002) *Nature* **416,** 451–455
48. Roxrud, I., Raiborg, C., Pedersen, N. M., Stang, E., and Stenmark, H. (2008) *J. Cell Biol.* **180,** 1205–1218
49. Frise, E., Knoblich, J. A., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93,** 11925–11932
50. McGill, M. A., and McGlade, C. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 23196–23203
51. McGill, M. A., Dho, S. E., Weinmaster, G., and McGlade, C. J. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 26427–26438
52. Wu, P. Y., Hanlon, M., Eddins, M., Tsui, C., Rogers, R. S., Jensen, J. P., Matunis, M. J., Weissman, A. M., Wolberger, C. P., and Pickart, C. M. (2003) *EMBO. J.* **22,** 5241–5250
53. Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994) *EMBO. J.* **13,** 1287–1296
54. Yamamoto, S., Charng, W. L., and Bellen, H. J. (2010) *Curr. Top Dev. Biol.* **92,** 165–200
55. Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C., and Di Fiore, P. P. (2000) *J. Cell Biol.* **151,** 1345–1352
56. Windler, S. L., and Bilder, D. (2010) *Curr. Biol.* **20,** 538–543
57. Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005) *Nature* **436,** 78–86
58. Wendland, B. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 971–977
59. Benmerah, A., Gagnon, J., Bègue, B., Mégarbané, B., Dautry-Varsat, A., and Cerf-Bensussan, N. (1995) *J. Cell Biol.* **131,** 1831–1838
60. Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D., and Hicke, L. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4,** 389–393
61. Guo, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996) *Neuron* **17,** 27–41
62. Chastagner, P., Israël, A., and Brou, C. (2008) *PLoS. ONE* **3,** e2735
63. Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007) *Dev. Cell* **13,** 15–28
64. Tokumitsu, H., Hatano, N., Yokokura, S., Sueyoshi, Y., Nozaki, N., and Kobayashi, R. (2006) *FEBS. Lett.* **580,** 5797–5801
65. Wilkin, M., Tongngok, P., Gensch, N., Clemence, S., Motoki, M., Yamada, K., Hori, K., Taniguchi-Kanai, M., Franklin, E., Matsuno, K., and Baron, M. (2008) *Dev. Cell* **15,** 762–772

Downloaded from www.jbc.org at INSTITUT PASTEUR MEDIATHEQUE, on September 3, 2011