



HAL
open science

Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4) est une nouvelle protéine interagissant avec les phosphoinositides, impliquée dans la polarité et la migration cellulaire

Adrien Rousseau

► **To cite this version:**

Adrien Rousseau. Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4) est une nouvelle protéine interagissant avec les phosphoinositides, impliquée dans la polarité et la migration cellulaire. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ108 . tel-01149633

HAL Id: tel-01149633

<https://theses.hal.science/tel-01149633>

Submitted on 7 May 2015

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.

École doctorale des sciences de la vie et de la santé

ED 414

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS UMR 7104 – INSERM U964

THÈSE présentée par :

Adrien ROUSSEAU

soutenue le : **06 septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie**

**Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4
(TRAF4) est une nouvelle protéine interagissant
avec les phosphoinositides, impliquée dans la
polarité et la migration cellulaire**

THÈSE dirigée par :

Fabien ALPY

IGBMC, Illkirch

Catherine TOMASETTO

IGBMC, Illkirch

RAPPORTEURS :

Dr Catherine REGNIER

Novartis Institutes for Biomedical Research, Oncology Research, Basel

Dr Myriam POLETTE

INSERM U903, Reims

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr Maxime LEHMANN

UMR 7213 CNRS-LBP, Illkirch

Pr Jean-Paul BORG

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille

Je tiens avant tout à remercier le Docteur Catherine Régnier, le Docteur Myriam Polette, le Professeur Maxime Lehmann et le Professeur Jean-Paul Borg d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie très sincèrement Marie-Christine et Catherine pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire pendant ces cinq dernières années. Un cadre exceptionnel et très formateur que je ne pourrai que recommander. De nature à foncer tête baissée, vous m'avez appris à prendre du recul sur mes projets pour au final mieux avancer ! Je vous remercie pour vos conseils avisés et très constructeurs. Merci Catherine pour tes corrections qui ont dues te donner du fil à retordre !!! Nos discussions sur les perspectives de carrière et le monde de la science ont été très instructives et m'aideront pour la suite.

Un très grand merci à Fabien. Nous sommes partis de loin avec TRAF4, une protéine insaisissable qui fait tout et rien à la fois, pour au final voir grandir un projet qui m'a passionné tout au long de la thèse. Tu as su me donner une grande liberté pendant ma thèse tout en me recadrant quand il le fallait. Tu es très méthodique et tu m'as appris un large panel de technique qui me servira beaucoup pour la suite. Tu as de nombreuses qualités qui font de toi un encadrant d'exception : gentillesse, réflexion, patience, rigueur et considération. Tu ne m'as jamais pris de haut et toutes nos discussions étaient très constructives et je t'en remercie.

Je remercie l'ensemble des membres passés et actuels de l'équipe de Biologie Moléculaire et Cellulaire des cancers du sein qui m'ont permis de travailler dans un environnement convivial. Je te remercierai après David car ça prendra plus de temps !! Merci à Sébastien qui m'a encadré pendant mon M1, une personne sincère et très impliquée. Merci à Elisabeth, Emilie, Jinxiang, Nassim et François pour les longues discussions sur le monde de la science. Merci à Isabelle et Corinne pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés. Merci aux deux dernières, Stéphanie et Léa, pour qui je n'en doute pas, je suis un modèle !!!! Vous avez apporté de la convivialité et de la bonne humeur au sein de l'équipe, ne changez pas.

Merci à nos collaborateurs qui ont vraiment fait du bon travail : Alastair, Pierre, Yves, Didier et Benoit. Ça m'a vraiment fait plaisir de travailler avec vous. Merci à Fabrice pour ses conseils précieux et sa disponibilité. Merci Shankar pour avoir partagé tes connaissances et ta bonne humeur avec moi. Merci à tous les services communs de l'IGBMC : Culture cellulaire, Imagerie et Spectrométrie de masse.

Un grand merci à toute la clique du RU !!! Thomas, Jérôme, Anne-So, Thibaut, Stéphanie, Léa (oui encore elles...), Sara et David (ça sera bientôt ton tour David, patience !!). Une vraie bande d'amis et des fous rires à chaque repas ! Vous allez beaucoup me manquer. Au pire je mangerai avec vous en Skype !!

Thomas et Jérôme, dès le M2 le courant est passé ! On s'est beaucoup entraîné pendant les périodes difficiles (Bourses, Thèses ...) et vous êtes devenus mes meilleurs amis

(oui David toi aussi mais j'ai dit après...). On gardera contact dans tous les cas et plus tard on pourra monter notre équipe ensemble. Bon Jérôme, je te pardonne pour tous les temps d'attentes que j'ai enduré par ta faute !!! Mais sérieux, fais un effort !!! En tous cas, toutes nos séances de sport où on a refait le monde étaient vraiment sympas. On fera nos séances de sport en Skype promis ! Thomas, je te dois 90% de mes fous rires, tu es vraiment quelqu'un d'extra et, qui plus est, de très bon conseil. Et comme convenu, si ça ne marche pas en science on se la jouera à la Breaking Bad !!

David, que dire... les deux compères purifiant encore et toujours plus ! On s'est tout de suite bien entendu et on a développé une vraie amitié qui m'a même permis d'améliorer mon côté Portugais !! (Superbock, choriza, pêche et même maçonnerie !! lol). On se ressemble sur beaucoup de points et j'ai toujours apprécié nos virées et activités extra-thèses quelques fois un peu dégantées faut le reconnaître. Je suis vraiment content de la tournure que prennent les choses pour toi et félicitation pour ton boulot ! On gardera contact alors habitues-toi à l'avion (Si si les hommes sont fait pour voler !).

Un grand MERCI à ma famille qui m'a toujours soutenu dans l'accomplissement de ma thèse. Merci « Mam » pour croire en moi et toujours me pousser vers l'avant, tu es ma première motivation. Tu t'es toujours battue pour nous et ça m'a rendu plus fort. Ne change pas tu es la meilleure. Merci à ma petite sœur (du moins en taille) et à mon frérot par alliance qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont permis de me changer les idées quand j'en avais besoin. Merci à la knacki (mon filleul) qui m'a appris que chaque chose à sa place ;) . On dit toujours qu'on choisit ses amis mais pas sa famille, moi si j'avais à choisir, pour sûre, je vous choisirai.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	4
AVANT-PROPOS	9
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
CHAPITRE 1 : LA FAMILLE TRAF DANS L'EVOLUTION	12
1.1. LA PHYLOGENIE DES TRAFS.....	12
1.2. LA FONCTION DES PROTEINES TRAFS DANS L'EVOLUTION	12
1.3. ORGANISATION STRUCTURALE DES TRAFS DANS L'EVOLUTION	13
1.3.1. Le domaine TRAF	14
1.3.2. Le domaine RING.....	14
1.3.3. La région centrale des TRAFs.....	16
1.4. LES PROTEINES TRAFS CHEZ LES MAMMIFERES	17
1.4.1. Profil d'expression des TRAFs.....	17
1.4.2. La déficience des TRAFs chez la souris.....	18
1.4.3. Le rôle des TRAFs dans la signalisation des récepteurs aux TNF	19
1.4.3.1. Les TNFRs à domaine de mort	20
<i>1.4.3.1.1. La voie extrinsèque de type I</i>	<i>20</i>
<i>1.4.3.1.2. La voie extrinsèque de type II</i>	<i>21</i>
<i>1.4.3.1.3. TRADD et le recrutement de TRAF2</i>	<i>21</i>
1.4.3.2. Les TNFRs à motif TIM	21
<i>1.4.3.2.1. Activation de NF-κB médiée par les TRAFs</i>	<i>22</i>
1.4.3.2.1.1. La voie NF- κ B canonique.....	22
1.4.3.2.1.2. La voie NF- κ B non-canonique.....	23
<i>1.4.3.2.2. Activation de JNK médié par les TRAFs.....</i>	<i>23</i>
1.4.3.3. Les TNFRs dépourvus de domaine intracellulaire.....	24
1.4.4. Le rôle des TRAFs dans la signalisation des récepteurs Toll/IL1Rs.....	24
1.4.5. Le rôle des TRAFs dans la voie de signalisation du TGF-β.....	25
1.4.5.1. La voie TGF-β canonique.....	26
1.4.5.2. La voie TGF-β non-canonique dépendante du complexe TAK1/TRAF6.....	26
1.4.5.3. Implication de la voie TGF-β dans les cancers	27
1.5. TRAF4, UN MEMBRE ATYPIQUE DE LA FAMILLE TRAF.....	28
1.5.1. TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer	28
1.5.2. Les données récentes sur TRAF4.....	46
1.5.2.1. TRAF4, un régulateur négatif de l'immunité.....	46
1.5.2.2. TRAF4, une protéine impliquée dans la myélinisation des axones.....	47
1.5.2.3. TRAF4, une protéine impliquée dans la polarité cellulaire.....	47
1.5.2.4. TRAF4, une protéine pro-tumorale.....	48
CHAPITRE 2 : LA POLARITE APICO-BASALE DES CELLULES EPITHELIALES	49
2.1. INTRODUCTION	49

2.2. LES DESMOSOMES.....	49
2.3. LES JONCTIONS ADHERENTES.....	50
2.3.1. Le complexe nectine-afadine.....	50
2.3.2. Le complexe cadhérine/caténine.....	50
2.4. LES JONCTIONS SERREES	51
2.4.1. Structure des jonctions serrées.....	52
2.4.1.1. Les protéines transmembranaires	52
2.4.1.1.1. L'occludine	52
2.4.1.1.2. Les claudines	53
2.4.1.1.3. Les protéines JAMs.....	54
2.4.1.2. Les protéines des plaques cytoplasmiques	54
2.4.1.2.1. La famille ZO	55
2.4.1.2.2. La famille MAGI.....	56
2.4.2. Asymétrie protéique médiée par les JSs	57
2.4.2.1. Le complexe Crumbs	57
2.4.2.1.1. Crumbs.....	57
2.4.2.1.2. PALS1	58
2.4.2.1.3. PATJ	58
2.4.2.2. Le complexe PAR	58
2.4.2.2.1. PAR6.....	58
2.4.2.2.2. PAR3	59
2.4.2.2.3. aPKC.....	59
2.4.2.3. Le complexe Scribble	60
2.4.2.3.1. Scribble	60
2.4.2.3.2. DLG	60
2.4.2.3.3. LGL.....	60
2.4.3. Asymétrie lipidique médiée par les JSs	61
2.4.3.1. Structure et fonction des phosphoinositides	61
2.4.3.2. Le rôle des PIPs dans la polarité cellulaire	62
2.5. LES JONCTIONS COMMUNICANTES	63
2.6. PATHOLOGIES LIEES AUX COMPLEXES JONCTIONNELS.....	63
2.6.1. Anomalie des JAs.....	64
2.6.2. Anomalie des JSs	64
RESULTATS ET DISCUSSIONS	66
CHAPITRE 1 : LE ROLE DE TRAF4 DANS LES JONCTIONS SERREES.....	67
1.1. INTRODUCTION	67
1.2. ARTICLE : TRAF4 is a novel phosphoinositides binding protein modulating tight junctions and favoring cell migration.....	67
1.3. ADDENDA DE L'ARTICLE.....	93
1.3.1. Les domaines TRAFs mutants forment toujours du trimère	93

1.3.2. Le domaine TRAF de TRAF4 est localisé dans des régions riches en PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans les cellules non polarisées.....	94
1.3.3. Effet pro-migratoire de TRAF4 dans des cellules mammaires non cancéreuses : les cellules MCF10A.....	95
1.3.3.1. Mise au point d'une méthode standardisée de quantification de la migration cellulaire	95
1.3.3.2. TRAF4 a un effet pro-migratoire sur les cellules MCF10A	96
1.4. LE DOMAINE TRAF EST UN NOUVEAU DOMAINE DE LIAISON AUX LIPIDES	97
1.4.1. La liaison aux PIPs est un mécanisme conservé au sein de la famille TRAF	97
1.4.2. Les lysines 313 et 345 sont conservées chez les TRAFs	99
1.4.3. Analyse du modèle d'interaction entre le domaine TRAF et les PIPs	100
1.5. CONCLUSION.....	101
CHAPITRE 2 : LE ROLE DE TRAF4 DANS LA POLARITE PLANAIRE.....	103
2.1. INTRODUCTION	103
2.1.1. Le mécanisme de convergence-extension.....	103
2.1.2. L'oreille interne	104
2.2. ETUDE DE LA PCP CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES POUR TRAF4.....	105
2.2.1. Etude des phénotypes liés à un défaut de convergence-extension	105
2.2.2. Etude de la PCP au sein de la cochlée.....	106
2.3. ETUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TRAF4 ET DES PROTEINES SMURFS.....	107
2.4. ETUDE FONCTIONNELLE DU COMPLEXE TRAF4/SMURFS	108
2.5. ETUDE DU TYPE DE POLYUBIQUITINYLATION	110
2.6. CONCLUSION.....	111
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	113
1. IMPLICATION DE TRAF4 DANS LA VOIE DU TGF-B	114
1.1. Annexe-2 : TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis.....	114
1.2. TRAF4, activateur ou répresseur de SMURF2 ?.....	115
1.3. Implication potentielle de la liaison aux PIPs dans l'activation de la voie TGF- β	117
1.4. Les rôles de TRAF4 dans les JSs et la migration sont-ils dépendants des TGF- β s ?.....	118
1.4.1. Rôle de TRAF4 dans la transition épithélio-mésenchymateuse	118
1.4.2. Le rôle de TRAF4 dans la migration.....	119
2. ETUDE DE LA FONCTION E3 UBIQUITINE LIGASE DE TRAF4.....	120
3. IDENTIFICATION DE SUBSTRAT DU DOMAINE RING DE TRAF4	121
3.1. La technique TUBE.....	121
3.2. Analyse des protéines ubiquitinylées par spectrométrie de masse.....	122
3.3. Identification des cibles de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF4.....	122
4. TRAF4 DANS LA CARCINOGENESE.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125
ANNEXE-1.....	145
ANNEXE-2.....	159

LISTE DES ABBREVIATIONS

6His :	Six Histidines
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
Act1 :	NF- κ B Activator 1
ALK :	Activin Receptor-like Kinase
AP-1 :	Activator Protein-1
Apaf-1 :	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
aPKC :	atypical Protein Kinase C
aPKCBD :	aPKC binding domain
ARN :	Acide Ribonucléique
ASK1 :	Apoptosis Signal-related Kinase 1
ATP :	Adénosine Triphosphate
BAFFR :	B cell-activating factor receptor
BCMA :	B cell maturation
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
CAD :	Caspase Activated DNase
CBP :	Calmodulin Binding Peptide
CCE :	Cellule Ciliée Externe
CCI :	Cellule Ciliée Interne
CCN :	Cellules des Crêtes Neurales
CD40 :	Cluster of Differentiation 40
CD40L :	CD40 Ligand
CDK4 :	Cell Division Kinase 4
Ce :	Caenorhabditis elegans
CEM :	Cellules Epithéliales Mammaires
Ci :	Ciona intestinalis
cIAPs :	cellular Inhibitor of Apoptosis
co-SMAD :	common-mediator SMAD
CR1 :	Conserved Region 1
CRB :	Crumbs
CRIB :	Cdc42/Rac Interaction Binding
D :	Drosophila melanogaster
DAG :	Diacylglycérol

DcR1 : Decoy Receptor 1
 DD : Death Domain
 DED : Death Effector Domain
 DIL : Dilute Domain
 DISC : Death-Inducing Signaling Complex
 Dlg : Disc large tumor suppressor
 DLS : Dynamic Light Scattering
 DR3 : Death Receptor 3
 Dr : Danio rerio
 DUB : Deubiquitinating enzyme
 Dvl : Dishevelled
 E1 : Ubiquitin-activating enzyme
 E2 : Ubiquitin-conjugating enzyme
 E3 : Ubiquitin-ligating enzyme
 EC : Ectodomain
 EEA1 : Early Endosome Antigen 1
 ERK : Extracellular signal Regulated Kinase
 FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
 FAPP1/2 : Four-Phosphate-Adaptor Protein 1/2
 FERM : band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin
 FHA : Forkhead-Associated
 FYVE : Fab-1, YOTB, Vac-1, and EEA1
 GCK : Germinal Center Kinase
 GCKR : GCK Related
 GDP : Guanosine diphosphate
 GFP : Green Fluorescent Protein
 GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene
 GMP : Guanosine monophosphate
 GST : Glutathion-S-Transfere
 GTP : Guanosine triphosphate
 GUK : Guanylate Kinase
 HAUSP : Herpesvirus-Associated Ubiquitin-Specific Protease
 HECT : Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
 HEK293T : Human Embryonic Kidney 293T
 HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

Hs :	Homo sapiens
HVEM :	Herpesvirus Entry Mediator
Hy :	Hydractinia echinata
IAA :	Iodoacetamide
IFN :	Interféron
IκB :	Inhibitor of κB
IKK :	IκB Kinase
IL-1 :	Interleukine-1
IP3 :	Inositol Triphosphate
IRAK :	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF3 :	Interferon Regulatory transcription Factor 3
I-SMAD :	Inhibitory SMAD
JA:	Jonction Adhérente
JAK/STAT :	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
JAM :	Junctional Adhesion Molecule
JC:	Jonction communicante
JNK:	c-Jun N-terminal Kinase
JS:	Jonction Serrées
LAP :	LRR and PDZ
LAPSD :	LAP Specific Domain
LB :	Lymphocytes B
LEF/TCF :	Lymphoid Enhancing Factor/T-Cell Factor
LGL :	Lethal Giant Larvae
LMP-1 :	Latent Membrane Protein-1
LPS :	Lipopolysaccharide
LRR :	Leucine Rich Repeats
LT :	Lymphocytes T
LT-βR :	Lymphotoxine-β Receptor
MAGI-1 :	Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure 1
MAGUKs :	Membrane-Associated Guanylate kinase
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MATH :	Meprin and TRAF-C homology
MDCKs :	Madin-Darby Canine Kidney
MEF :	Mouse Embryonic Fibroblast
MEKK1 :	MAPK kinase kinase 1

MIF :	Müllerian Inhibitory Factor
MS :	Mass Spectrometry
MUPP1 :	Multi-PDZ domain Protéin 1
MYD88 :	Myeloid Differentiation primary response protein 88
NEM :	N-ethylmaleimide
NF-κB :	Nuclear Factor-Kappa B
NGFR :	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>
NIK :	NF-κB-Inducing Kinase
NLS :	Séquences de Localisation Nucléaire
NOD2 :	Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2
Nogo-A :	Neurite outgrowth inhibitor-A
OPG :	Osteoprotegrin
p38 MAPK:	p38 Mitogen Activated Protein Kinase
PALS1 :	Protein-Associated with Lin Seven 1
PAR :	Partitioning defective
PATJ :	PALS1-Associated Tight Junction protein
PB1 :	Phox/Bem 1
PCP :	Planar Cell Polarity
PDZ :	PSD95, Dlg1 et ZO-1
PH :	Pleckstrin Homology
PLC :	Phospholipase C
PI3K :	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP :	Phosphoinositides
PKC :	Protéine Kinase C
PRR :	Pattern Recognition Receptor
PSD95 :	Post Synaptic Density protein 95
PTEN :	Phosphatase and TENsin homolog
RANK :	Receptor Activator of Nuclear factor κB
RING :	Really Interesting New Gene
RIP :	Receptor-Interacting Protein
R-SMAD :	Receptor-regulated SMAD
SCF ^{βTrCP} :	Skp, Cullin, F-box containing complex
SH3 :	Src Homology-3
SMURFs :	<i>Smad</i> ubiquitin regulatory factor
SRC3 :	Steroid Receptor Coactivator 3

TAB1 :	TAK1-Binding Protein-1
TACI :	Transmembrane Activator and Ca^{2+} modulator and Cyclophilin ligand Interactor
TAK1 :	TGF- β -Activating Kinase-1
TAP :	Tandem Affinity Purification
TBK1 :	TANK-Binding Kinase 1
TEM :	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β :	Transforming Growth Factor- β
TIM :	TRAF-Interacting Motif
TIR :	Toll/Interleukin 1 Receptor homology domain
TLR :	Toll-Like Receptor
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TNFR:	Tumor Necrosis Factor Receptor
TGN :	Trans-GOLGI Network
Toll/IL-1R:	Toll/Interleukine-1 receptor
TRADD :	TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAF :	TNF Receptor-Associated Factor
TRIF :	TIR domain-containing adaptor protein Inducing INF β
TUBE :	Tandem Ubiquitin-Binding Entities
UBA :	Ubiquitin-Associated
Vangl2 :	Van Gogh-like protein-2
WIPI-1 :	WD-repeat protein Interacting with PhosphoInosides-1
Wnt :	Wingless
Xl :	Xenopus laevis
Xt :	Xenopus tropicalis
ZO-1 :	Zonula Occludens-1
ZONAB :	ZO-1-associated Nucleic Acid-Binding

AVANT-PROPOS

Le cancer du sein est, dans la plupart des pays, le premier cancer féminin en termes de fréquence et de mortalité. En effet, chaque année dans le monde plus d'un million de nouveaux cas apparaissent, soit 30% des cancers féminins dans les pays industrialisés et 14% dans les pays en voie de développement (Benson and Jatoi, 2012; Jemal et al., 2011). Par ailleurs, en France, plus de cinq femmes sur cent atteintes d'un cancer du sein ont moins de 40 ans et présentent un risque élevé de récurrence. En ce qui concerne la mortalité liée à cette maladie, elle est due à l'échec thérapeutique des cancers du sein métastatiques (Benson and Jatoi, 2012). La prise en charge des patientes atteintes d'un carcinome mammaire est basée essentiellement sur des facteurs cliniques et histologiques qui n'appréhendent que partiellement l'hétérogénéité des tumeurs. Dans l'équipe de Biologie Moléculaire des Cancers du Sein nous cherchons à mieux caractériser les tumeurs mammaires d'un point de vue moléculaire dans le but d'améliorer *in fine* la prise en charge des patientes.

Lors d'une étude moléculaire, de nouveaux gènes impliqués dans le cancer du sein ont été identifiés au laboratoire (Régnier et al., 1995; Tomasetto et al., 1995). Parmi ces nouveaux gènes nous étudions le gène TRAF4 (Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factor 4) localisé sur le bras long du chromosome 17. Il a été montré au laboratoire que TRAF4 est surexprimé par environ 1/4 des cancers du sein (Bièche et al., 1996). De manière intéressante la surexpression de TRAF4 n'est pas limitée aux cancers du sein car une étude reprenant l'ensemble des données des transcriptomes référencés a identifié TRAF4 comme l'un des 67 gènes dont la surexpression est caractéristique des carcinomes (Rhodes et al., 2004). Plus récemment, ce résultat a été confirmé par une étude clinique rétrospective montrant que la protéine TRAF4 est surproduite dans plus de 40% des tumeurs solides et que cette surexpression est en partie due à l'amplification du gène (Camilleri-Broët et al., 2007).

Le gène TRAF4 code une protéine adaptatrice de 53 kDa appartenant à la famille des TRAFs composée de sept membres (Bradley and Pober, 2001). Les protéines TRAFs sont des médiateurs qui interagissent avec la queue cytoplasmique des récepteurs appartenant à la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) et des Toll/IL-1R (Toll/Interleukine-1 receptor) (Wang et al., 2010; Wu, 2004). TRAF4 est un membre atypique au sein de la famille TRAF, premièrement par son absence de fonction majeure dans les voies TNFR/TLRs, deuxièmement par son implication dans les carcinomes et troisièmement par sa localisation

subcellulaire aux jonctions serrées (JS) au sein des cellules épithéliales polarisées (Kédinger et al., 2008; Rousseau et al., 2011).

La localisation de TRAF4 aux JS a été fondatrice dans l'orientation de mon projet de recherche. En effet, le rôle précis de TRAF4 dans les cancers n'est pas connu, en revanche, de nombreuses études ont montré l'implication des jonctions serrées dans les cancers. Les JS, en plus de jouer un rôle vital dans la cohésion et le maintien de l'intégrité de l'épithélium, contrôlent la prolifération, la différenciation et la polarité cellulaire, trois processus altérés dans les cancers (Forster, 2008; Furuse, 2010). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, la dérégulation de l'expression de TRAF4 dans les cancers pouvait altérer le fonctionnement normal des jonctions serrées et contribuer à la carcinogénèse. Cette hypothèse a été le point de départ de différents axes de recherche qui ont été développés pendant ma thèse. Dans ce manuscrit, j'ai choisi de présenter en introduction une synthèse de la littérature couvrant la superfamille des protéines TRAFs, TRAF4 et la polarité apico-basale. Dans la partie résultats, le premier chapitre concerne le rôle de TRAF4 dans les jonctions serrées des cellules épithéliales mammaires. Il inclut un article actuellement en révision et des données additionnelles sur ce thème. Ce chapitre représente la part la plus importante de mon travail de thèse. Dans le second chapitre, j'ai exploré le rôle de TRAF4 dans la polarité planaire. Dans ce chapitre, après avoir présenté brièvement ce thème, j'ai détaillé les données obtenues *in vivo* en exploitant le modèle de souris déficientes pour TRAF4 et *in vitro*. Enfin j'ai terminé mon manuscrit par une partie discussion et perspectives dans laquelle j'ai intégré les résultats d'un article en collaboration qui a été accepté très récemment.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

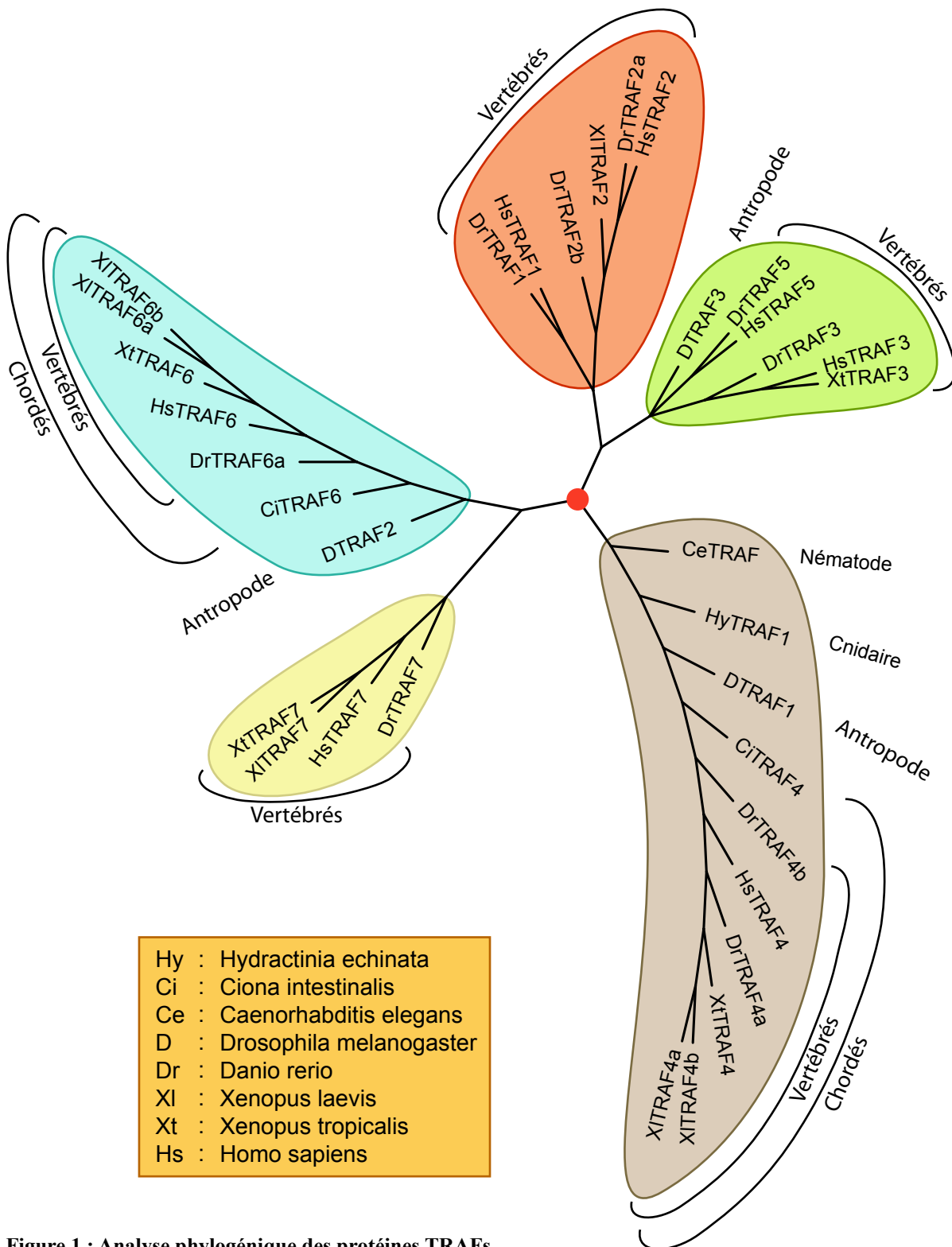


Figure 1 : Analyse phylogénique des protéines TRAFs

Les séquences primaires des protéines TRAFs de différentes espèces ont été alignées en utilisant le programme Clustal W. Les données de cet alignement ont servi à la réalisation d'un arbre phylogénétique par le programme iTOL (interactive Tree Of Life). Cette analyse phylogénétique montre que les plus anciens membres TRAFs sont des orthologues de TRAF4 et TRAF6.

CHAPITRE 1 : LA FAMILLE TRAF DANS L'EVOLUTION

1.1. LA PHYLOGENIE DES TRAFS

Les protéines TRAFs ont été initialement identifiées pour leurs capacités à lier les récepteurs de la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Chung et al., 2002; Rothe et al., 1994). Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine TRAF en carboxyterminal fortement conservé au cours de l'évolution (Zapata et al., 2007). En effet, des protéines TRAFs sont déjà retrouvées chez les eucaryotes inférieurs tels que les protozoaires (*Dictyostelium discoideum*). Elle est néanmoins absente chez les procaryotes et les archaebactéries suggérant que le domaine TRAF est apparu de manière précoce au cours de l'évolution des eucaryotes (Zapata et al., 2007).

Les membres les plus anciens et potentiellement fondateurs de cette famille semblent être TRAF4 et TRAF6. Pour illustrer cette donnée, j'ai réalisé une analyse phylogénétique basée sur la similarité des protéines TRAFs complètes. Cette analyse montre que les protéines TRAF4 et TRAF6 sont retrouvés dans plusieurs embranchements du règne animal (cnidaires, nématodes, arthropodes, échinodermes et chordés pour TRAF4, arthropodes et chordés pour TRAF6) (Figure 1). En effet, un orthologue de TRAF4 est retrouvé chez *Hydractinia echinata* (HyTRAF1), une Hydre appartenant à l'embranchement des cnidaires (coraux et méduses). D'autres orthologues de TRAF4 sont retrouvés chez le nématode (CeTRAF), la drosophile (DTRAF1), les tuniciers (CiTRAF4) et les vertébrés (XITRAF4a, XITRAF4b, XtTRAF4 et hsTRAF4) (Figure 1). Les orthologues de TRAF6 sont, quant à eux, retrouvés chez la drosophile (DTRAF2), les tuniciers (CiTRAF6) et les vertébrés (XITRAF6a, XITRAF6b, XtTRAF6 et HsTRAF6) (Figure 1). Les autres membres de la famille TRAF ne sont présents que chez les vertébrés à l'exception de TRAF3 qui a un orthologue chez la mouche (DTRAF3) (Figure 1). Ces données sont en accord avec une analyse phylogénétique comparant uniquement les domaines TRAFs des protéines de cette famille (Zapata et al., 2007).

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que TRAF4 et TRAF6 seraient les précurseurs de la famille TRAF et que les autres membres seraient apparus plus tardivement.

1.2. LA FONCTION DES PROTEINES TRAFS DANS L'EVOLUTION

L'organisme le plus simple possédant un gène TRAF pour lequel des informations fonctionnelles ont été rapportées est l'Hydre (un animal pluricellulaire marin) (Figure 1). Le

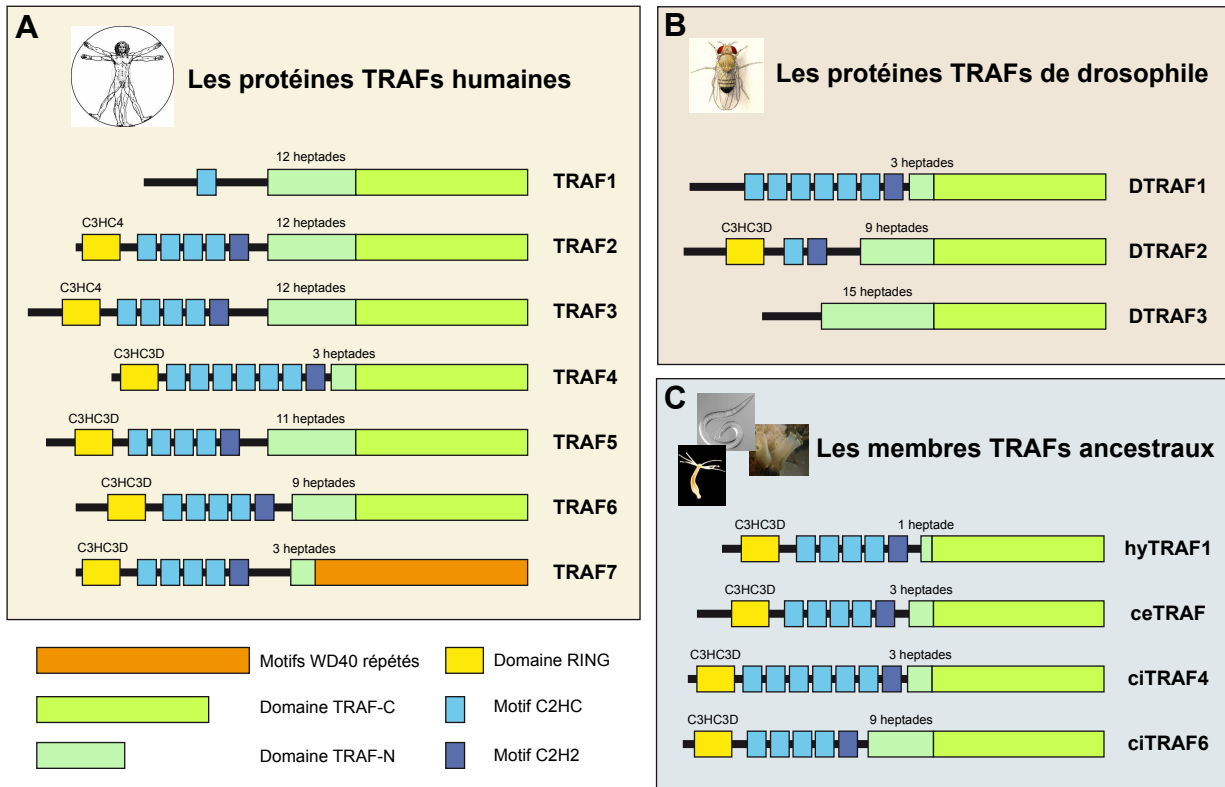


Figure 2 : Organisation structurale des protéines TRAFs

Schéma représentant les différents domaines protéiques conservés retrouvés au sein des protéines TRAFs de différentes espèces. Le domaine RING (boîte jaune) est un domaine ubiquitine ligase E3 constitué de deux doigts de zinc formant un motif consensus C3HC3D ou C3HC4. Les motifs C2HC (boîte bleu claire) et C2H2 (boîte bleu foncée) sont des doigts de zinc présents en nombre variable au sein des protéines TRAFs. Le TRAF-N (boîte vert claire) forme une superhélice de taille variable allant de 1 à 15 heptades. Le TRAF-C (boîte vert foncée) est un domaine globulaire permettant la trimerisation des protéines TRAFs et médiant des interactions protéine-protéine. Le domaine WD40 de TRAF7 (boîte orange) est formé de sept motifs WD40 répétés, un motif qui sert majoritairement de support à la formation de complexes protéiques.

gène HyTRAF1 est présent sous deux isoformes : long (HyTRAF1) qui code une protéine contenant un domaine RING, cinq doigts de zinc et un domaine TRAF carboxyterminal ; et court (HyTRAF1a) qui a une délétion de 35 acides aminés conduisant à la perte d'un doigt de zinc. HyTRAF1 est exprimé à tous les stades de développement excepté l'embryogenèse précoce tandis que HyTRAF1a est exprimé exclusivement lors des étapes de morphogenèse précoce (Mali and Frank, 2004). La morphogenèse précoce de cet animal est caractérisée par une intense mort cellulaire. Les protéines TRAFs ayant des propriétés pro-apoptotiques, il a été proposé que HyTRAF1a régule la morphogenèse en agissant comme un médiateur de l'apoptose. D'autres études réalisées chez la mouche confirment l'implication des TRAFs dans le développement et l'apoptose. En effet, la délétion de l'orthologue de TRAF4 chez la drosophile, DTRAF1, est létale au stade embryonnaire et les mutants ne peuvent pas atteindre le stade pupal. De surcroît, les mutants hétérozygotes ont un défaut de fermeture du thorax (Cha et al., 2003). DTRAF1 est un régulateur de la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et l'expression ectopique de DTRAF1 dans le disque imaginal de l'œil engendre une sur-activation de la voie pro-apoptotique JNK conduisant à une altération de la morphogenèse de l'œil (Cha et al., 2003; Liu et al., 1999). Des études réalisées chez le poisson zèbre, le xénope et la souris ont également validé l'implication de TRAF4 au cours du développement (Kalkan et al., 2009; Kedinger et al., 2005; Régnier et al., 2002).

TRAF6 apparait chez les insectes avec la protéine DTRAF2 (Figure 1). Elle est impliquée dans l'immunité innée médiée par le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) (Cha et al., 2003; Shen et al., 2001). En effet, il a été montré que DTRAF2 est requis pour l'expression de la diptéricine et de la drosomycine, deux peptides antimicrobiens sécrétés suite à une infection fongique ou bactérienne chez la drosophile. L'implication de TRAF6 dans l'immunité et la réponse inflammatoire a également été démontrée chez les mammifères (Inoue et al., 2007; Landström, 2010).

Ces données suggèrent une conservation fonctionnelle des protéines TRAFs dans l'évolution, avec deux versants ; l'un lié aux processus développementaux et l'autre lié à la réponse immunitaire et inflammatoire.

1.3. ORGANISATION STRUCTURALE DES TRAFS DANS L'EVOLUTION

Les protéines TRAFs partageant une organisation structurale très proche et ce, depuis HyTRAF1. En effet, toutes ces protéines possèdent un domaine TRAF en carboxyterminal à l'exception de TRAF7 où ce domaine est remplacé par sept motifs WD40 répétés (Figure 2). La majorité des protéines TRAFs possède deux domaines additionnels : un domaine RING

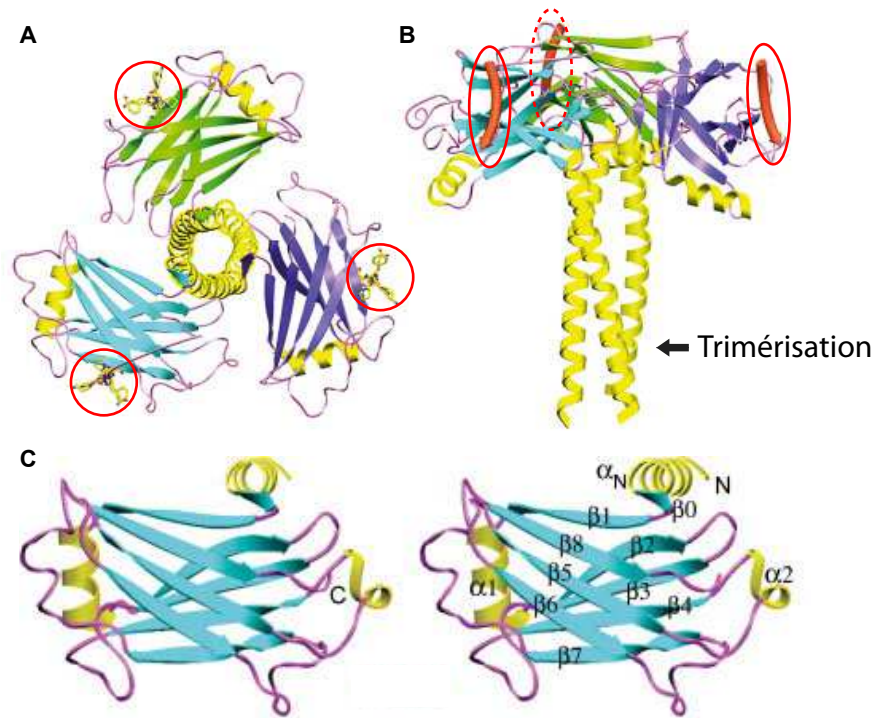


Figure 3 : Représentation en ruban de la structure cristalline du domaine TRAF de TRAF2

A-B. Vue de dessus (A) et vue de côté (B) de la structure cristalline du domaine TRAF de TRAF2 complexé avec la queue cytoplasmique du récepteur TNFR2. Les feuillets bêta antiparallèles de chaque monomère sont colorés en bleu, vert et violet, respectivement. Les hélices alpha sont représentées en jaune. Le domaine TRAF forme un homotrimère en forme de champignon qui est subdivisé en deux sous-domaines : le TRAF-N qui forme le pied et le TRAF-C qui forme le chapeau. Le peptide correspondant à la région cytoplasmique du récepteur TNFR2 est entouré en rouge.

C. Représentation en ruban du domaine TRAF de TRAF2 énumérant les différentes structures secondaires. α : Hélice alpha (jaune) ; β : feuillet bêta (bleu) (adapté de Park et al., 1999).

(Really Interesting New Gene) en N-terminal formé de deux doigts de zinc et dans la région centrale la présence de 1, 2, 5 ou 7 doigts de zinc (Figure 2) (Inoue et al., 2000; Regnier et al., 1995). Pour les homologues identifiés dans les organismes les plus distants des mammifères du point de vue de l'évolution (Figure 2 C), on retrouve le domaine TRAF, le domaine RING et cinq à sept motifs doigt de zinc.

1.3.1. Le domaine TRAF

Une étude structurale de la protéine TRAF2 a montré que le domaine TRAF se trimérise pour former un complexe ayant la forme d'un champignon avec une région TRAF-N formant le pied et une région TRAF-C forment le chapeau (Figure 3). Le domaine TRAF-N forme une superhélice de longueur variable permettant de stabiliser le trimère. La longueur du domaine TRAF-N semble être importante pour la spécificité de formation des hétérotrimères. En effet, seul des hétérotrimères de TRAF1-TRAF2, TRAF2-TRAF3, TRAF2-TRAF5 et TRAF3-TRAF5 ont été décrits et ces quatre membres sont les seuls à posséder des superhélices de taille supérieure à 10 heptades (Figure 2) (Arch et al., 1998; He et al., 2004; Pullen et al., 1998; Takeuchi et al., 1996). Le domaine TRAF-N de TRAF4 est très court (3 heptades), ce qui pourrait expliquer son incapacité à former des hétérotrimères avec les autres protéines TRAFs. Le domaine TRAF-C est, quant à lui, formé de 7 à 8 feuillets bêta antiparallèles, un repliement qui n'est pas restreint aux protéines TRAFs (Figure 3). En effet, ce domaine est aussi appelé MATH (meprin and TRAF-C homology) par son homologie de séquence avec les métalloprotéases matricielles de la famille des méprines (Zapata et al., 2007). Le domaine TRAF-C, en plus de permettre la trimérisation des TRAFs, sert de site de liaison aux récepteurs membranaires activés par leur ligand. Une fois recruté à la membrane, le domaine TRAF sert de plateforme de signalisation en recrutant d'autres partenaires protéiques (Inoue et al., 2000; Wu, 2004).

1.3.2. Le domaine RING

Le domaine RING est caractérisé par un enchaînement de cystéines et d'histidines conservées complexant 2 atomes de zinc et formant un motif consensus C3HC4 (Deshaies and Joazeiro, 2009). Cependant, la dernière cystéine peut-être remplacée par un acide aspartique formant un RING non-conventionnel C3HC3D (Régnier et al., 1995). Ce motif non-conventionnel est très représenté au sein des protéines TRAFs. En effet, parmi les 33 TRAFs analysés en figure 1 : 22 ont un motif C3HC3D, 8 ont un motif C3HC4 et 3 en sont dépourvus. De manière intéressante, la majorité des TRAFs ancestraux a un domaine non-

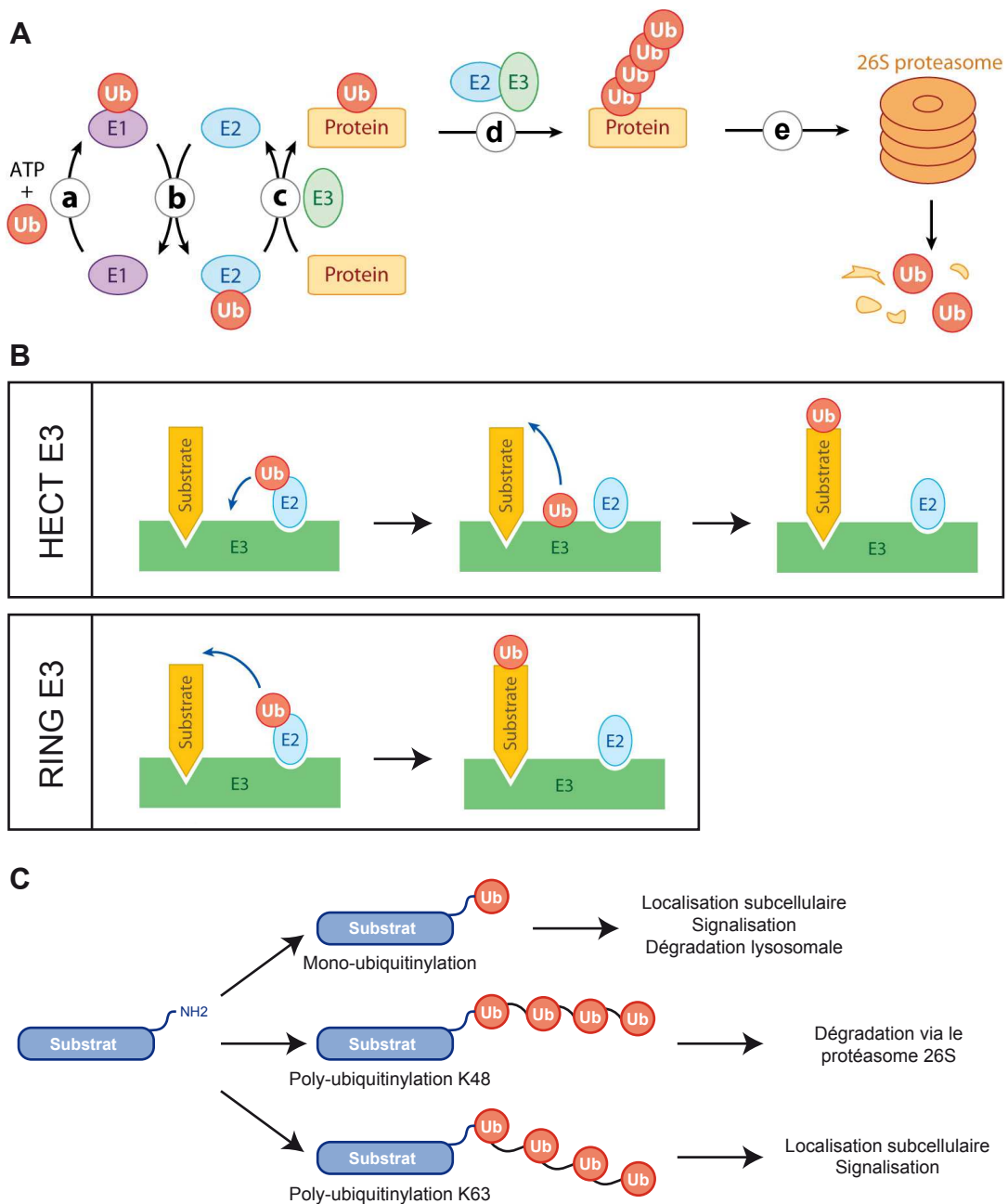


Figure 4 : Le mécanisme d'ubiquitinylation des protéines

A. Après liaison d'une molécule d'ubiquitine activée sur l'enzyme E1 (a), elle est transférée sur une enzyme E2 par transthiolation (b). Le complexe E2-Ubiquitine interagit ensuite avec une enzyme ubiquitine ligase E3 qui transfère l'ubiquitine sur le substrat (c). Le complexe E2-E3 peut ensuite ajouter des molécules d'ubiquitine additionnelles, on parle alors de poly-ubiquitinylation (d). La poly-ubiquitinylation de type K48 est connue pour induire la dégradation du substrat via le protéasome 26S (adapté de Deshaies and Joazeiro, 2009).

B. Les ubiquitines ligases E3 de type HECT et RING ont un mode d'action différent. Les domaines HECTs ont une cystéine conservée qui sert de site de liaison à l'ubiquitine provenant de l'enzyme E2. L'ubiquitine liée covalamment au domaine HECT est ensuite transférée sur le substrat. A l'inverse, le domaine RING transfère directement l'ubiquitine de l'enzyme E2 sur une lysine du substrat (adapté de Deshaies and Joazeiro, 2009).

C. Représentation des principaux types d'ubiquitinylation. La mono-ubiquitinylation des protéines peut aussi bien avoir un rôle activateur en modifiant la localisation subcellulaire ou la structure du substrat, qu'un rôle inhibiteur en entraînant la dégradation via la voie lysosomale. Tandis que la poly-ubiquitinylation de type K48 est connue pour induire la dégradation du substrat via le protéasome 26S, la poly-ubiquitinylation de type K63 a un rôle activateur sur le substrat.

conventionnel tandis que les motifs C3HC4 sont apparus plus tardivement avec les protéines TRAF2 et 3 (Figure 2).

Le domaine RING est un domaine ubiquitine ligase E3 impliqué dans l'ubiquitinylation des protéines (Chasapis and Spyroulias, 2009). L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en la fixation covalente d'une ou de plusieurs molécules d'ubiquitine sur la lysine d'un substrat. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui est fortement conservée au cours de l'évolution. En effet, de l'homme à la levure l'ubiquitine a 96 % d'identité. Chez les mammifères, l'ubiquitine est codée par quatre gènes distincts (Kimura and Tanaka, 2010). Les gènes *UBA52* et *RPS27A* codent pour un monomère d'ubiquitine fusionné aux protéines ribosomales L40 et S27a, respectivement. Après traduction, ces protéines de fusion sont séparées par un clivage enzymatique libérant les protéines ribosomales du monomère d'ubiquitine. Les gènes *UBB* et *UBC* codent, quant à eux, des précurseurs protéiques correspondant à une répétition en tandem de 4 et de 9 molécules d'ubiquitines, respectivement. Un clivage post-traductionnel permet ensuite de produire des monomères d'ubiquitine (Kimura and Tanaka, 2010).

L'ubiquitinylation est un processus multi-étape qui fait intervenir trois complexes enzymatiques nommés E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (ubiquitin-ligating enzyme). Après que l'ubiquitine soit activée de façon ATP-dépendante par l'enzyme E1, elle est transférée dans le site actif de l'enzyme E2 par transthiolation (Figure 4A). Les enzymes ligases de type E3 confèrent la spécificité d'ubiquitination en reconnaissant spécifiquement le substrat puis en transférant l'ubiquitine de l'enzyme E2 sur ce dernier (Figure 4A). Il existe deux classes d'enzymes E3, la première étant caractérisée par la présence d'un domaine RING et la deuxième par un domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus). Ces deux classes diffèrent par leur mécanisme de transfert de l'ubiquitine. En effet, tandis que le domaine RING permet un transfert direct de l'ubiquitine de l'enzyme E2 sur le substrat, le domaine HECT lie l'ubiquitine de façon covalente avant de la transférer sur le substrat (Figure 4B). Indépendamment du type d'enzyme ligase E3, le complexe E2-E3 peut transférer une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur le substrat, on parle alors respectivement de mono- ou poly-ubiquitinylation, (Figure 4A) (Deshaies and Joazeiro, 2009). En ce qui concerne la poly-ubiquitinylation, il y a sept lysines accessibles à la surface de l'ubiquitine et potentiellement disponibles pour la formation de chaînes de poly-ubiquitines (Figure 4C). Ces différents types d'ubiquitinylation auront différents effets sur le substrat comme induire sa dégradation via le protéasome 26S ou moduler sa fonction, sa structure et/ou sa localisation subcellulaire (Figure 4C). Par exemple,

l'assemblage d'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines liées par leur lysine 48 (K48) sur une protéine est une marque conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S. A l'inverse, la polyubiquitinylation avec une chaîne d'ubiquitines liées par leur lysine 63 (K63) ne conduit généralement pas à la dégradation du substrat mais modifie sa fonction et/ou sa localisation subcellulaire (Figure 4C) (Deshaies and Joazeiro, 2009; Iwai and Tokunaga, 2009). La majorité des protéines TRAFs est connue pour réaliser de la polyubiquitinylation de type K63, ce qui en fait des facteurs clés impliqués dans la transduction des signaux intracellulaires (Pineda et al., 2007).

1.3.3. La région centrale des TRAFs

La majorité des protéines TRAFs possède 5 à 7 doigts de zinc supplémentaires dans leur région centrale. Le dernier doigt de zinc de motif C2H2 est présent dans l'ensemble des TRAFs excepté le groupe TRAF7 et la protéine DTRAF3 (Figure 2). Les doigts de zinc de type C2H2 sont largement représentés au sein des facteurs de transcription (Iuchi, 2001; Razin et al., 2012). Ils ont un large spectre de fonctions incluant la liaison à l'ADN, l'ARN et aux protéines. Les autres doigts de zinc présent dans la région centrale sont en nombre variable et de type C2HC. La majorité des TRAFs possèdent 4 motifs C2HC successifs tandis que le groupe TRAF7 et la protéine DrTRAF1 en ont seulement 2. Les protéines HsTRAF1, DTRAF2 et DTRAF3 en sont totalement dépourvues (Figure 2). De manière intéressante, à partir des tuniciers et des insectes, l'ensemble des orthologues de TRAF4 possèdent 6 doigts de zinc C2HC suggérant au cours de l'évolution une duplication de l'exon 3 qui code pour deux doigts de zinc (Figure 2). Le motif C2HC est peu représenté mais semble être impliqué dans des interactions protéine-ADN et/ou protéine-protéine (Akhtar, 2001; B et al., 2004).

Il a été montré que ces doigts de zinc sont importants pour la fonction des protéines TRAFs. En effet, le premier motif C2HC de TRAF6 est requis pour l'activation des kinases JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase) en réponse à l'interleukine-1 (IL-1) et au LPS (Lipopolysaccharide). De plus, ce premier motif C2HC est nécessaire à l'auto-ubiquitination de TRAF6 ainsi qu'à son interaction avec Ubc13, une enzyme E2 impliqué dans le transfert de l'ubiquitine (Lamothe et al., 2008). Enfin, une autre étude a montré que les deux derniers doigts de zinc de la région centrale de TRAF2 et TRAF6 sont nécessaires à l'activation de la voie NF- κ B induite par l'IL-1 et le LPS (Kobayashi et al., 2001; Takeuchi et al., 1996). Néanmoins, le mécanisme d'action de ces doigts de zinc au niveau moléculaire reste toujours inconnu.

1.4. LES PROTEINES TRAFS CHEZ LES MAMMIFERES

Les protéines TRAFs sont des adaptateurs qui interagissent avec la queue cytoplasmique des récepteurs appartenant à la famille des TNFR et des Toll/IL-1R (Wang et al., 2010; Wu, 2004). De cette manière, elles relayent les signaux extracellulaires, générés suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur. Chez les mammifères, la famille TRAF comporte sept paralogs (TRAF1 à TRAF7) majoritairement impliqués dans l'apoptose et/ou l'immunité. Les deux premiers membres de la famille TRAF, TRAF1 et TRAF2, ont été découverts lors d'un criblage double hybride visant à identifier des protéines interagissant avec le récepteur TNFR2 (Rothe et al., 1994). TRAF3 a été isolé de la même manière comme liant la queue cytoplasmique des récepteurs CD40 et LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) (Cheng et al., 1995; Hu et al., 1994; Mosialos et al., 1995; Sato et al., 1995). Le quatrième membre TRAF a été découvert lors d'un criblage différentiel de banques d'ADN complémentaires de ganglions lymphatiques humains métastasés dérivant de cancers du sein (Régnier et al., 1995; Tomasetto et al., 1995). TRAF5 a été identifié pour sa capacité à lier la région cytoplasmique des récepteurs CD40 (Ishida et al., 1996b) et LT β R (Lymphotoxin beta Receptor) (Nakano et al., 1996). La protéine TRAF6 a été initialement identifiée comme appartenant à la voie de signalisation médiée par l'IL-1 (Cao et al., 1996; Ishida et al., 1996a). Le dernier membre de la famille, TRAF7, a été découvert par une approche protéomique, visant à identifier des médiateurs de la voie de signalisation induite par le TNF- α (Bouwmeester et al., 2004).

1.4.1. Profil d'expression des TRAFs

Tandis que TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF6 et TRAF7 ont une expression ubiquitaire, les profils d'expression de TRAF1 et TRAF5 sont plus restreints. Le gène TRAF1 est exprimé dans un nombre limité de tissus incluant la rate, le poumon et le testicule. Néanmoins, il a été décrit que son expression peut-être fortement induite par une multitude de stimuli tels que l'IL-1, le TNF- α , le ligand de CD40 (CD40L) et le LPS (Lee and Choi, 2007). De manière intéressante, il a été montré que tous ces ligands conduisent à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et que le promoteur de TRAF1 possède trois éléments de réponse à ce facteur de transcription (Schwenzer et al., 1999). Le gène TRAF5 est fortement exprimé dans les poumons, le thymus, la rate et les reins, et est présent à un niveau plus faible dans le cerveau et les poumons (Ishida et al., 1996b). Le gène TRAF4, bien qu'ubiquitaire, présente une expression forte et tissu-spécifique au cours du développement. En effet, chez la souris, TRAF4 est exprimé précocement dans différents tissus tels que le thymus, l'intestin, les glandes salivaires, les arcs branchiaux, les cellules de la crête neurale et l'épithélium de la

Souris	Viabilité	Phénotype	Références
TRAF1-/-	Normale	<ul style="list-style-type: none"> • Développement normal • Hyperprolifération des cellules T (LT) suite à une stimulation par CD3 • Réponse exacerbée au TNFα • Ratio LT/LB augmenté dans ganglions lymphatiques inguinaux 	Tsitsikov et al., 2001 Sabbagh et al., 2006
TRAF2-/-	74 % de mortalité embryonnaire. Mort prématurée des survivants dans les dix jours	<ul style="list-style-type: none"> • Les survivants sont normaux à la naissance mais meurent par cachexie dans les deux semaines qui suivent • Diminution de la masse musculaire et adipeuse • Atrophie de la rate et du thymus • Lymphopénie T et B • Réduction du nombre de thymocytes • Augmentation du taux de TNFα circulant 	Lee et al., 1997a,b Yeh et al., 1997 Lin et al., 2003 Nguyen et al., 1999 Tada et al., 2001
TRAF3-/-	Normal à la naissance. Mort prématurée dans les dix jours qui suivent la naissance	<ul style="list-style-type: none"> • Les survivants sont normaux à la naissance mais meurent par cachexie dans les 10 jours qui suivent • Déplétion progressive de tous les leucocytes • Atrophie de la rate 	Xu et al., 1996 Xie et al., 2004
TRAF4-/-	30% de mortalité embryonnaire vers 14 jours de gestation	<ul style="list-style-type: none"> • Les survivants sont plus petits en taille et en poids d'environ 20% • Malformation de la trachée, des côtes, du sternum et de la colonne vertébrale • Défaut de fermeture du tube neural (<i>spina bifida</i>) • Migration des cellules dendritiques réduite 	Shiels et al., 2000 Regnier et al., 2002 Cherfils-Vicini et al., 2008
TRAF5-/-	Normale	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la réponse des cellules B • Diminution de la prolifération des LT induite par CD3 • Réponse Th2 exacerbée 	Nakano et al., 1999 So et al., 2004
TRAF6-/-	50% de mortalité embryonnaire	<ul style="list-style-type: none"> • Les survivants sont plus petit (40%) et meurent dans les trois semaines qui suivent la naissance • Ostéopétrose • Elargissement du cœur, du foie et de la rate • Défaut de fermeture du tube neural (Exencéphalie) 	Lomaga et al., 1999 Naito et al., 1999,2002 Kobayashi et al., 2003 Gobda et al., 2004 Yeiser et al., 2004 King et al., 2006

Table 1 : Récapitulatif des différents phénotypes des souris déficientes pour les protéines TRAFs

La cachexie correspond à un affaiblissement de l'organisme suite à une dénutrition importante. La *spina bifida* est une anomalie congénitale caractérisée par un défaut de fermeture du tube neural majoritairement dans la région caudale. L'ostéopétrose ou «maladie des os de marbre» correspond à une augmentation de la masse osseuse pouvant aboutir à une cécité et une surdité. Il n'y a pas de souris déficientes pour TRAF7 à ce jour. LT : Lymphocyte T ; LB : Lymphocyte B et Th2 : Lymphocyte T helper-2.

trachée. Une expression ubiquitaire plus faible est ensuite retrouvée chez l'adulte (Masson et al., 1998).

1.4.2. La déficience des TRAFs chez la souris

Des souris déficientes pour chaque protéine TRAF ont été établies excepté pour TRAF7. La caractérisation de ces souris a permis une meilleure compréhension du rôle physiologique des TRAFs et, de manière intéressante, la délétion de TRAF2, TRAF3, TRAF4 et TRAF6 conduit à une forte mortalité embryonnaire (Table 1). La cause de cette létalité semble diverger selon les TRAFs. En effet, seule la délétion de TRAF4 et celle de TRAF6 conduisent à des troubles du développement embryonnaire, tels qu'un défaut de fermeture du tube neural et des malformations osseuses, pouvant expliquer leur létalité. A l'inverse, les souris déficientes pour TRAF2 et TRAF3 n'ont pas de malformations apparentes, la létalité observée serait due à un taux anormalement élevé de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α conduisant *in fine* à une cachexie (Table 1). La délétion de TRAF1 et celle de TRAF5, deux membres apparus tardivement au cours de l'évolution, n'entraînent pas de défauts de viabilité suggérant une absence de fonction lors du développement et/ou une redondance fonctionnelle avec une autre protéine TRAF. TRAF1, dépourvu de domaine RING, est décrit comme un répresseur de l'immunité. La délétion de ce gène chez la souris engendre une réponse exacerbée au TNF α ainsi qu'une hyperprolifération des lymphocytes T, ce qui confirme son rôle régulateur. A l'inverse, la déficiente de TRAF5 chez la souris atténue la réponse des lymphocytes T et des lymphocytes B suite à une stimulation par différents ligands tels que OX40 et CD40, suggérant un rôle activateur de l'immunité.

Les souris déficientes pour TRAF2, TRAF3 et TRAF6 survivantes ont de sévères anomalies liées à l'immunité et l'inflammation. La délétion de TRAF2 et TRAF3 conduit à une lymphopénie de type B et T ainsi qu'à une atrophie de divers organes lymphoïdes secondaires comme la rate (Table 1). A l'inverse, les souris TRAF4 $-/-$ ont un système immunitaire normal, elle présentent uniquement un défaut de migration des cellules dendritiques (Cherfils-Vicini et al., 2008). Les souris TRAF6 $-/-$ ont majoritairement un défaut d'activation de la voie Toll/IL-1 impliquée dans l'immunité innée.

Dans leur ensemble, ces études *in vivo* mettent en exergue deux versants fonctionnels des protéines TRAFs : l'un lié au développement embryonnaire, médié par TRAF4 et TRAF6, et l'autre lié à l'immunité impliquant l'ensemble de la famille, excepté TRAF4 qui ne semble pas avoir un rôle essentiel.

TNFR	Receptor	Other names	Ligand(s)	Intracellular adaptors	Physiologic functions	References
1A	TNFR1	p55, CD120a	TNF- α , LT- α	TRADD, RIP, TRAF1, 2, 5 (indirect)	Macrophage activation, germinal center formation	Fuchs et al. (1992)
1B	TNFR2	p75, CD120b	TNF- α , LT- α	TRAF1, 2, 5	Bacterial response, T cell homeostasis	Smith et al. (1990)
3	LT β R	TNF-R-III	LT- β , LIGHT	TRAF2, 3, 4, 5	LN organogenesis	Baens et al. (1993)
4	OX40	CD134	OX40L	TRAF1, 2, 3, 5	T cell activation	Latza et al. (1994)
5	CD40	NA	CD40L (CD154)	TRAF1, 2, 3, 5, 6	B cell proliferation, maturation, class switching, DC maturation, activation, survival	Stamenkovic et al. (1989)
6	Fas	CD95, Apo1	FasL	FADD	Lymphocyte homeostasis, T cell cytotoxicity, immune privilege maintenance	Itoh et al. (1991)
7	CD27	NA	CD27L (CD70)	TRAF2, 5	T cell activation	Camerini et al. (1991)
8	CD30	NA	CD30L	TRAF1, 2, 3, 5	T cell regulation, expressed on Reed-Sternberg cells	Durkop et al. (1992); Gohda et al. (2004)
9	4-1BB	CD137	4-1BBL	TRAF1, 2, 3	DC-T cell communication	Schwarz et al. (1993)
10A	DR4	Apo2, TRAIL-R1	TRAIL	FADD	Lymphocyte homeostasis	Pan et al. (1997b)
10B	DR5	TRAIL-R2	TRAIL	FADD	Lymphocyte homeostasis	Pan et al. (1997a)
10C	DcR1	TRAIL-R3	TRAIL	None	Decoy for TRAIL	Sheridan et al. (1997)
10D	DcR2	TRAIL-R4	TRAIL	None	Decoy for TRAIL	Marsters et al. (1997)
11A	TRANCE-R	RANK	TRANCE (RANKL, OPGL, ODF)	TRAF1, 2, 3, 5, 6; c-Src, c-Cbl	Osteoclastogenesis, DC survival/activation, mammary gland development, LN organogenesis	Anderson et al. (1997)
11B	OPG	OCIF	TRANCE	None	Decoy for TRANCE	Simonet et al. (1997)
12	DR3	Apo3, TRAMP	TWEAK	TRADD	ND	Chinnaiyan et al. (1996)
14	HVEM	ATAR	LT- α , LIGHT	TRAF1, 2, 3, 5	Herpes simplex virus receptor, T cell proliferation	Montgomery et al. (1996)
16	NGFR	p75	NGF	TRAF1, 2, 3, 4, 5, 6	Neurogenesis	Johnson et al. (1986)
17	BCMA	NA	BlyS	TRAF1, 2, 3	B cell responses	Laabi et al. (1994)
18	AITR	GITR	AITRL	TRAF1, 2, 3, 4	Inhibits TCR-induced apoptosis	Gurney et al. (1999)
19	Troy	Taj	ND	TRAF1, 2, 3, 5	Hair follicle development, axonal regeneration	Eby et al. (2000)
NA	TACI	NA	BlyS	TRAF2, 5, 6	B cell survival	von Bulow and Bram (1997)
NA	EDAR	NA	EDA	TRAF1, 2, 3, 5, 6	Hair follicle development	Monreal et al. (1999)
NA	DR6	NA	ND	ND	ND	Pan et al. (1998)
NA	LMP1	NA	Self-activating	TRAF1,2, 3, 5	Epstein-Barr virus protein, activates B cells	Hammerschmidt and Sugden (1989); Wang et al. (1990)

— TNFRs dépourvus de domaine intracellulaire

— TNFRs à domaine de mort

— TNFRs à motif TIM

Table 2 : Tableau descriptif des principaux TNFRs

Tableau décrivant les différents couples TNF/TNFR, leurs protéines adaptrices ainsi que leurs fonctions principales (adapté de Ha et al., 2009).

1.4.3. Le rôle des TRAFs dans la signalisation des récepteurs aux TNF

La nécrose tumorale induite par des extraits bactériens a été décrite il y a plus d'un siècle. En 1962 le docteur O'Malley et ses collègues ont démontré que cet effet était indirect (O'Malley et al., 1988). Ils montrèrent que le sérum provenant de souris traitées au LPS (Lipopolysaccharide), un composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, pouvait engendrer une nécrose hémorragique des tumeurs issues de souris non exposées. Ainsi, O'Malley et ses collègues furent les premiers à proposer le terme de facteur de nécrose tumorale (TNF). Une décennie plus tard, l'analyse du sérum de souris infectées par différents pathogènes a identifié le TNF comme étant un facteur sérique circulant sécrété par les macrophages et les lymphocytes B (Carswell et al., 1975; Williamson et al., 1983). C'est en 1984 que l'ADNc codant le TNF a été isolé et séquencé pour la première fois (Pennica et al., 1984).

Parallèlement, la lymphotoxine, une cytokine sécrétée par les cellules lymphocytaires, a été identifiée pour son activité cytotoxique sur les cellules tumorales (Kolb and Granger, 1968). Le TNF et la lymphotoxine sont très homologues, en conséquence elles furent renommées respectivement TNF α et TNF β . Ces deux cytokines sont les fondateurs de la superfamille du TNF qui compte à ce jour plus de 20 membres (Table 2) (Croft et al., 2013). Les protéines de la superfamille du TNF sont des ligands transmembranaires qui peuvent être actifs sous cette forme, ou suite à un clivage protéolytique sous la forme de cytokines solubles. Très souvent, un ligand peut lier plusieurs récepteurs différents et ainsi activer des voies de signalisations distinctes ; en corollaire, différents ligands partagent souvent le même récepteur (Table 2 et Figure 5) (Dempsey et al., 2003; Locksley et al., 2001). A ce jour, une trentaine de récepteurs TNFRs ont été identifiés. Bien que leur profil d'expression varie considérablement d'un récepteur à l'autre, ils sont largement exprimés au sein de cellules immunitaires. Les récepteurs de la superfamille des TNFRs sont majoritairement présents à la surface des cellules mais peuvent également être libérés dans le compartiment extracellulaire via un clivage par des métalloprotéases matricielles. La libération de leur domaine extracellulaire va être importante pour la régulation de l'activation des voies de signalisation induites par les TNFRs (Aderka, 1996). Il a été décrit que les TNFRs forment des structures trimériques qui, après avoir lié un trimère de ligands, vont subir des modifications conformationnelles permettant la transduction du signal (Ha et al., 2009).

D'un point de vue fonctionnel, la superfamille des TNFRs régule un grand nombre de processus développementaux et joue un rôle clé dans de nombreux mécanismes biologiques incluant l'apoptose, la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire (Grewal, 2009).

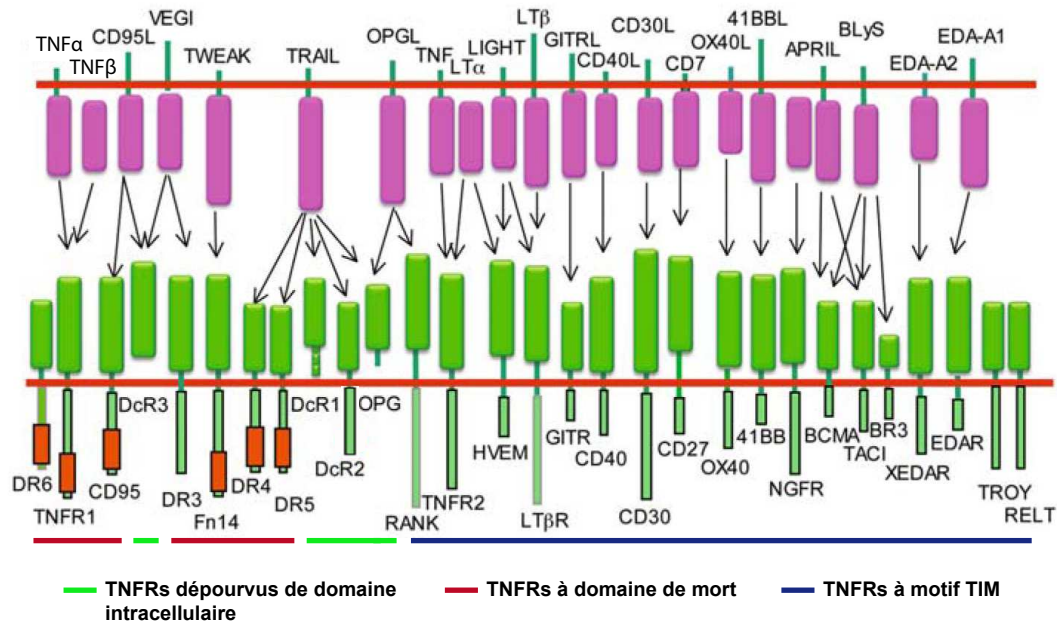


Figure 5 : Représentation schématique des ligands de la superfamille du TNF (haut) et de leurs récepteurs (bas)

La relation récepteur-ligand est indiquée par des flèches. Les domaines de mort (DD : Death Domain) des TNFRs sont représentés par un rectangle rouge. TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor and TIM : TRAF-Interacting Motif (adapté de Grewal et al., 2009).

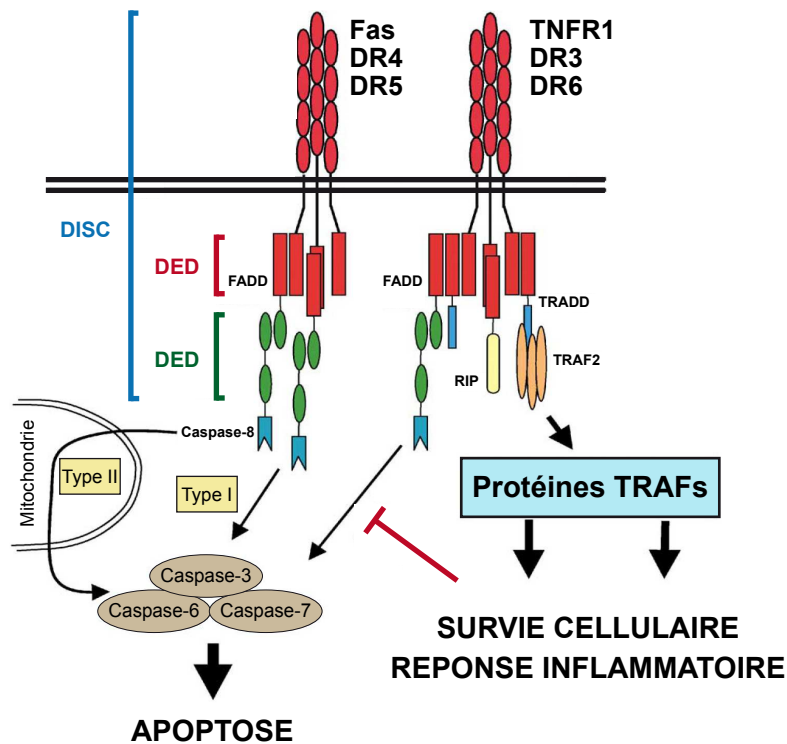


Figure 6 : Voies de signalisation activées par les TNFRs à domaine de mort (DD)

L'association des domaines de mort avec les protéines FADD ou TRADD prédit si le récepteur va uniquement activer la voie apoptotique ou s'il va activer la voie de survie médiée par TRAF2. La protéine TRADD est donc à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur la voie apoptotique médiée par les TNFRs à domaine de mort. DISC : Death-Inducing Signaling Complex; DD : Death Domain; DED : Death Effector Domain; DR : Death Receptor; FADD : Fas-Associated protein with DD; TRADD : TNF Receptor-Associated DD; RIP : Receptor-Interacting Protein (adapté de Dempsey et al., 2003).

Basée sur leurs séquences cytoplasmiques et les voies de signalisation qu'ils induisent, les TNFRs sont classés en trois groupes : les TNFRs à domaine de mort (DD : Death Domain), les TNFRs à motif TIM (TRAF-Interacting Motif) et les TNFRs dépourvus de domaine intracellulaire (Table 2 et Figure 5).

1.4.3.1. Les TNFRs à domaine de mort

Les récepteurs à domaine de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire. Fas (CD95), TNFR1, DR3 (Death Receptor 3), DR4, DR5 et DR6 sont les récepteurs à domaines DD (Figure 5) (Huang et al., 1996; Tartaglia et al., 1993). La liaison de leurs ligands entraîne le recrutement de protéines adaptatrices et induit des voies de signalisation permettant l'activation des caspases et *in fine* à la mort cellulaire. Tandis que les récepteurs Fas, DR4 et DR5 interagissent directement avec FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), les récepteurs TNFR1 et DR3 recrutent FADD par l'intermédiaire de la protéine TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) (Figure 6). Une fois recruté à la membrane, FADD interagit avec la caspase 8 grâce à son domaine effecteur de mort (DED : Death Effector Domain) et permet la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe, formé du récepteur TNFR, des protéines adaptatrices à domaines de mort (FADD et éventuellement TRADD) et de la caspase-8, permet l'activation de la voie apoptotique extrinsèque de type I ou de type II (Figure 6) (Ozören and El-Deiry, 2002; Schütze et al., 2008).

1.4.3.1.1. La voie extrinsèque de type I

La voie extrinsèque de type I consiste en l'activation par clivage protéolytique successifs et hiérarchisés des pro-caspases-3, -6 et -7 en caspases actives. Sous leur forme active, ces différentes caspases vont ensuite cliver plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans la réparation cellulaire. Elles vont également activer les DNases de la famille des CADs (Caspase Activated DNase) qui conduiront à la fragmentation très spécifique de l'ADN en fragments dont les tailles sont des multiples de 180 paires de bases, une caractéristique des cellules apoptotiques (Figure 6) (Schütze et al., 2008).

1.4.3.1.2. *La voie extrinsèque de type II*

La caspase-8, dans certains types cellulaires comme les hépatocytes, peut induire le clivage de la protéine Bid en facteur pro-apoptotique tBid. La protéine tBid, en ciblant la membrane externe des mitochondries, induit l'oligomérisation de Bak qui forme des pores libérant le cytochrome C. Le cytochrome C conduit à la formation de l'apoptosome (7 protéines Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apaf-1) et 2 caspases-9) qui, en activant la caspase-3, va induire le même cycle apoptotique que celui de la voie extrinsèque de type I (Figure 6) (Schütze et al., 2008).

1.4.3.1.3. *TRADD et le recrutement de TRAF2*

TRADD, une fois recruté par les récepteurs TNFR1, DR3 et DR6, interagit avec TRAF2 et RIP (Receptor-Interacting Protein) afin d'activer les voies de signalisation NF- κ B et JNK qui vont protéger la cellule de l'apoptose et initier une réponse inflammatoire (Figure 6). Ainsi, après fixation du ligand sur son récepteur, un complexe se forme entre les TNFRs, TRADD, RIP et TRAF2 conduisant dans un premier temps à la survie cellulaire et à la réaction inflammatoire. Par la suite, ce complexe se dissocierait et permettrait le recrutement du complexe DISC pour induire l'apoptose (Micheau and Tschopp, 2003).

1.4.3.2. **Les TNFRs à motif TIM**

Le second groupe de récepteurs possède un ou plusieurs motifs TIM dans la région cytoplasmique. Ce groupe inclut TNFR2, CD40, CD30, CD27, LT- β R (Lymphotoxine- β Receptor), OX40, 4-1BB, BAFFR (B cell-activating factor receptor), BCMA (B cell maturation), TACI (Transmembrane Activator and calcium-modulator and Cyclophilin ligand Interactor), RANK (Receptor Activator of Nuclear factor κ B), NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*), HVEM (Herpesvirus Entry Mediator), GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene), TROY, EDAR, XEDAR et RELT (Figure 5 et Table 2). Bien que la séquence en acides aminés du motif TIM soit peu conservée, une séquence consensus majoritaire (P/S/A/T)-X-(Q/E)-E liée par TRAF2, TRAF3 et TRAF5 est retrouvée chez CD40, CD30, HVEM, OX40, p75NGFR et RANK. A l'inverse, TRAF6 lie un motif unique P-X-E-X-X-(résidu acide ou aromatique) qui est présent chez RANK et CD40. La liaison des ligands sur les récepteurs à motif TIM conduit au recrutement des protéines TRAFs et ainsi à l'activation des voies de signalisation telles que NF- κ B, JNK, p38, ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) et PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) (Dempsey et al., 2003). Tandis

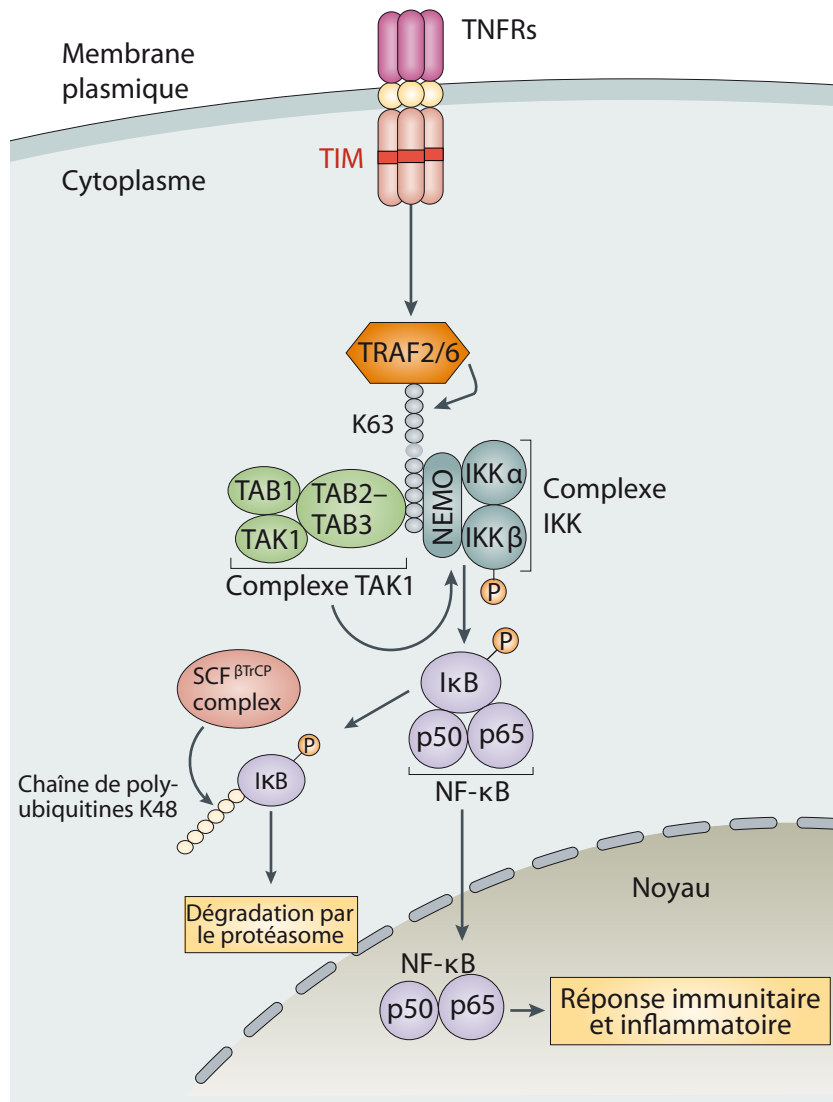


Figure 7 : Activation de la voie NF-κB canonique

Après activation des TNFRs par leurs ligands, les protéines TRAFs sont recrutées à la membrane plasmique où elles vont s'auto-polyubiquitiner (K63). Ces chaînes de polyubiquitines vont recruter les complexes TAK1 et IKK. Le complexe TAK1 est formé de TAB1 (TAK1-Associated Binding protein 1), TAB2 et TAK1 (TGF-β-Activating Kinase-1). Le complexe IKK est quant à lui formé de deux sous-unités catalytiques (IKKα et IKKβ) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO). Le recrutement de TAK1 conduit à son activation qui va phosphoryler IKKβ. Le complexe IKK activé va ensuite phosphoryler IκB (Inhibitor of κB), ce qui va induire sa polyubiquitinylation de type K48 par le complexe SCF^{BTCP} et ainsi sa dégradation par le protéasome 26S. La dégradation d'IκB libère les facteurs de transcription NF-κB qui sont transloqués dans le noyau où ils pourront induire l'expression de leurs gènes cibles. TIM : TRAF-Interacting Motif (adapté de Jiang et Chen, 2011).

que l'implication des TRAFs dans les voies p38, ERK et PI3K reste mal comprise, leur rôle dans l'activation de NF- κ B et JNK est bien caractérisé. Je vais focaliser la suite de l'introduction sur l'activation de NF- κ B et celle de JNK médiée par les TRAFs.

1.4.3.2.1. Activation de NF- κ B médiée par les TRAFs

NF- κ B est un facteur de transcription homo- ou hétéro-dimérique qui, une fois activé, lie les sites κ B des promoteurs de nombreux gènes majoritairement impliqués dans la survie cellulaire, l'inflammation ainsi que l'immunité innée et acquise. Les dimères sont formés à partir de cinq protéines de la famille Rel : p50 et son précurseur p105, p52 et son précurseur p100, p65 (RelA), RelB et c-Rel. Dans le cytoplasme, les complexes NF- κ B sont maintenus dans un état inactif par la protéine I κ B ainsi que par la présence des formes non-clivées des précurseurs p100 et p105. L'activité des dimères NF- κ B peut être régulée selon deux voies de signalisation dites canonique et non-canonique. Tandis que la voie canonique est activée par la dégradation d'I κ B (Inhibitor of κ B), la voie non-canonique est initiée par le clivage du précurseur p100 (Baeuerle and Henkel, 1994; Perkins, 2007; Sun and Ley, 2008).

1.4.3.2.1.1. La voie NF- κ B canonique

La stimulation des TNFRs à motif TIM par leurs ligands conduit au recrutement des protéines TRAFs comme TRAF2 et TRAF6, ce qui conduit à leur auto-polyubiquitinylation de type K63 (Figure 7). Le complexe formé par TAK1 (TGF- β -Activating Kinase-1), TAB1 (TAK1-Binding Protein-1) et TAB2 est ensuite recruté au niveau des récepteurs par liaison des protéines TAB1 et TAB2 aux chaînes de polyubiquitine des protéines TRAFs. Ce recrutement engendre l'activation de la kinase TAK1 qui, en phosphorylant la protéine IKK β , va activer le complexe IKK (I κ B Kinase). Ce complexe est formé de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO) (Figure 7) (Régnier et al., 1997; Sun and Ley, 2008). Le complexe IKK activé va ensuite phosphoryler I κ B entraînant sa polyubiquitinylation de type K48 par le complexe SCF ^{β TrCP} (Skp, Cullin, F-box containing complex), une marque conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S. La dégradation d'I κ B démasque leurs séquences de localisation nucléaire (NLS) et libère les facteurs de transcription NF- κ B permettant leur translocation dans le noyau où ils pourront réguler l'expression de gènes cibles (Figure 7) (Dai et al., 2012; Landström, 2010; Skaug et al., 2009).

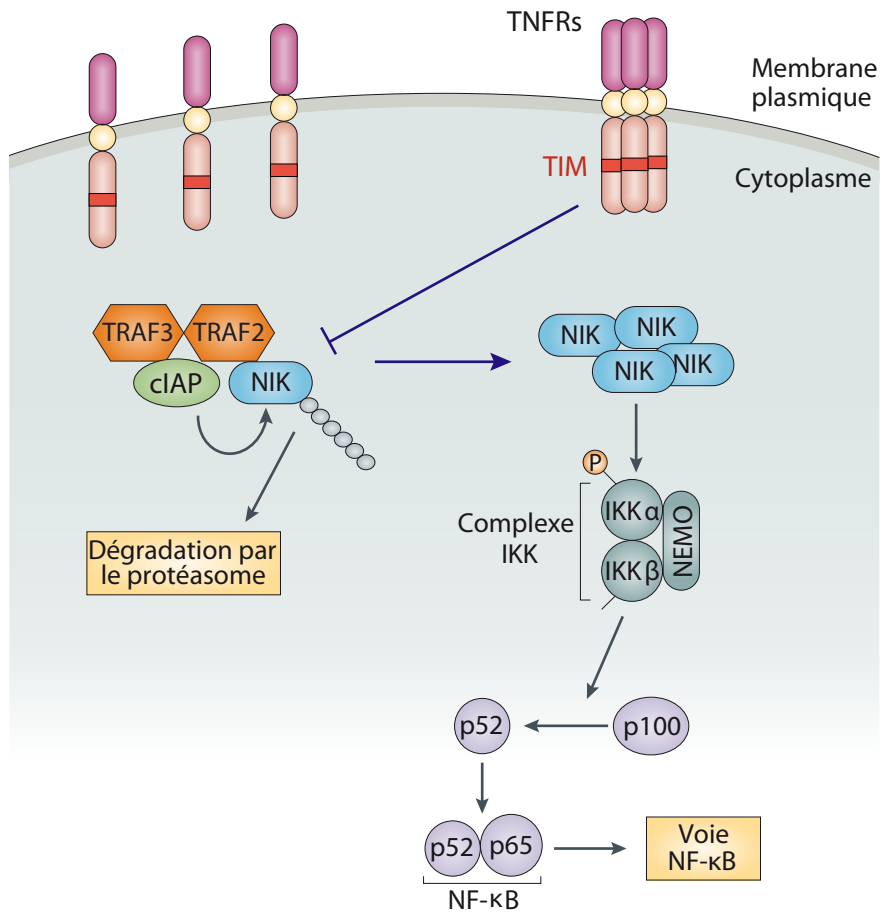


Figure 8 : La voie NF-κB non-canonique

En absence de stimulation, TRAF2 et TRAF3 permettent le rapprochement des protéines cIAP (cellular Inhibitor of Apoptosis) et NIK (NF-κB-Inducing Kinase). cIAP polyubiquitinye NIK, ce qui induit sa dégradation via le protéasome 26S. La stimulation de certains récepteurs de la famille TNFRs conduit à l'inhibition des protéines TRAFs et/ou cIAPs, ce qui induit l'accumulation de NIK. La protéine NIK va ensuite phosphoryler et activer IKKα (IκB Kinase α). IKKα, en phosphorylant le précurseur p100, va induire son clivage en protéine p52 mature. Les dimères de NF-κB contenant p52 seront ensuite transloqués dans le noyau où ils réguleront l'expression de gènes cibles. TIM : TRAF-Interacting Motif (adapté de Jiang et Chen, 2011).

D'autres kinases comme MEKK1 (MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) kinase 1) et MEKK3 pourraient également induire l'activation du complexe IKK médiée par les protéines TRAFs (Baud et al., 1999; Yang et al., 2001).

1.4.3.2.1.2. La voie NF- κ B non-canonique

La protéine NIK (NF- κ B-Inducing Kinase) joue un rôle central dans la voie non-canonique. L'accumulation de NIK conduit à la phosphorylation d'IKK α , ce qui induit le clivage du précurseur p100 en protéine mature p52 (Figure 8). Les dimères de NF- κ B contenant p52 seront ensuite transloqués dans le noyau où ils réguleront l'expression de gènes cibles (Figure 8) (Ling et al., 1998; Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2001). Plus récemment, il a été rapporté que le complexe formé par les protéines TRAF2, TRAF3 et cIAPs (cellular Inhibitor of Apoptosis) contribue à la dégradation de NIK. Dans ce modèle, TRAF2 et TRAF3 permettent le rapprochement des protéines NIK et cIAPs, ce qui conduit à la polyubiquitinylation de NIK et à sa dégradation via le protéasome 26S (Figure 8). La voie non-canonique serait donc activée suite à l'inhibition des TRAFs et/ou des protéines cIAPs (Sun and Ley, 2008).

1.4.3.2.2. Activation de JNK médié par les TRAFs

D'autres voies de signalisation activées par les TNFRs aboutissent à l'activation des kinases JNK1/2/3. Comme toutes les MAPKs, les protéines JNKs sont activées par une cascade de phosphorylation médiée par des serine/thréonine kinases. Brièvement, une MAP3K (MAPKKK) va activer par phosphorylation une MAP2K (MAPKK) qui, en retour, va phosphoryler une MAPK et l'activer. La MAPK peut ensuite phosphoryler différents facteurs de transcription et induire leur activation. Les MAP3Ks peuvent elles-mêmes être activées par une MAP4K ou par les protéines TRAFs directement (Bogoyevitch et al., 2010).

Le mécanisme d'activation de la voie des MAP kinases par les TRAFs reste mal compris. Néanmoins, des études structure-fonction ont permis d'identifier la région des protéines TRAFs impliquée dans cette activation. Ces études ont montré que la région aminoterminal contenant le domaine RING et les deux premiers doigts de zinc, était requise pour l'activation de la voie JNK (Takeuchi et al., 1996). Un autre critère important pour l'activation des JNKs est la localisation subcellulaire des différents TRAFs. En effet, il a été décrit que les TRAFs ont différents degrés de résistance à la solubilisation par détergents. Les protéines TRAF2, 4, 5 et 6 sont relativement insolubles et leur surexpression conduit à l'activation de JNK. A

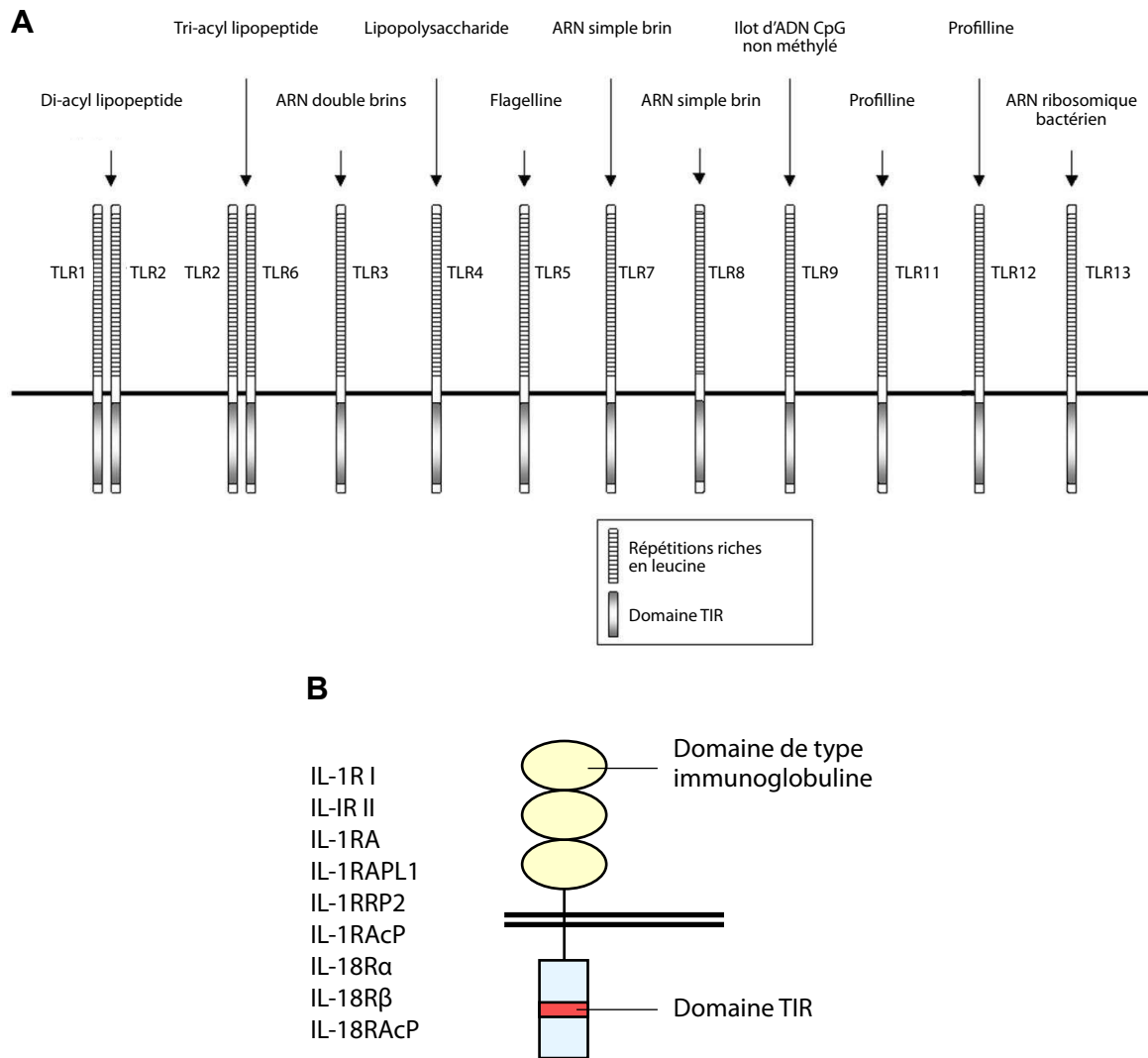


Figure 9 : Représentation schématique des récepteurs de la famille des Toll/IL-1R

A. Représentation schématique des TLRs (Toll-Like Receptors). La relation récepteur-ligand est indiquée par des flèches. Les TLR-3, -7, -8, -9, -11 et -13 sont intracellulaires tandis que les TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10 et -12 sont exposés à la surface des cellules. TLR : Toll-Like Receptor ; TIR : Toll/Interleukin 1 Receptor homology domain (adapté de Kawai and Akira, 2004).

B. Représentation schématique de la famille des récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1R). Ces récepteurs possèdent trois domaines extracellulaires de type immunoglobuline et une région cytoplasmique contenant un domaine TIR. IL-1RA : IL-1 Receptor Antagonist; IL-1RAPL1 : IL-1-Receptor Accessory-Protein-Like 1; IL-1RRP2 : IL-1-Receptor-Related Protein 2; IL-1RAcP : IL-1-Receptor Accessory Protein; IL-18R : IL-18 Receptor et IL-18RAcP : IL-18-Receptor Accessory Protein.

l'inverse, TRAF3 est très soluble et sa surexpression n'a pas d'effet sur l'activation de JNK. De manière intéressante, la localisation ectopique de TRAF3 à la membrane plasmique conduit à l'activation de la voie JNK (Dadgostar and Cheng, 2000). Il a également été décrit que, à l'instar de l'activation de la voie NF- κ B, les TRAFs peuvent utiliser la polyubiquitinylation de type K63 pour activer JNK (Habelhah et al., 2004).

Plusieurs MAP4Ks ont également été identifiées comme agissant en aval des TRAFs pour activer la voie JNK. Par exemple, ASK1 (Apoptosis Signal-related Kinase 1) est activé suite à un traitement au TNF ou suite à la surexpression des protéines TRAF2, 5 et 6. L'importance de ASK1 dans la signalisation des TNFRs a été mise en exergue par le fait que la perte de fonction de ASK1 prévient l'activation de JNK suite à un traitement au TNF ou à la surexpression des TRAFs (Nishitoh et al., 1998; Tobiume et al., 2001). D'autres MAP4Ks telles que GCK (Germinal Center Kinase) et GCKR (GCK Related) sont également impliquées dans l'activation de la voie JNK médiée par les TRAFs. Ces deux protéines sont recrutées à la membrane plasmique suite à un traitement au TNF en interagissant directement avec le domaine TRAF de TRAF2. Une fois liées à TRAF2, elles recrutent la kinase MAP3K1 qui va activer MAP2K4 (MKK4) et induire l'activation de JNK (Figure 8) (Shi et al., 1999; Yuasa et al., 1998).

1.4.3.3. Les TNFRs dépourvus de domaine intracellulaire

Le dernier groupe de récepteurs au TNF ne contient pas de domaines intracellulaires fonctionnels et inclut DcR1 (Decoy Receptor 1), DcR2, DcR3 et OPG (Osteoprotegrin) (Figure 5 et Table 2). Bien que ces récepteurs ne transduisent pas de signaux intracellulaires, ils entrent en compétition pour la liaison du ligand, ce qui les range parmi les récepteurs « leurres » régulant l'activation des TNFRs (Gibson et al., 2000).

1.4.4. Le rôle des TRAFs dans la signalisation des récepteurs Toll/IL1Rs

Les TLRs (Toll-Like Receptor) et les récepteurs IL-1Rs appartiennent à la superfamille des Toll/IL-1Rs, régulateurs clés de l'immunité innée et adaptative (Figure 9). Tandis que leurs domaines extracellulaires sont très divergents, leurs régions intracellulaires ont en commun un motif nommé TIR (Toll/Interleukin 1 Receptor homology domain). Suite à la liaison de leurs ligands, les Toll/IL-1Rs recrutent différentes combinaisons de protéines adaptatrices afin de transduire le signal. Deux protéines adaptatrices majeures sont utilisées par ces récepteurs : MYD88 (Myeloid Differentiation primary response protein 88) et TRIF

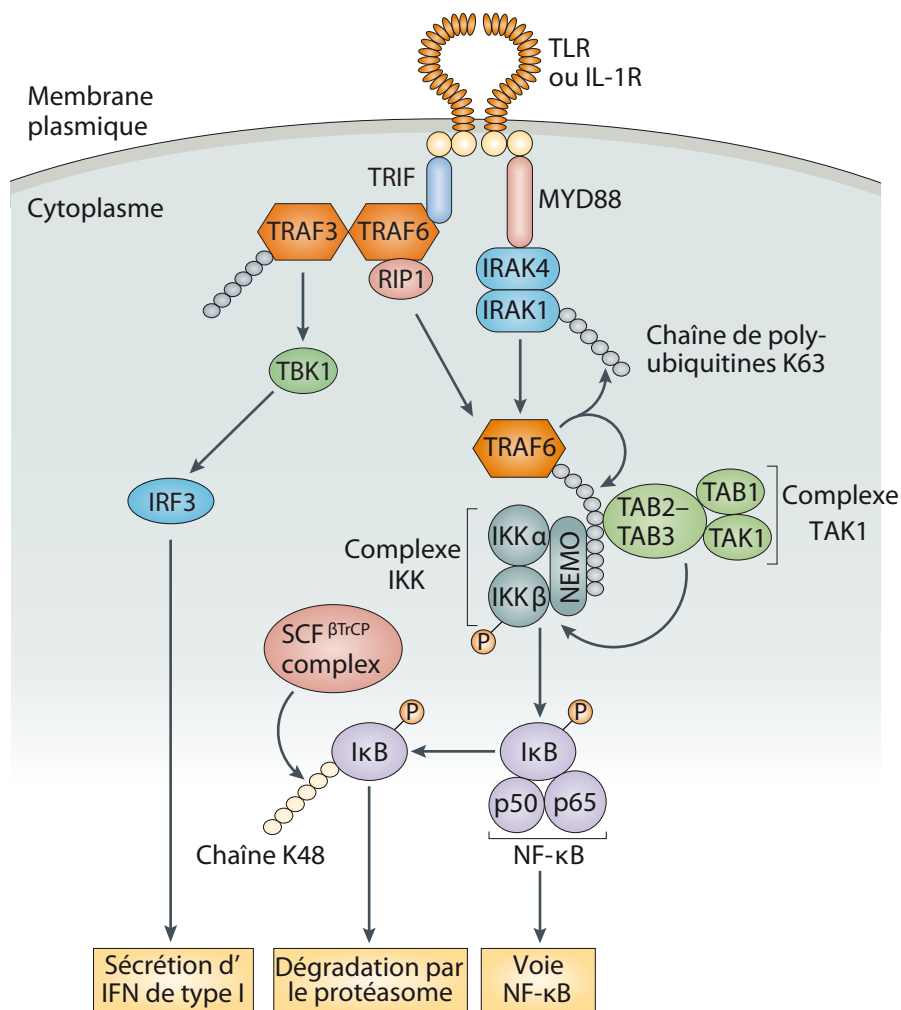


Figure 10 : La voie des Toll/IL-1R

La stimulation des récepteurs de la famille Toll/IL-1R conduit au recrutement de la protéine adaptatrice MYD88 (Myeloid Differentiation primary response protein 88), qui va ensuite recruter les kinases IRAK4 (IL-1R-Associated Kinase 4) et IRAK1 pour former le «myddosome». La protéine TRAF6 est recrutée par le myddosome où il va s'auto-polyubiquitiner (K63). Ces chaînes de polyubiquitines vont recruter les complexes TAK1 et IKK. Le complexe TAK1 est formé de TAB1 (TAK1-Associated Binding protein 1), TAB2 et TAK1 (TGF- β -Activating Kinase-1). Le complexe IKK est quant à lui formé de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO). Le recrutement de TAK1 conduit à son activation qui va phosphoryler IKK β . Le complexe IKK activé va ensuite phosphoryler I κ B (Inhibitor of κ B), ce qui va induire sa polyubiquitinylation de type K48 et ainsi sa dégradation par le protéasome 26S. La dégradation d'I κ B libère les facteurs de transcription NF- κ B qui sont transloqués dans le noyau où ils pourront induire l'expression de leurs gènes cibles. TRIF peut soit recruter le complexe TRAF6/RIP pour induire la voie NF- κ B canonique, soit recruter TRAF3 et TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) pour induire la production d'INF de type I médiée par IRF3 (Interferon Regulatory transcription Factor 3). TIM : TRAF-Interacting Motif (adapté de Jiang et Chen, 2011).

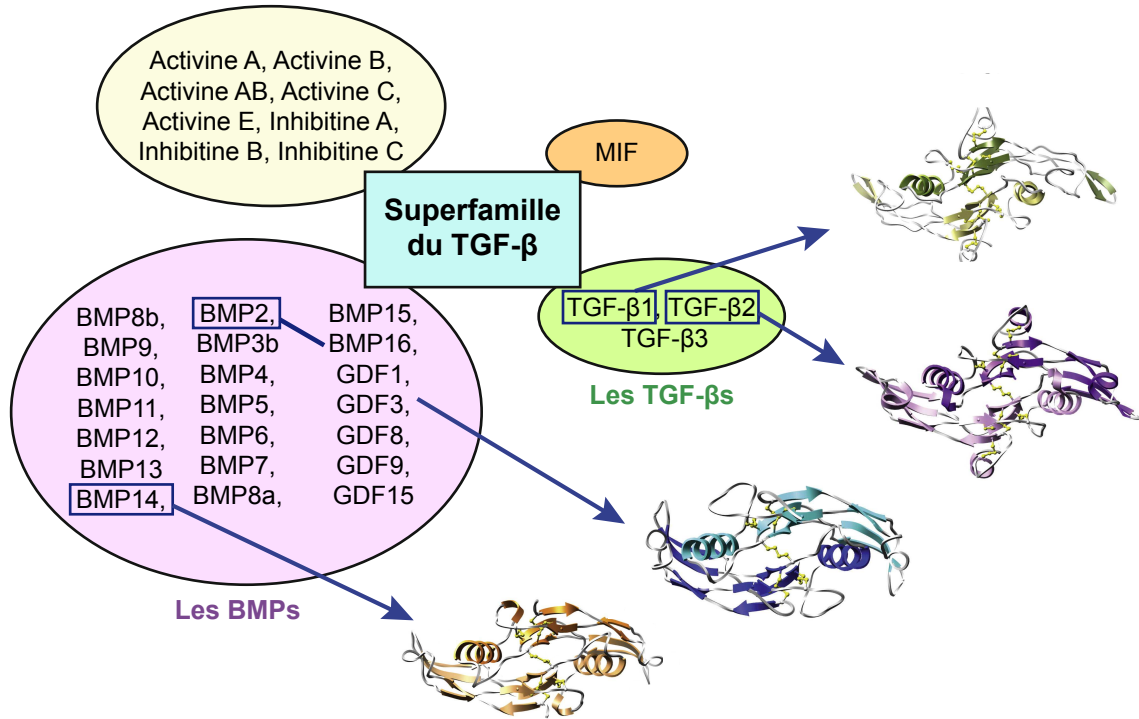
(TIR domain-containing adaptor protein Inducing $\text{INF}\beta$) (Figure 10). MYD88 est utilisée par l'ensemble des TLRs excepté TLR3, et par la majorité des récepteurs IL-1Rs, ce qui conduit à l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les voies de signalisation dépendantes de TRIF, transmises par les récepteurs TLR3 et TLR4, conduisent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons (IFN) de type I (Boraschi and Tagliabue, 2006; Kawai and Akira, 2010; Takeuchi and Akira, 2010). Après recrutement de MYD88 au niveau des récepteurs Toll/IL-1Rs activés, MYD88 recrute deux kinases de la famille IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase), IRAK4 et IRAK1 (Figure 10). Ces deux kinases vont ensuite interagir avec TRAF6 et l'activer, ce qui conduit à son auto-polyubiquitinylation de type K63 (Figure 10). TRAF6 va ensuite activer la voie NF- κ B canonique (cf. § 2.5.2.1.1.).

Concernant les voies dépendantes de TRIF, il a été décrit que TRIF peut soit recruter le complexe TRAF6/RIP pour induire la voie NF- κ B canonique, soit recruter TRAF3 et TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) pour induire la production d'IFN de type I médiée par IRF3 (Interferon Regulatory transcription Factor 3) (Figure 10) (Beutler, 2004).

1.4.5. Le rôle des TRAFs dans la voie de signalisation du TGF- β

Le premier membre de la superfamille du TGF- β (Transforming-Growth Factor- β), TGF- β 1, a été découvert en 1983 par sa capacité à stimuler la croissance de fibroblastes de rat cultivés sur de l'agar (Frolik et al., 1983). Il existe 3 isoformes du TGF- β (1-3) chez les vertébrés qui appartiennent à une large famille de protéines : la superfamille des TGF- β . A ce jour, plus d'une trentaine de ligands TGF- β a été identifié chez les mammifères. Ces petites protéines sécrétées s'associent en homodimères et sont stockées dans la matrice extracellulaire. Il existe plusieurs sous-familles : les TGF- β s, les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les Activines/Inhibitines et le facteur MIF (Müllerian Inhibitory Factor) (Figure 11A). Les membres de la superfamille du TGF- β régulent un large panel de processus biologiques comme la morphogenèse, le développement embryonnaire, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion et la migration (Kubiczkova et al., 2012; Siegel and Massagué, 2003). Les facteurs de la famille TGF- β se dimérisent et s'associent à un complexe tétramérique formé de deux récepteurs TGF β RI et de deux récepteurs TGF β RII. Ces récepteurs à activité sérine/thréonine kinase sont structurellement très proches, un domaine riche en glycines et sérines (GS) distingue le récepteur TGF β RI (Figure 11B). Sept récepteurs TGF β RI, aussi appelés ALK (Activin Receptor-like Kinase) et cinq récepteurs TGF β RII ont été décrits (Figure 11B). Deux récepteurs TGF β RIII ont également été rapportés mais ne sont pas

A Les Activines/Inhibitines



B

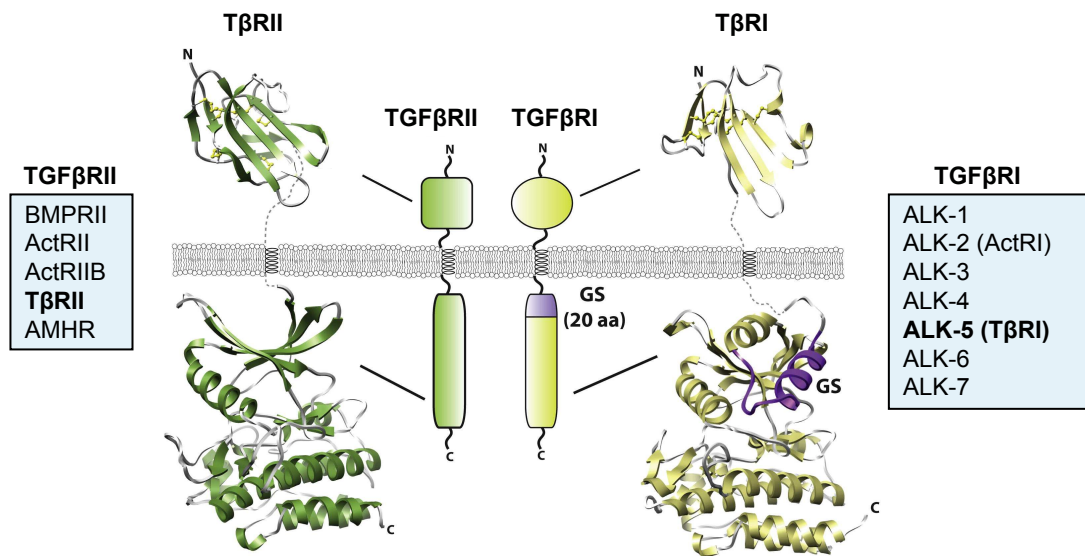


Figure 11 : Les ligands de la superfamille du TGF-β et leurs récepteurs

A. La superfamille du TGF-β est subdivisée en quatre groupes : les Activines/Inhibitines, les TGF-βs, les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) qui incluent les facteurs GDFs (Growth and Differentiation Factors) et le facteur MIF (Müllerian Inhibitory Factor). Une représentation en ruban des structures cristallines du BMP2, BMP14, TGF-β1 et TGF-β2, montre une organisation structurale conservée au sein de cette superfamille (adapté de Hinck, 2012).

B. Représentation en ruban des structures cristallines des récepteurs TβRI et TβRII qui montre une forte conservation structurale. TβRI et TβRII appartiennent respectivement aux groupes des récepteurs TGFβ RI et TGFβRII. La différence majeure entre les récepteurs TGFβRI et TGFβRII consiste en la présence d'un domaine GS (domaine riche en glycines et serines) additionnel dans la région cytoplasmique des récepteurs TGFβRI. Il y a cinq récepteurs TGF-β de type II et sept récepteurs TGF-β de type I. Les récepteurs aux TGF-β1, -β2 et -β3 sont TβRI et TβRII. TBMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor; ActR : Activin Receptor ; TβR : TGF-β Receptor; ALK : Activin Receptor-like Kinase; AMHR : Anti-Müllerian Hormone Receptor (adapté de Hinck, 2012).

impliqués directement dans les voies de signalisation ; ils régulent plutôt l'accessibilité des ligands aux récepteurs de type I et II (Gatza et al., 2010).

Après liaison des ligands TGF- β s sur un dimère de TGF β RII, deux récepteurs TGF β RI sont recrutés puis activés par phosphorylation par le domaine serine/thréonine kinase des récepteurs TGF β RII (Figure 12A). Les récepteurs TGF β RI activés vont ensuite induire les voies canonique et non-canonique du TGF- β .

1.4.5.1. La voie TGF- β canonique

La voie TGF- β canonique dépend des protéines SMADs. En effet, les récepteurs TGF β RI activés vont phosphoryler des protéines R-SMAD (Receptor-regulated SMAD) qui vont se dimériser. Les dimères de R-SMAD vont interagir avec une co-SMAD (common-mediator SMAD) pour ensuite être transloqué dans le noyau où ils réguleront l'expression de gènes cibles (Figure 12A) (Shi and Massagué, 2003). Deux de ces gènes cibles sont des I-SMAD (Inhibitory SMAD) qui servent de rétrocontrôle négatif. Chez l'homme, il existe cinq R-SMAD (SMAD-1, -2, -3, -5 et -8), une co-SMAD (SMAD4) et deux I-SMAD (SMAD-6 et -7). SMAD2 et SMAD3 sont majoritairement impliquées dans les voies de signalisation médiées par les TGF- β s et les Activines tandis que SMAD1, SMAD5 et SMAD8 sont activées par les récepteurs aux BMPs (Horbelt et al., 2012). SMAD6, en inhibant l'interaction entre SMAD1 et SMAD4, est un régulateur négatif des voies de signalisation médiées par les BMPs (Hata et al., 1998). SMAD7, quant à lui, empêche le recrutement des R-SMADs et recrute les protéines SMURFs au niveau des récepteurs TGF β RI. Les protéines SMURFs vont polyubiquitinyler les récepteurs TGF β RI et induire leur dégradation (Itoh and ten Dijke, 2007).

1.4.5.2. La voie TGF- β non-canonique dépendante du complexe TAK1/TRAF6

Dans la voie TGF- β non-canonique médiée par TRAF6, les récepteurs TGF β RI activés recrutent la protéine TRAF6 via le motif consensus : « résidu basique »-P-X-E-X-X-« résidu acide ou aromatique » (Sorrentino et al., 2008). Il s'en suit une auto-ubiquitinylation de TRAF6 ce qui permet le recrutement de la kinase TAK1 (Figure 12B). TRAF6 lie alors des chaînes de polyubiquitines de type K63 sur la lysine 34 de TAK1 ce qui conduit à son activation (Sorrentino et al., 2008). Une fois activée, la kinase TAK1 phosphoryle différents substrats tels que les kinases MKK1 et MKK3/6 qui phosphorylent et activent les kinases

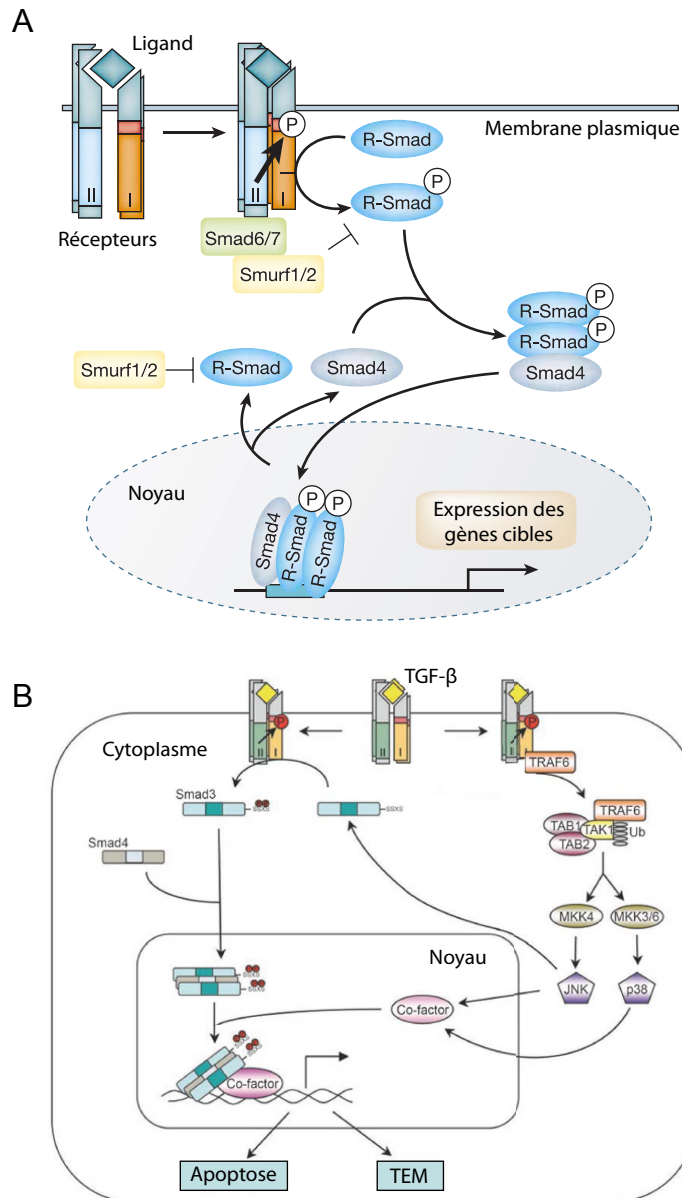


Figure 12 : La voie de signalisation canonique et non-canonique du TGF- β

A. Les TGF- β s lient leurs récepteurs de manière séquentielle afin de former un complexe de signalisation. Les récepteurs de type II de ce complexe vont phosphoryler et activer les récepteurs de type I qui vont, en retour, phosphoryler les protéines R-SMADs. Les R-SMADs phosphorylées forment un dimère qui va recruter une co-SMAD (SMAD4). Le trimère de SMADs est transloqué dans le noyau où il va réguler l'expression de ses gènes cibles. SMAD6 et SMAD7 sont des I-SMAD (Inhibitory SMAD) qui vont inhiber les protéines R-SMAD et permettre le recrutement des protéines SMURFs au niveau des récepteurs au TGF- β . Les protéines SMURFs, en plus d'inhiber la phosphorylation des R-SMADs, vont polyubiquitinyler les récepteurs de type I, une marque conduisant à leur dégradation par le protéasome 26S. SMURF : SMAD Ubiquitin Regulatory Factor (adapté de Derynck et Zhang, 2003).

B. Les récepteurs de type I activés suite à la liaison du TGF- β vont recruter la protéine TRAF6 et induire son auto-polyubiquitinylation. La kinase TAK1 va interagir avec TRAF6 via sa chaîne de polyubiquitine ce qui va conduire à sa polyubiquitinylation de type K63 et à son activation. Une fois activée, la kinase TAK1 phosphoryle les kinases MKK4 et MKK3/6 qui vont respectivement activer les protéines JNK et p38. Ces deux kinases vont activer des facteurs de transcription important pour l'activation de la voie TGF- β (adapté de Zhang, 2009).

JNK et p38-MAPK (Figure 12B) (Atfi et al., 1997; Zhang et al., 2003). Ces deux dernières activent différents facteurs de transcription tel que le facteur AP-1 (Activator Protein-1) (Karin, 1995). Bien que la voie non-canonique médiée par le complexe TAK1/TRAF6 ne dépende pas des protéines SMADs, elle va agir en synergie avec la voie canonique pour induire les différents processus biologiques médiés par le TGF- β (Hocevar et al., 1999; Zhang, 2009).

1.4.5.3. Implication de la voie TGF- β dans les cancers

Chez l'homme, de nombreuses études ont montré l'implication des voies de signalisation TGF- β dans l'initiation, la progression et la dissémination des cellules cancéreuses. Des études cliniques rétrospectives ont montré que le facteur TGF- β 1 est surexprimé dans les cancers du sein, du colon, de l'œsophage, du foie, du poumon et du pancréas. De plus, la surexpression du facteur TGF- β 1 est corrélée avec la progression tumorale et la formation des métastases, ce qui en fait un marqueur de mauvais pronostic (Bierie and Moses, 2006a; Levy and Hill, 2006). A l'inverse, plusieurs mutations inactivatrices des protéines TGF β RI, TGF β RII et SMAD4 ont respectivement été rapportées dans les cancers du pancréas, du poumon et du sein (Bellam and Pasche, 2010; Levy and Hill, 2006). Ces données suggèrent un rôle paradoxal de la voie du TGF- β dans le cancer avec deux versants, l'un anti-tumoral et l'autre pro-tumoral. Des études réalisées chez la souris ont permis d'apporter des éclaircissements quant à l'implication de la voie du TGF- β dans les cancers du sein (Bierie and Moses, 2006b; Imamura et al., 2012). La surexpression du facteur TGF- β 1 spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires (TGF- β 1 sous le contrôle du promoteur MMTV) conduit à une hypoplasie des canaux mammaires. Cela suggère que le facteur TGF- β 1, en inhibant la prolifération des cellules épithéliales mammaires, soit un gène suppresseur de tumeur. Ces données ont été confirmées dans un modèle de tumorigenèse induit par l'agent carcinogène DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracène). En effet, les souris sauvages traitées au DMBA développaient des carcinomes mammaires tandis que les souris MMTV-TGF- β 1 n'en développaient pas (Pierce et al., 1995). De manière intéressante, le croisement des souris MMTV-TGF- β 1 avec des souris MMTV-c-Neu (modèle de tumorigenèse mammaire par surexpression du récepteur ErbB2), a permis de montrer que la surexpression du facteur TGF- β 1 n'affecte pas l'incidence et la taille des tumeurs primaires induites par la surexpression de ErbB2 mais augmente fortement les propriétés invasives des cellules tumorales et la formation des métastases (Muraoka et al., 2003). Des expériences complémentaires consistant à exprimer une forme constitutivement active du récepteur

TGF β RI spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires chez la souris ont montré des résultats équivalents (Oft et al., 1998). Prises dans leur ensemble, ces données montrent que la voie de signalisation TGF- β a effectivement deux effets selon le contexte cellulaire : exprimé par les cellules épithéliales dans la glande mammaire normale ou dans les formes *in situ*, le TGF- β inhibe la prolifération cellulaire et a un effet suppresseur de tumeur ; en revanche exprimé par des cellules épithéliales de cancer invasif, il favorise la progression tumorale et la formation des métastases (Bierie and Moses, 2006b; Kubiczkova et al., 2012).

1.5. TRAF4, UN MEMBRE ATYPIQUE DE LA FAMILLE TRAF

Un criblage différentiel réalisé au laboratoire, a identifié TRAF4 comme étant un gène surexprimé dans les cancers du sein. Depuis, il a été confirmé que la surexpression de TRAF4 est communément retrouvée dans environ 40% des carcinomes tous types confondus. Lors de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de publier une revue synthétique de la littérature portant sur la fonction physiopathologique de TRAF4 (Rousseau et al., 2011 ; § 2.7.1). Cette revue est incluse dans le paragraphe suivant. Des données bibliographiques ultérieures à cette revue sont traitées ensuite (voir § 2.7.2).

1.5.1. TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer

Résumé de l'article:

TRAF4 est un gène dont l'expression est altérée dans les cancers. Il est retrouvé surexprimé dans un large panel de carcinomes différents, en partie due à son amplification génique. TRAF4 code pour un adaptateur cytoplasmique de 53 kDa qui appartient à la famille TRAF. Tandis que la majorité des protéines TRAF, en régulant l'activation des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1, sont impliquées dans l'immunité et l'inflammation ; TRAF4 est principalement impliquée dans la morphogénèse et le développement. De manière intéressante, il a été montré que cette protéine régule différentes fonctions cruciales pour la cellule comme la polarité et la production d'espèces dérivées de l'oxygène.

Review

TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer

Adrien Rousseau, Marie-Christine Rio and Fabien Alpy *

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104 CNRS, U964 INSERM, Université de Strasbourg, BP 10142, 67404 Illkirch, C.U. de Strasbourg, France; E-Mails: Adrien.Rousseau@igbmc.fr (A.R.); rio@igbmc.fr (M.-C.R.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Fabien.Alpy@igbmc.fr; Tel.: +33-388-6534-21; Fax: +33-388-6532-01.

Received: 12 May 2011; in revised form: 16 June 2011 / Accepted: 17 June 2011 /

Published: 21 June 2011

Abstract: *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4)* is a gene whose expression is altered in cancers. It is overexpressed in a variety of carcinomas of different origins, often as a consequence of amplification. TRAF4 encodes an adaptor protein that belongs to the TRAF protein family. While most TRAF proteins influence immune and inflammation processes, TRAF4 is mainly involved in developmental and morphogenic processes. Interestingly, this protein has been shown to be linked to crucial cellular functions such as cell polarity and the regulation of reactive oxygen species production.

Keywords: TRAF; reactive oxygen species; cell polarity; morphogenesis; cancerogenesis; smurf

1. Introduction

The understanding of the molecular alterations involved in cancer development must take into account the heterogeneity of the tumors. This is a prerequisite for precise prognosis assessment and ultimately the development of adapted therapeutic strategies. A high level of expression of a subset of genes is a common alteration found in cancers. Indeed, overexpression is one of the mechanisms that leads to the activation of proto-oncogenes to oncogenes [1]. The *Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Associated Factor 4 (TRAF4)* gene was identified due to its high expression in breast cancers [2,3]. TRAF4 was originally called Metastatic Lymph Node (MLN) 62 and CART1 (C-rich motif associated

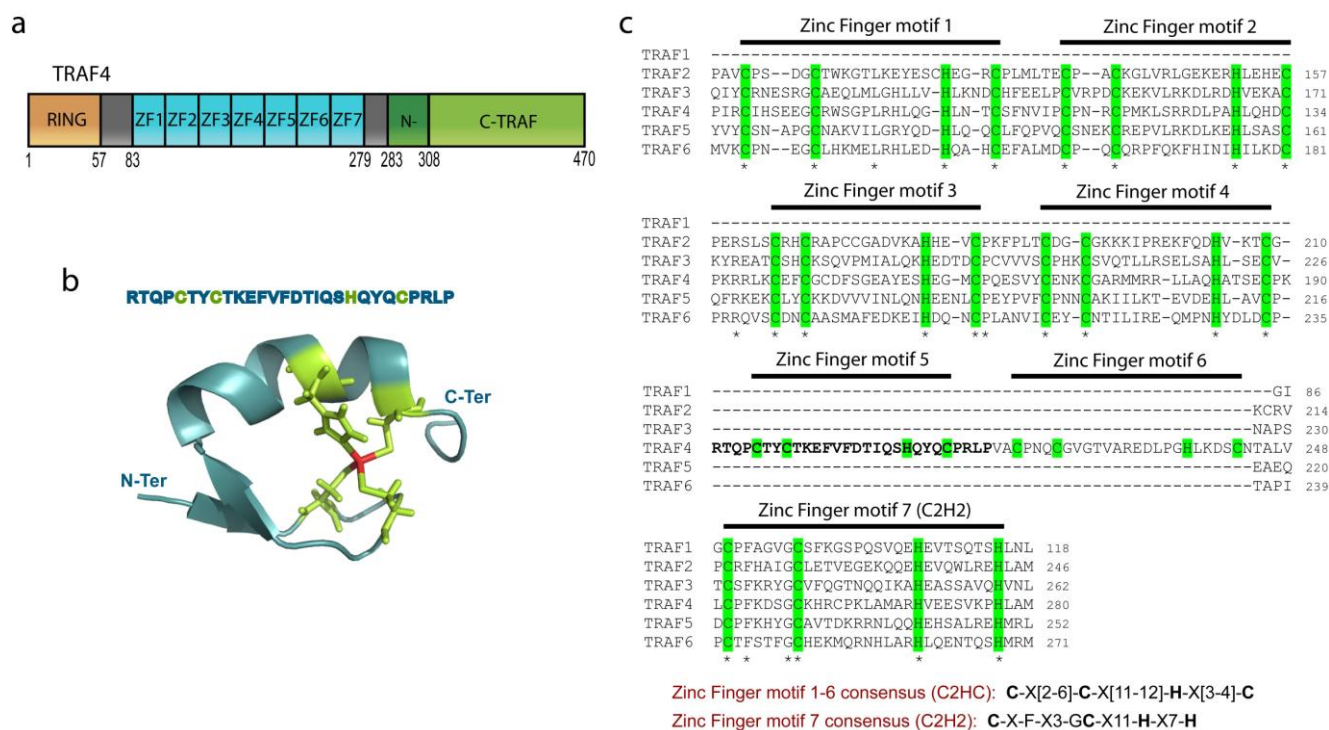
with RING and TRAF containing protein 1) [3,4]. This gene encodes a member of the TRAF family, a group of scaffold proteins that link TNFR and Toll/IL-1 family members to signaling cascades [5-7]. Recently, the function of TRAF4 was shown to be linked with specific cellular processes such as reactive oxygen species production and cell polarity. In this review, we discuss the recently identified roles of TRAF4 and its essential function during embryonic development.

2. TRAF4 belongs to the TRAF Protein Family

The TRAF protein family is composed of seven members that share a common structural organization (Figure 1) [2,6,8-10]. All TRAF proteins contain a C-terminal TRAF domain except TRAF7 where this domain is substituted by seven WD40 repeats [11,12]. The TRAF domain, which is involved in the homo- and heterotrimerization of TRAF proteins is mushroom-like in shape with a stalk-like N-TRAF and a cap-like C-TRAF [11,13-16]. The N-TRAF domain forms a trimeric parallel coiled-coil conformation [11]; in TRAF4, this region is short compared with other TRAF family members as it contains only 3 heptads while other TRAF proteins contain more than 10 heptads [4]. This difference might explain the poor ability of TRAF4 to associate with other TRAF proteins [17]. The C-TRAF domain forms an eight-stranded β -sandwich, a fold that is not restricted to TRAF proteins. Indeed, this domain is also known as the meprin and TRAF-C homology (MATH) domain because of its sequence homology with the meprin extracellular metalloprotease family [18-20]. The C-TRAF domain is involved in the trimerization of TRAF proteins. Moreover, it serves as the docking site of upstream partners during signaling by interacting directly with membrane receptors or indirectly with proteins attached to these receptors. For instance, key surface residues of the TRAF2 C-TRAF domain are involved in its interaction with the TNF receptor superfamily member, TNFR2 [14]. The N-TRAF domain is also involved in protein-protein interactions such as in TRAF2 where it is the binding site for the E3-ligase c-IAP2 [21].

All TRAFs, except TRAF1, contain two additional domains, an N-terminal RING (Really Interesting New Gene) finger motif and several successive zinc fingers. The RING domain is characterized by a C3HC4 motif which forms two zinc fingers [22]. However, TRAF4, 5, 6 and 7 contain a C3HC3D motif [4]. The RING domain mediates a crucial step in the ubiquitination pathway by simultaneously binding ubiquitination enzymes and their substrates, hence functioning as an E3-ligase [23]. However, the function of the TRAF4 RING domain as an E3-ligase has not yet been demonstrated. The central part of TRAF4 is formed by a cysteine-rich region that was previously defined as the association of three CART domains [4]. Each CART domain was proposed to be composed of two HC3HC3 zinc fingers. However, the solution NMR structure of the cysteine-rich central region (PDB ID: 2YUC, 2EOD) suggests that this part of TRAF4 is likely composed of 7 successive zinc fingers as previously proposed by several authors [6,24]. The first six zinc fingers have a C2HC structure while the seventh has a C2H2 structure (Figure 1). These data are consistent with the crystal structure of the zinc-finger region of TRAF2 and 6 [25,26].

Figure 1. Modular organization of the human TRAF4 protein. **(a)** TRAF4 is a 470 amino acid protein, harboring conserved RING, Zinc Finger (ZF1-ZF7) and TRAF domains. **(b)** Cartoon diagram of the nuclear magnetic resonance (NMR) solution structure of TRAF4 zinc finger motif 5 (PDB ID : 2EOD). Residues interacting with the zinc atom (red) are represented by green sticks. **(c)** Alignment of the zinc finger containing region of TRAF proteins performed with the ClustalX software [27]. Identical residues in all sequences are shown by an asterisk. Amino acids interacting with zinc atoms are highlighted in green. Residues corresponding to the sequence shown in panel b are in bold type.



Unlike other members of the TRAF protein family, TRAF4 does not associate with most members of the TNFR family. For instance, while TRAF1, 2, 3, 5, 6 have been reported to be directly or indirectly recruited to the cytoplasmic tail of CD40 (TNFR superfamily member 5), TRAF4 does not interact with this receptor [28-31]. However, weak interactions between TRAF4 and Lymphotoxin β receptor (LT β R) or Nerve Growth Factor Receptor (NGFR alias p75 neurotrophin receptor) have been reported, although the physiological relevance of these interactions remains poorly understood [32,33]. In agreement with these data, overexpression of TRAF4, unlike other members of the TRAF family, fails to activate NF- κ B [34].

The primary structure of TRAF4 suggests that this protein, despite some differences, must share similar functional characteristics with other TRAF proteins. TRAF4 is likely to be involved in signal transduction as its TRAF domain mediates the direct or indirect interaction with a transmembrane receptor. Moreover, TRAF4 may possess E3-ligase activity through its RING domain which could mediate the poly-ubiquitination of target proteins and lead to their activation or degradation. However, the identity of the signaling pathway and the potential molecular targets of its putative E3-ligase activity remain unknown.

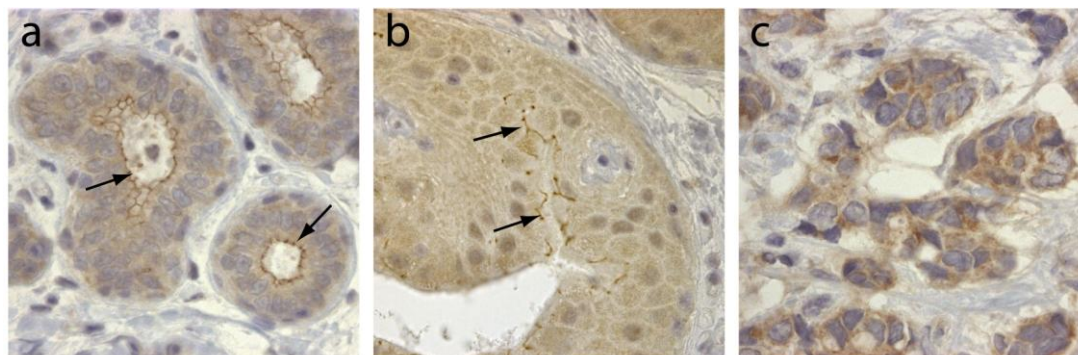
3. TRAF4 has a Special Place during Evolution

TRAF genes arose early during evolution. This protein family is represented by one member DG17 (alias zfaA) in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* where it is expressed during the aggregation step of the life cycle of these unicellular organisms, when individual cells aggregate to form a multicellular colony [4,35]. TRAF family members are also present in Metazoans. One TRAF protein HyTRAF1 has been identified in the hydroid *Hydractinia echinata* [36]. HyTRAF1 is proposed to be involved in the regulation of apoptosis owing to its high expression during larval stages [36]. In *Caenorhabditis elegans*, this family is still represented by a single member named ceTRAF [37]. In *Drosophila*, the TRAF protein family is more diversified with three members, DTRAF1 to DTRAF3. Finally, in mammals 7 members are present and among them TRAF7 has a peculiar place as it is devoid of a TRAF domain. Sequence analysis of the TRAF family members in these different species suggests that human TRAF4 and TRAF6 are the oldest members, while TRAF1, 2, 3 and 5 arose later during vertebrate evolution [18,38]. Interestingly, the emergence of the TNFR family also occurred during this later period, suggesting that the last four TRAF proteins have a dedicated function that is directly linked to TNFR proteins. Given the observed major role of TRAF proteins during embryonic development of invertebrates and the major roles of TRAF4 orthologs in similar processes in vertebrates, TRAF4 may well be the TRAF family member with an ancestral morphogenetic function independent of TNFR [39].

4. TRAF4 Is Overexpressed in Cancers

TRAF4 was initially identified in breast cancer from a differential screen between metastatic lymph nodes and benign fibroadenomas biopsies [3]. TRAF4 is located in the q11.2 region of the long arm of chromosome 17, close to the ErbB2 oncogene [3,4]. TRAF4 mRNA was shown to be overexpressed in approximately one-quarter of breast cancers as a consequence of gene amplification [40]. This was subsequently confirmed by comparative genomic hybridization (CGH) and cDNA microarrays [41-43]. Interestingly TRAF4 overexpression is not limited to breast cancers. Indeed, it has been found in 43% of 623 human tumor samples from lung, ovary, prostate and colon among others [44]. In this latter study, TRAF4 overexpression is caused by gene amplification in about one-third of the tumors. TRAF4 protein overexpression is therefore a common feature of human cancers. Accordingly, TRAF4 was identified in a meta-analysis of 40 independent microarray studies as one of the 67 genes whose overexpression is characteristic of carcinomas [45]. TRAF4 overexpression is always observed in cancer cells and never in stromal cells. Its subcellular localization is variable and is cytoplasmic and/or membrane-associated (Figure 2), but nuclear localization is also observed in about 20% of TRAF4-positive tumors [4,44]. Interestingly, the membrane-association of TRAF4 seems to be correlated with tumor cell polarity and differentiation (Figure 2). These studies strongly suggest that TRAF4 plays an important role in carcinogenesis. Interestingly, in breast cancers, TRAF4 amplification can occur independently of ErbB2 amplification suggesting that TRAF4 may be the target of a more centromeric amplicon than the one involving ErbB2 [40,44]. Collectively, these data suggest that TRAF4 is not only a marker of human carcinomas, but also a candidate oncogene.

Figure 2. TRAF4 expression in normal breast and cancerous tissues. Immunohistochemistry of TRAF4 expression (brown) in normal breast (a), *in situ* carcinoma (b) and invasive carcinoma (c). Note that TRAF4 localization is modified from a predominantly membrane-associated presence in normal breast (a, arrows) to a mainly cytoplasmic presence in invasive tumor cells (c); *in situ* carcinomas represent an intermediate state in which TRAF4 remains associated focally with the membrane (b, arrows).



In line with its elevated expression in tumors and its inclusion in the TRAF protein family, TRAF4 has been hypothesized to be involved in apoptosis. For instance, TRAF4 provides resistance to an apoptotic stimulus in HEK293 cells [46]. When treated with an agonistic anti-Fas antibody, HEK293 cells normally undergo apoptosis; however, TRAF4 overexpression in these cells strongly decreases induced-cell death, arguing for an anti-apoptotic function for TRAF4 [46]. Paradoxically, other studies have shown that TRAF4 might also exert pro-apoptotic functions. Indeed, TRAF4 is regulated by members of the p53 protein family, namely p53 and p63 [47,48]. Hence, TRAF4 can be up-regulated by a temperature sensitive p53 or by its overexpression, as well as by the stabilization of p53 in response to DNA damage. Moreover, induction of apoptosis by irradiation in human lymphocytes or in noise-exposed cochlea cells increases their expression of TRAF4 [49,50]. Interestingly, TRAF4 overexpression induces apoptosis and suppresses colony formation in cell lines of different origins, regardless of their p53 status. The apparent discrepancy among these results may reveal a cell-type specific role for TRAF4 in life and death decisions.

The elevated expression of TRAF4 in many carcinomas suggests that this protein might have an important role in cancer which could be linked to cell polarity or apoptosis regulation.

5. TRAF4 has Restricted Functions in Immunity

TRAF proteins interact with Toll/IL1R and TNFR receptor family members to induce immune and inflammatory responses through NF- κ B and MAPK activation [6]. However, TRAF4 involvement in these mechanisms remains poorly understood. Indeed, TRAF4 activates or inhibits NF- κ B pathway depending on the ligand/receptor pair; for instance, TRAF4 potentiates NF- κ B activation triggered by glucocorticoid-induced TNFR (GITR) but inhibits LPS-induced NF- κ B activation [51,52].

The role of TRAF4 in immunity was studied in TRAF4-deficient mice. TRAF4-deficient mice do not show defects in T and B lymphocytes, granulocytes, macrophages and dendritic cell differentiation [53]. Moreover, the function of neutrophils and T cells is unaffected. The only observed phenotype is

reduced dendritic cell migration [53]. However, TRAF4-deficient mice have not been challenged for bacterial resistance or autoimmune diseases and a role for TRAF4 in these processes cannot be ruled out.

Recently, TRAF4 has been proposed as a key negative regulator of NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) signaling [54]. NOD2 is an intracellular pattern recognition receptor which plays an important role in immunologic homeostasis [55]. The NOD2 gene is linked to inflammatory diseases such as Crohn's Disease and Blau syndrome. TRAF4 inhibits NOD2-induced NF- κ B activation through direct binding to NOD2 and NOD2-induced bacterial killing [54].

Thus, TRAFs are key proteins in innate and adaptive immune signaling with positive and negative regulatory functions. TRAF4 seems to be a negative regulator of immunity in specific processes of innate immunity.

6. TRAF4 Regulates Reactive Oxygen Species (ROS) Production

ROS act as signaling molecules that mediate growth-related responses such as angiogenesis. As a result, abnormal ROS production is implicated in various diseases including atherosclerosis, cardiovascular problems and cancers [56,57]. The NADPH oxidase Nox2 is a multi-subunit complex comprising two membrane-bound subunits, gp91phox (Nox2) and p22phox, three cytoplasmic subunits, p47phox, p40phox and p67phox, and the small GTP-binding protein, Rac1/2 [58]. This complex generates superoxide by transferring electrons to molecular oxygen [57]. Superoxide is involved in bacterial killing, inflammation and endothelial activation. To better understand the molecular mechanisms of superoxide synthesis regulation, a two-hybrid screen using p47phox as a bait allowed the recovery of TRAF4 [59]. The C-terminal part of p47phox interacts with the TRAF domain of TRAF4. Coexpression of p47phox and TRAF4 induces JNK activation and ROS production whereas each alone does not appreciably affect these functions [59]. Acute response to TNF- α induces a rapid PKC-dependent p47phox phosphorylation [60]. This post-translational modification enhances p47phox-TRAF4 association and translocation to the cell membrane leading to NADPH oxidase activation and ROS generation. Moreover, ROS-induced ERK1/2 and p38MAPK activation requires both p47phox and TRAF4 [60]. In addition, TRAF4 and p47phox target nascent lamellar focal complexes of motile endothelial cells in association with the paxillin paralogue Hic-5 to initiate Rho GTPase signaling [61]. Downregulation of one of these proteins is sufficient to inhibit endothelial cell migration.

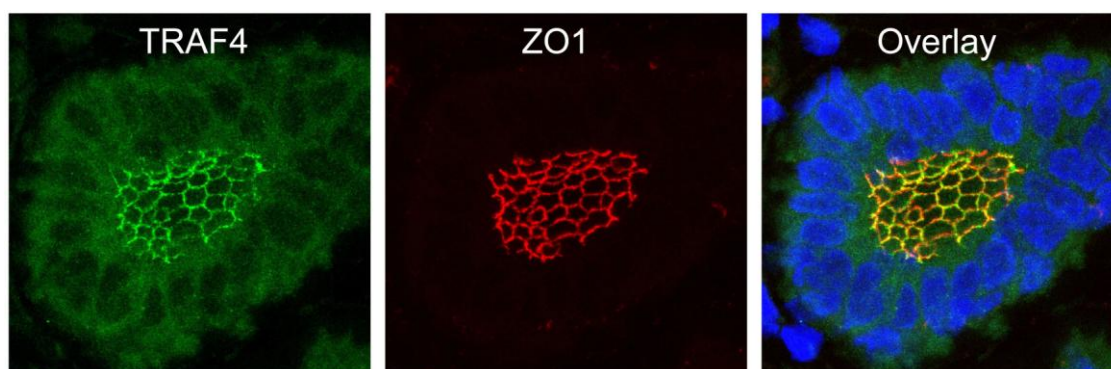
In a recent report, TRAF4 and p47phox were identified as binding partners for GPIb-IX-V and GPVI, two platelet glycoprotein receptors that respectively bind to Von Willebrand Factor (VWF) and collagen and initiate thrombosis [62]. These two receptors initiate signaling events leading to the activation of platelet integrin which mediates platelet aggregation. The cytoplasmic regions of GPIb-IX-V and GPVI interact with the TRAF domain of TRAF4 and with the SH3 domain of p47phox in a complex with Hic-5 [62]. Since the regulation of platelet adhesion receptors by redox changes remains poorly understood, this novel interaction could link these receptors to redox signaling pathways.

Together these studies indicate that TRAF4 forms part of a complex that regulates ROS production by the NADPH oxidase Nox2 and couples this regulation to cell migration.

7. TRAF4 and Cell Polarity

TRAF4 has been detected in several cellular compartments: the plasma membrane, the cytoplasm and the nucleus [2,4,44]. When expressed in cells, TRAF4 is mainly found in the insoluble fractions of cell extracts [63]. Moreover, TRAF4 was shown to be associated with cytoskeleton- and membrane-containing fractions [59]. This membrane association is also observed in cells overexpressing TRAF4 where it accumulates at cell-cell contacts [64,65]. In *in vitro* polarized epithelial cells, TRAF4 localizes apically in cell-cell junctions, where it co-localizes with markers of tight junctions (TJ) such as occludin or Zonula Occludens-1 (ZO1) [65]. In normal human mammary samples, TRAF4 is found in TJ typical honeycomb patterns in epithelial cells (Figure 3). The association with TJ is highly dynamic as demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments, which show that TRAF4 shuttles between TJs and the cytoplasm. These data suggest that TRAF4 might be a signal transducer of intercellular junctions in normal epithelial cells. In contrast, in poorly differentiated epithelial cancer cells, the protein is either diffuse in the cytoplasm, or in cytoplasmic or nuclear foci, suggesting that this function is impaired (Figure 2) [65].

Figure 3. TRAF4 is localized at tight junctions (TJs) of normal human mammary epithelial cells. TRAF4 (green) and ZO1 (red) were co-labeled on paraffin embedded sections of a normal human breast duct. Images are confocal section projections showing the typical honeycomb-like shape of tight junctions. Nuclei were stained using Hoechst-33258 (blue).



TJs are major cell-cell contact structures essential for the establishment and the maintenance of apico-basal polarity. A key regulator of cell polarity is TGF- β which is involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process that allows cells to lose their polarity and cell-cell contact and acquire a mesenchymal phenotype. An intriguing link between the TRAF4 and TGF- β pathways came from the identification of TRAF4 as a potential interacting partner of Smurf1 and Smurf2 in two-hybrid screens [66-68]. Smurf (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase) proteins (Smurf1 and Smurf2) are related E3 ubiquitin ligases of the C2-WW-HECT class that regulate the TGF β signaling pathway, motility, epithelial polarity and planar cell polarity [69,70]. *In vitro* assays confirmed that Smurf1 interacts with TRAF4 through 3 PXXY motifs located in the RING, zinc fingers and TRAF domains [67]. When ectopically expressed in cells, TRAF4 and Smurf1 co-localize in structures associated with the cell membrane [68]. Smurf1 was further shown to induce TRAF4 ubiquitination which in turn promoted TRAF4 26S proteasome-dependent degradation [67,68]. Thus Smurf1 can regulate TRAF4 protein levels through its E3-ligase activity.

Interesting data have come from the study of asymmetric cell division in *Drosophila*. In this organism, neuroblasts divide perpendicularly to the surface in the procephalic neurogenic region, and segregate the cell fate determinants Prospero (Pros) and Numb and their adaptor protein Miranda (Mira) into the future ganglion mother cells (GMCs) [71,72]. Interestingly DTRAF1, the ortholog of TRAF4, is asymmetrically localized to the apical cortex in mitotic neuroblasts [72]. This localization relies on Bazooka, the *Drosophila* ortholog of the polarity protein Par3 (Partitioning defective 3 homolog) with which DTRAF1 interacts, and depends on Eiger, the ortholog of TNF [72]. Thus DTRAF1 binds to Bazooka and acts downstream of Eiger in the Mira/Pros pathway during asymmetric division [73].

These studies suggest that mammalian TRAF4, located in the TJ of polarized epithelial cells and whose function in these structures might be linked to the TGF- β pathway, may be important in asymmetric division in specific cell types.

8. TRAF4 is Essential in Developmental Processes

TRAF4 function has been studied in different animal models. We summarize below the different findings obtained in each organism.

Mouse: TRAF4 has been demonstrated to be essential in mice. TRAF4-deficient mice on a mixed 129/SvJ X C57BL/6 genetic background showed important defects of the upper respiratory tract [74]. On a pure 129/SvJ background this phenotype is more drastic and leads to 30% embryonic lethality [75]. Moreover, TRAF4-deficient survivors exhibit numerous less penetrant alterations, including dramatic malformations of the trachea and axial skeleton (ribs, sternum, tail), and defects in neural tube closure giving rise to mild spina bifida phenotypes [75]. Interestingly, these neural tube and skeletal defects are similar to those found in MEKK4-deficient mice, a MAP3K protein kinase of the STE11 family involved in the JNK/p38 pathway [76,77]. Some of these phenotypes might be linked to neural crest defects. Indeed, a TRAF4 mutant allele called msp2 (modifier of Sox10 expression pattern 2) alters neural crest patterning [78]. As discussed, defects in dendritic cells migration has also been reported in TRAF4-deficient mice which otherwise exhibit normal immune responses [53]. These null-phenotypes coincide with the embryonic expression pattern of murine TRAF4 [79]. Indeed, TRAF4 expression is highly regulated during development. It is widely expressed in various developing organs, with the highest levels observed during ontogenesis of the central (CNS) and peripheral (PNS) nervous systems, and in the nervous tissues of sensory organs. Thus, TRAF4 is a key molecule in diverse ontogenic processes, particularly in the nervous system [79]. In line with its potential role in the nervous system, TRAF4 expression was reported to be reduced in the temporal cortex of schizophrenic patients [80]. In adult mice, constitutive basal expression of TRAF4 is observed in most tissues, suggesting a general biological function for this protein [79]. A similar broad expression pattern is observed in human adult tissues [32,81]. Indeed, the promoter region of the TRAF4 gene does not have a consensus TATA box and contains a relatively weak Kozak sequence, two characteristics of ubiquitously expressed genes. Nonetheless, in mice, the hippocampus, the olfactory bulb, and the Purkinje cells of the cerebellum show strong TRAF4 expression, indicating that TRAF4 might also exert additional tissue-specific function(s) [79,82].

Zebrafish: In zebrafish, two TRAF4 orthologs have been found, TRAF4a and TRAF4b [82]. Many mammalian genes have two zebrafish orthologs due to genome duplication during the evolution of these ray-finned fish [83]. Both TRAF4a and TRAF4b start to be expressed very early during embryogenesis. However, TRAF4b is ubiquitously and weakly expressed at all stages, while TRAF4a shows a highly restricted expression pattern mainly in sensorial and neural cells, and in the somites of embryos. Together, TRAF4a and TRAF4b have similar expression pattern as their mammalian counterpart [82].

Xenopus: The TGF- β pathway is a major signaling pathway during early developmental events in the *Xenopus* embryo. The E3 ubiquitin ligase Smurf1 negatively regulates TGF- β signaling, therefore, targets or partners of Smurf1 were proposed to participate in TGF- β signaling during embryonic processes [68]. TRAF4 was found in a yeast two-hybrid screen for Smurf1-interacting proteins. In the *Xenopus* embryo, two TRAF4 paralogs have been cloned, TRAF4a and TRAF4b, both of which are expressed within the neural plate and neural crest and are essential for neural crest development and normal neural plate folding [68]. TRAF4 is a positive effector of BMP (Bone morphogenetic protein) and Nodal, two TGF- β superfamily ligands. Indeed, endogenous TRAF4 is needed for the response of animal caps to these pathways. In contrast, TRAF4 has negligible effects on the Wnt (Wingless) and FGF (fibroblast growth factor) signaling, two other crucial pathways for neural crest specification.

Drosophila: The TRAF4 ortholog in *Drosophila* is DTRAF1 [84,85]. Homozygous flies carrying a null allele of DTRAF1 fail to develop to the pupal stage [86,87]. DTRAF1 seems to be necessary as early as the gastrulation stage as DTRAF1-deficient embryos show delays in ventral furrow formation [86]. Mutant larvae contain smaller imaginal discs, especially eye discs, form few axonal bundles and fail to defasciculate in the brain hemisphere. Heterozygous embryos show a dramatically enhanced thorax closure defect due to dominant negative expression of JNK (c-Jun N-terminal kinase) showing the importance of gene dosage [87]. Flies with a hypomorphic DTRAF1 mutation due to homozygous P-element insertion show supernumerary dorsal bristles, normally a typical structure of the fly peripheral nervous system [88]. Altogether, these results indicate that DTRAF1 is essential for thorax closure, development of imaginal eye discs and the formation of photosensory neuronal array in the brain hemisphere.

The reaper (*rpr*) gene is a key regulator of apoptosis during *Drosophila* embryogenesis [89]. DTRAF1 induces cell death through apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) and JNK activation [88]. *Drosophila* inhibitor-of-apoptosis protein 1 (DIAP1) appears to negatively regulate apoptosis by triggering DTRAF1 proteasome-mediated degradation. Reaper, through DIAP1 inhibition, induces the stabilization of DTRAF1 and consequently JNK-mediated apoptosis. Misshapen (*msn*), an SPS1 (sporulation-specific 1) subfamily Ste20-related kinase, was shown to be an upstream activator of the JNK pathway required for dorsal closure. *Msn* directly binds to the TRAF domain of DTRAF1 and thereby potentiates DTRAF1-induced JNK activation [85].

Eiger, the *Drosophila* ortholog of TNF, is known to activate JNK and trigger apoptosis. An essential component of the Eiger-JNK pathway is dTAB2, the *Drosophila* ortholog of TAB2/3 (TGF-beta activated kinase 1(TAK1) binding protein 2/3). dTAB2 links DTRAF1 to the JNK kinase kinase, dTAK1, to form a triple complex [90]. This complex is recruited to the membrane through the interaction with DTRAF1 and the Eiger receptor, Wengen. This complex has an adaptor function

which enables the presumptive JNKKKK Misshapen to activate dTAK1, which in turn advances the Eiger signal to the JNKK hemipterous and its substrate JNK. These data show that Eiger uses the dTAB2-DTRAF1-dTAK1 module to induce the JNK signaling pathway in *Drosophila* [90].

In *Drosophila*, the Toll signaling pathway regulates biological mechanisms such as dorso-ventral polarity, larval hematopoiesis and innate/adaptive immunity. Upon ligand binding to the Toll receptor, Pelle, a serine/threonine protein kinase homologous to the mammalian kinase IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase), becomes activated and phosphorylates itself and several other substrates. This leads to the activation and nuclear translocation of the *Drosophila* counterpart of mammalian NF- κ B, Dorsal. DTRAF1 interacts with the regulatory N-terminal domain of Pelle [91]. Interestingly, coexpression of DTRAF1 and Pelle induces significant NF- κ B activation whereas each alone does not. These data suggest that DTRAF1 is a component of the Toll pathway in *Drosophila*.

Altogether, these results show that the *Drosophila* ortholog of TRAF4, DTRAF1, is a key element of the JNK signaling pathway downstream of the *Drosophila* TNF pathway which is involved in several developmental processes. Interestingly, TRAF4 interacts with MEKK4 in human cells to activate JNK [92]. This suggests that TRAF4 may be involved in the JNK pathway together with MEKK4 in humans.

The study of TRAF4 in different model organisms has shed light on the crucial role of this protein in several physiological processes, in particular during embryonic development [39].

9. Conclusions

TRAF4 is overexpressed in many different types of carcinomas. However, the precise implication of this protein in cancer remains poorly understood. A clearer picture of its physiological function has, however, appeared. The study of TRAF4 in different organisms has revealed that it is involved in different morphogenic processes. Its function seems to be primordial with links to cell polarity and different pathways such as ROS production and TGF- β signaling.

Acknowledgements

We thank Susan Chan, Valérie Kedinger and Catherine Tomasetto for critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Hôpital Universitaire de Strasbourg, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisé LIGUE 2010) and the Comité du Haut-Rhin et du Bas-Rhin and the Institut National du Cancer. A.R. is a recipient of an allocation de recherche from the French Ministry of Research.

References

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
2. Kedinger, V.; Rio, M.C. TRAF4, the unique family member. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *597*, 60-71.
3. Tomasetto, C.; Regnier, C.; Moog-Lutz, C.; Mattei, M.G.; Chenard, M.P.; Lidereau, R.; Basset, P.; Rio, M.C. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* **1995**, *28*, 367-376.

4. Regnier, C.H.; Tomasetto, C.; Moog-Lutz, C.; Chenard, M.P.; Wendling, C.; Basset, P.; Rio, M.C. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25715-25721.
5. Lee, N.K.; Lee, S.Y. Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 61-66.
6. Chung, J.Y.; Park, Y.C.; Ye, H.; Wu, H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 679-688.
7. Wajant, H.; Grell, M.; Scheurich, P. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **1999**, *10*, 15-26.
8. Dempsey, P.W.; Doyle, S.E.; He, J.Q.; Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 193-209.
9. Bradley, J.R.; Pober, J.S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **2001**, *20*, 6482-6491.
10. Inoue, J.; Ishida, T.; Tsukamoto, N.; Kobayashi, N.; Naito, A.; Azuma, S.; Yamamoto, T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.* **2000**, *254*, 14-24.
11. Rothe, M.; Wong, S.C.; Henzel, W.J.; Goeddel, D.V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **1994**, *78*, 681-692.
12. Xu, L.G.; Li, L.Y.; Shu, H.B. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17278-17282.
13. McWhirter, S.M.; Pullen, S.S.; Holton, J.M.; Crute, J.J.; Kehry, M.R.; Alber, T. Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8408-8413.
14. Park, Y.C.; Burkitt, V.; Villa, A.R.; Tong, L.; Wu, H. Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **1999**, *398*, 533-538.
15. Li, C.; Norris, P.S.; Ni, C.Z.; Havert, M.L.; Chiong, E.M.; Tran, B.R.; Cabezas, E.; Reed, J.C.; Satterthwait, A.C.; Ware, C.F.; Ely, K.R. Structurally distinct recognition motifs in lymphotoxin-beta receptor and CD40 for tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50523-50529.
16. Ye, H.; Park, Y.C.; Kreishman, M.; Kieff, E.; Wu, H. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 321-330.
17. McWhirter, S.M.; Pullen, S.S.; Werneburg, B.G.; Labadia, M.E.; Ingraham, R.H.; Crute, J.J.; Kehry, M.R.; Alber, T. Structural and biochemical analysis of signal transduction by the TRAF family of adapter proteins. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* **1999**, *64*, 551-562.
18. Zapata, J.M.; Martinez-Garcia, V.; Lefebvre, S. Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *597*, 1-24.
19. Uren, A.G.; Vaux, D.L. TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 244-245.

20. Zapata, J.M.; Pawlowski, K.; Haas, E.; Ware, C.F.; Godzik, A.; Reed, J.C. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24242-24252.
21. Mace, P.D.; Smits, C.; Vaux, D.L.; Silke, J.; Day, C.L. Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 8-15.
22. Freemont, P.S.; Hanson, I.M.; Trowsdale, J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **1991**, *64*, 483-484.
23. Deshaies, R.J.; Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 399-434.
24. Cheng, G.; Cleary, A.M.; Ye, Z.S.; Hong, D.I.; Lederman, S.; Baltimore, D. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* **1995**, *267*, 1494-1498.
25. Yin, Q.; Lamothe, B.; Darnay, B.G.; Wu, H. Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. *Biochemistry* **2009**, *48*, 10558-10567.
26. Yin, Q.; Lin, S.C.; Lamothe, B.; Lu, M.; Lo, Y.C.; Hura, G.; Zheng, L.; Rich, R.L.; Campos, A.D.; Myszka, D.G.; Lenardo, M.J.; Darnay, B.G.; Wu, H. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 658-666.
27. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673-4680.
28. Bishop, G.A.; Moore, C.R.; Xie, P.; Stunz, L.L.; Kraus, Z.J. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *597*, 131-151.
29. Leo, E.; Welsh, K.; Matsuzawa, S.; Zapata, J.M.; Kitada, S.; Mitchell, R.S.; Ely, K.R.; Reed, J.C. Differential requirements for tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins in CD40-mediated induction of NF-kappaB and Jun N-terminal kinase activation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22414-22422.
30. Basaki, Y.; Ikizawa, K.; Kajiwara, K.; Yanagihara, Y. CD40-mediated tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 signaling upregulates IL-4-induced germline Cepsilon transcription in a human B cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *405*, 199-204.
31. Pullen, S.S.; Miller, H.G.; Everdeen, D.S.; Dang, T.T.; Crute, J.J.; Kehry, M.R. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11836-11845.
32. Krajewska, M.; Krajewski, S.; Zapata, J.M.; Van Arsdale, T.; Gascoyne, R.D.; Berern, K.; McFadden, D.; Shabaik, A.; Hugh, J.; Reynolds, A.; Clevenger, C.V.; Reed, J.C. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 1549-1561.
33. Ye, X.; Mehlen, P.; Rabizadeh, S.; VanArsdale, T.; Zhang, H.; Shin, H.; Wang, J.J.; Leo, E.; Zapata, J.; Hauser, C.A.; Reed, J.C.; Bredesen, D.E. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30202-30208.

34. Kawamata, S.; Hori, T.; Imura, A.; Takaori-Kondo, A.; Uchiyama, T. Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5808-5814.
35. Driscoll, D.M.; Williams, J.G. Two divergently transcribed genes of *Dictyostelium discoideum* are cyclic AMP-inducible and coregulated during development. *Mol. Cell Biol.* **1987**, *7*, 4482-4489.
36. Mali, B.; Frank, U. Hydroid TNF-receptor-associated factor (TRAF) and its splice variant: a role in development. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 377-384.
37. Wajant, H.; Muhlenbeck, F.; Scheurich, P. Identification of a TRAF (TNF receptor-associated factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Evol.* **1998**, *47*, 656-662.
38. Grech, A.; Quinn, R.; Srinivasan, D.; Badoux, X.; Brink, R. Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 721-734.
39. Mathew, S.J.; Haubert, D.; Kronke, M.; Leptin, M. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1939-1946.
40. Bieche, I.; Tomasetto, C.; Regnier, C.H.; Moog-Lutz, C.; Rio, M.C.; Lidereau, R. Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3886-3890.
41. Kauraniemi, P.; Barlund, M.; Monni, O.; Kallioniemi, A. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8235-8240.
42. Pollack, J.R.; Sorlie, T.; Perou, C.M.; Rees, C.A.; Jeffrey, S.S.; Lonning, P.E.; Tibshirani, R.; Botstein, D.; Borresen-Dale, A.L.; Brown, P.O. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12963-12968.
43. Moelans, C.B.; de Wegers, R.A.; Monsuurs, H.N.; Maess, A.H.; van Diest, P.J. Molecular differences between ductal carcinoma in situ and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study. *Cell Oncol. (Dordr)* **2011**.
44. Camilleri-Broet, S.; Cremer, I.; Marmey, B.; Comperat, E.; Viguie, F.; Audouin, J.; Rio, M.C.; Fridman, W.H.; Sautes-Fridman, C.; Regnier, C.H. TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* **2007**, *26*, 142-147.
45. Rhodes, D.R.; Yu, J.; Shanker, K.; Deshpande, N.; Varambally, R.; Ghosh, D.; Barrette, T.; Pandey, A.; Chinnaiyan, A.M. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9309-9314.
46. Fleckenstein, D.S.; Dirks, W.G.; Drexler, H.G.; Quentmeier, H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk. Res.* **2003**, *27*, 687-694.
47. Gu, X.; Coates, P.J.; MacCallum, S.F.; Boldrup, L.; Sjostrom, B.; Nylander, K. TRAF4 is potently induced by TAp63 isoforms and localised according to differentiation in SCCHN. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1986-1990.

48. Sax, J.K.; El-Deiry, W.S. Identification and characterization of the cytoplasmic protein TRAF4 as a p53-regulated proapoptotic gene. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36435-36444.
49. Turtoi, A.; Schneeweiss, F.H. Effect of (211)At alpha-particle irradiation on expression of selected radiation responsive genes in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *85*, 403-412.
50. Hu, B.H.; Cai, Q.; Manohar, S.; Jiang, H.; Ding, D.; Coling, D.E.; Zheng, G.; Salvi, R. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. *Neuroscience* **2009**, *161*, 915-925.
51. Esparza, E.M.; Arch, R.H. TRAF4 functions as an intermediate of GITR-induced NF-kappaB activation. *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 3087-3092.
52. Takeshita, F.; Ishii, K.J.; Kobiyama, K.; Kojima, Y.; Coban, C.; Sasaki, S.; Ishii, N.; Klinman, D.M.; Okuda, K.; Akira, S.; Suzuki, K. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 2477-2485.
53. Cherfils-Vicini, J.; Vingert, B.; Varin, A.; Tartour, E.; Fridman, W.H.; Sautes-Fridman, C.; Regnier, C.H.; Cremer, I. Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice. *Immunology* **2008**, *124*, 562-574.
54. Marinis, J.M.; Homer, C.R.; McDonald, C.; Abbott, D.W. A novel motif in the Crohn's disease susceptibility protein, NOD2, allows TRAF4 to down-regulate innate immune responses. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1938-1950.
55. Magalhaes, J.G.; Sorbara, M.T.; Girardin, S.E.; Philpott, D.J. What is new with Nods? *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 29-34.
56. Ushio-Fukai, M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE* **2006**, *2006*, re8.
57. Briones, A.M.; Touyz, R.M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**, *12*, 135-142.
58. Bedard, K.; Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 245-313.
59. Xu, Y.C.; Wu, R.F.; Gu, Y.; Yang, Y.S.; Yang, M.C.; Nwariaku, F.E.; Terada, L.S. Involvement of TRAF4 in oxidative activation of c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28051-28057.
60. Li, J.M.; Fan, L.M.; Christie, M.R.; Shah, A.M. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: Role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 2320-2330.
61. Wu, R.F.; Xu, Y.C.; Ma, Z.; Nwariaku, F.E.; Sarosi, G.A., Jr.; Terada, L.S. Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 893-904.
62. Arthur, J.F.; Shen, Y.; Gardiner, E.E.; Coleman, L.; Kenny, D.; Andrews, R.K.; Berndt, M.C. TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4) is a novel binding partner of glycoprotein Ib and glycoprotein VI in human platelets. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 163-172.
63. Dadgostar, H.; Cheng, G. Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2539-2544.
64. Glauner, H.; Siegmund, D.; Motejadded, H.; Scheurich, P.; Henkler, F.; Janssen, O.; Wajant, H. Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4). *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4819-4829.

65. Kedinger, V.; Alpy, F.; Baguet, A.; Polette, M.; Stoll, I.; Chenard, M.P.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3518.
66. Colland, F.; Jacq, X.; Trouplin, V.; Mougin, C.; Groizeleau, C.; Hamburger, A.; Meil, A.; Wojcik, J.; Legrain, P.; Gauthier, J.M. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1324-1332.
67. Li, S.; Lu, K.; Wang, J.; An, L.; Yang, G.; Chen, H.; Cui, Y.; Yin, X.; Xie, P.; Xing, G.; He, F.; Zhang, L. Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biochem.* **2010**, *338*, 11-17.
68. Kalkan, T.; Iwasaki, Y.; Park, C.Y.; Thomsen, G.H. Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor-beta signaling that affects neural crest formation. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3436-3450.
69. Narimatsu, M.; Bose, R.; Pye, M.; Zhang, L.; Miller, B.; Ching, P.; Sakuma, R.; Luga, V.; Roncari, L.; Attisano, L.; Wrana, J.L. Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell* **2009**, *137*, 295-307.
70. Inoue, Y.; Imamura, T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2107-2112.
71. Kraut, R.; Chia, W.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N.; Knoblich, J.A. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **1996**, *383*, 50-55.
72. Wang, H.; Cai, Y.; Chia, W.; Yang, X. *Drosophila* homologs of mammalian TNF/TNFR-related molecules regulate segregation of Miranda/Prospero in neuroblasts. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5783-5793.
73. Peng, C.Y.; Manning, L.; Albertson, R.; Doe, C.Q. The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **2000**, *408*, 596-600.
74. Shiels, H.; Li, X.; Schumacker, P.T.; Maltepe, E.; Padrid, P.A.; Sperling, A.; Thompson, C.B.; Lindsten, T. TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 679-688.
75. Regnier, C.H.; Masson, R.; Kedinger, V.; Textoris, J.; Stoll, I.; Chenard, M.P.; Dierich, A.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5585-5590.
76. Abell, A.N.; Rivera-Perez, J.A.; Cuevas, B.D.; Uhlik, M.T.; Sather, S.; Johnson, N.L.; Minton, S.K.; Lauder, J.M.; Winter-Vann, A.M.; Nakamura, K.; Magnuson, T.; Vaillancourt, R.R.; Heasley, L.E.; Johnson, G.L. Ablation of MEKK4 kinase activity causes neurulation and skeletal patterning defects in the mouse embryo. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 8948-8959.
77. Chi, H.; Sarkisian, M.R.; Rakic, P.; Flavell, R.A. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3846-3851.
78. Buac, K.; Watkins-Chow, D.E.; Loftus, S.K.; Larson, D.M.; Incao, A.; Gibney, G.; Pavan, W.J. A Sox10 expression screen identifies an amino acid essential for Erbb3 function. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000177.

79. Masson, R.; Regnier, C.H.; Chenard, M.P.; Wendling, C.; Mattei, M.G.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) expression pattern during mouse development. *Mech. Dev.* **1998**, *71*, 187-191.
80. Aston, C.; Jiang, L.; Sokolov, B.P. Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77*, 858-866.
81. Hsiao, L.L.; Dangond, F.; Yoshida, T.; Hong, R.; Jensen, R.V.; Misra, J.; Dillon, W.; Lee, K.F.; Clark, K.E.; Haverty, P.; Weng, Z.; Mutter, G.L.; Frosch, M.P.; MacDonald, M.E.; Milford, E.L.; Crum, C.P.; Bueno, R.; Pratt, R.E.; Mahadevappa, M.; Warrington, J.A.; Stephanopoulos, G.; Stephanopoulos, G.; Gullans, S.R. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol. Genomics* **2001**, *7*, 97-104.
82. Kedinger, V.; Alpy, F.; Tomasetto, C.; Thisse, C.; Thisse, B.; Rio, M.C. Spatial and temporal distribution of the traf4 genes during zebrafish development. *Gene Expr. Patterns* **2005**, *5*, 545-552.
83. Taylor, J.S.; Braasch, I.; Frickey, T.; Meyer, A.; Van de Peer, Y. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* **2003**, *13*, 382-390.
84. Preiss, A.; Johannes, B.; Nagel, A.C.; Maier, D.; Peters, N.; Wajant, H. Dynamic expression of Drosophila TRAF1 during embryogenesis and larval development. *Mech. Dev.* **2001**, *100*, 109-113.
85. Liu, H.; Su, Y.C.; Becker, E.; Treisman, J.; Skolnik, E.Y. A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 101-104.
86. Mathew, S.J.; Kerridge, S.; Leptin, M. A small genomic region containing several loci required for gastrulation in Drosophila. *PLoS One* **2009**, *4*, e7437.
87. Cha, G.H.; Cho, K.S.; Lee, J.H.; Kim, M.; Kim, E.; Park, J.; Lee, S.B.; Chung, J. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in Drosophila melanogaster mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 7982-7991.
88. Kuranaga, E.; Kanuka, H.; Igaki, T.; Sawamoto, K.; Ichijo, H.; Okano, H.; Miura, M. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 705-710.
89. Kornbluth, S.; White, K. Apoptosis in Drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 1779-1787.
90. Geuking, P.; Narasimamurthy, R.; Basler, K. A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of Drosophila TAB2 as a functionally conserved component. *Genetics* **2005**, *171*, 1683-1694.
91. Zapata, J.M.; Matsuzawa, S.; Godzik, A.; Leo, E.; Wasserman, S.A.; Reed, J.C. The Drosophila tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates NFkappaB activity. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12102-12107.
92. Abell, A.N.; Johnson, G.L. MEKK4 is an effector of the embryonic TRAF4 for JNK activation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35793-35796.

1.5.2. Les données récentes sur TRAF4

1.5.2.1. TRAF4, un régulateur négatif de l'immunité

Plusieurs articles récents décrivent l'implication de TRAF4 dans l'immunité. TRAF4 est un régulateur négatif de NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2), un PRR (Pattern Recognition Receptor) intracellulaire qui reconnaît des peptidoglycanes bactériens (Marinis et al., 2011). Une fois lié à son ligand, il va activer la voie NF- κ B et induire une réponse immunitaire appropriée. NOD2 est un gène de susceptibilité à la maladie de Crohn, une pathologie caractérisée par une inflammation chronique de l'intestin. La perte de fonction de NOD2 conduirait à une réponse immunitaire inappropriée et ainsi à une synthèse de cytokines pro-inflammatoire accrue (Hugot et al., 2001). Une étude visant à identifier des cibles de la kinase IKK α , a montré qu'IKK α phosphoryle TRAF4 sur sa sérine 426. De manière intéressante, seule la forme phosphorylée de TRAF4 interagit avec NOD2. Ce résultat montre que la phosphorylation de TRAF4 par IKK α est nécessaire à l'inhibition de NOD2 médiée par TRAF4 (Marinis et al., 2012).

Les lymphocytes Th17 sont des cellules T auxiliaires caractérisées par leur capacité à produire en grande quantité l'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire puissante. Ces cellules sont connues pour participer au développement de nombreuses maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde (Rendon and Choudhry, 2012; Waite and Skokos, 2011). En effet, une production accrue d'IL-17 conduit à une forte activation du récepteur IL-17R qui, en recrutant les ubiquitines ligases E3 Act1 (NF- κ B Activator 1) et TRAF6, vont activer la voie NF- κ B et induire la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. De manière intéressante, les souris déficientes pour TRAF4 (Shiels et al., 2000) ont une activation exacerbée de la voie NF- κ B induite par l'IL-17. De plus, la déficience de TRAF4 chez la souris prédispose au développement de la sclérose en plaque dans des modèles inductibles de la maladie. Au niveau moléculaire, il a été montré que TRAF4 inhibe la voie NF- κ B induite par l'IL-17 en étant en compétition avec TRAF6 pour la liaison à Act1 (Zepp et al., 2012).

Ensemble, ces données confirment que TRAF4 est un régulateur négatif des réponses immunitaires et inflammatoires, et suggèrent que TRAF4 pourrait être un gène de susceptibilité pour certaines maladies auto-immunes (Marinis et al., 2011; Zepp et al., 2012).

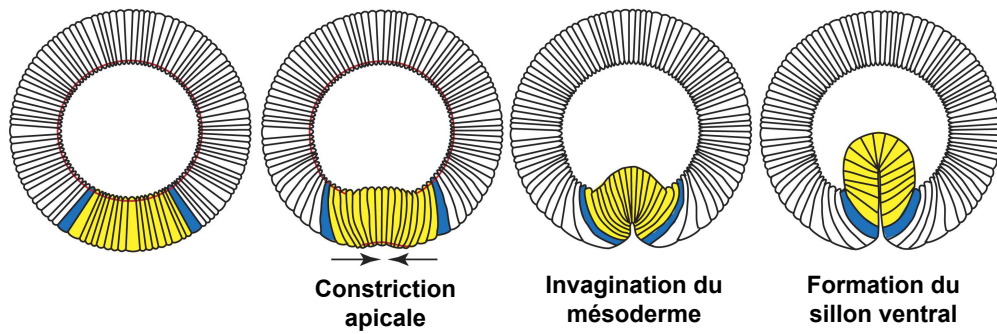


Figure 13 : Représentation schématique de la formation du sillon ventrale chez la drosophile

La constriction apicale des cellules épithéliales est caractérisée par la contraction du cytosquelette d'actino-myosine. Cette étape est requise pour la formation du sillon ventral par invagination des cellules du mésoderme. Ce mécanisme morphogénétique est directement régulé par les facteurs de transcriptions Twist (bleu) et Snail (jaune) (adapté de Woolner et Martin, 2006).

1.5.2.2. TRAF4, une protéine impliquée dans la myélinisation des axones

L'analyse comportementale des souris déficientes pour TRAF4, réalisée au laboratoire a montré que la délétion de TRAF4 conduit chez les animaux survivants à une altération de la coordination des mouvements. L'analyse morphologique de ces animaux a révélé des altérations cellulaires majeures au niveau des cervelets. Il a été observé un défaut d'enroulement de la gaine de myéline autour des axones ainsi qu'une dégénérescence des cellules de Purkinje, deux phénotypes pouvant expliquer l'atteinte comportementale des souris TRAF4 ^{-/-} (Blaise et al., 2012). Une étude moléculaire a montré que la déficience en TRAF4 conduisait à une augmentation du niveau d'expression de Nogo-A (Neurite outgrowth inhibitor-A), une protéine inhibitrice de la croissance des neurites (tout prolongement du corps cellulaire d'un neurone) dans le cervelet (Blaise et al., 2012). Nogo-A a été impliqué dans le processus de démyélinisation observé dans le développement de la sclérose en plaque (Petratos et al., 2012; Yang et al., 2010). Ces données suggèrent que la délétion de TRAF4 pourrait promouvoir certaines maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaque, en stimulant la voie NF- κ B induite par l'IL-17 et en augmentant l'expression de Nogo-A. Ce travail réalisé au laboratoire a permis la publication d'un article dans lequel je suis co-auteur (Blaise et al., 2012 ; Annexe 1).

1.5.2.3. TRAF4, une protéine impliquée dans la polarité cellulaire

Une étude récente menée chez la mouche, confirme le rôle de TRAF4 dans la polarité cellulaire. La constriction apicale des cellules épithéliales est un processus largement utilisé lors de la morphogénèse chez la drosophile (Woolner, 2007). Ce mécanisme implique la contraction du cytosquelette d'acto-myosine dans la région apicale des cellules épithéliales du blastoderme, une étape nécessaire à la formation du sillon ventral par invagination des cellules du mésoderme (Figure 13). Ce mécanisme est directement régulé par les facteurs de transcriptions Twist et Snail. Il a récemment été montré que Twist stimule l'expression de DTRAF1 et que DTRAF1 est nécessaire à la formation du sillon ventral chez la drosophile. Au niveau moléculaire, DTRAF1 est requis pour la localisation apicale d'Armadillo, l'orthologue de la β -caténine chez la mouche (Mathew et al., 2011). La déficience de TRAF4 chez la drosophile conduit donc à un défaut de la polarité apico-basale conduisant à une absence de constriction apicale.

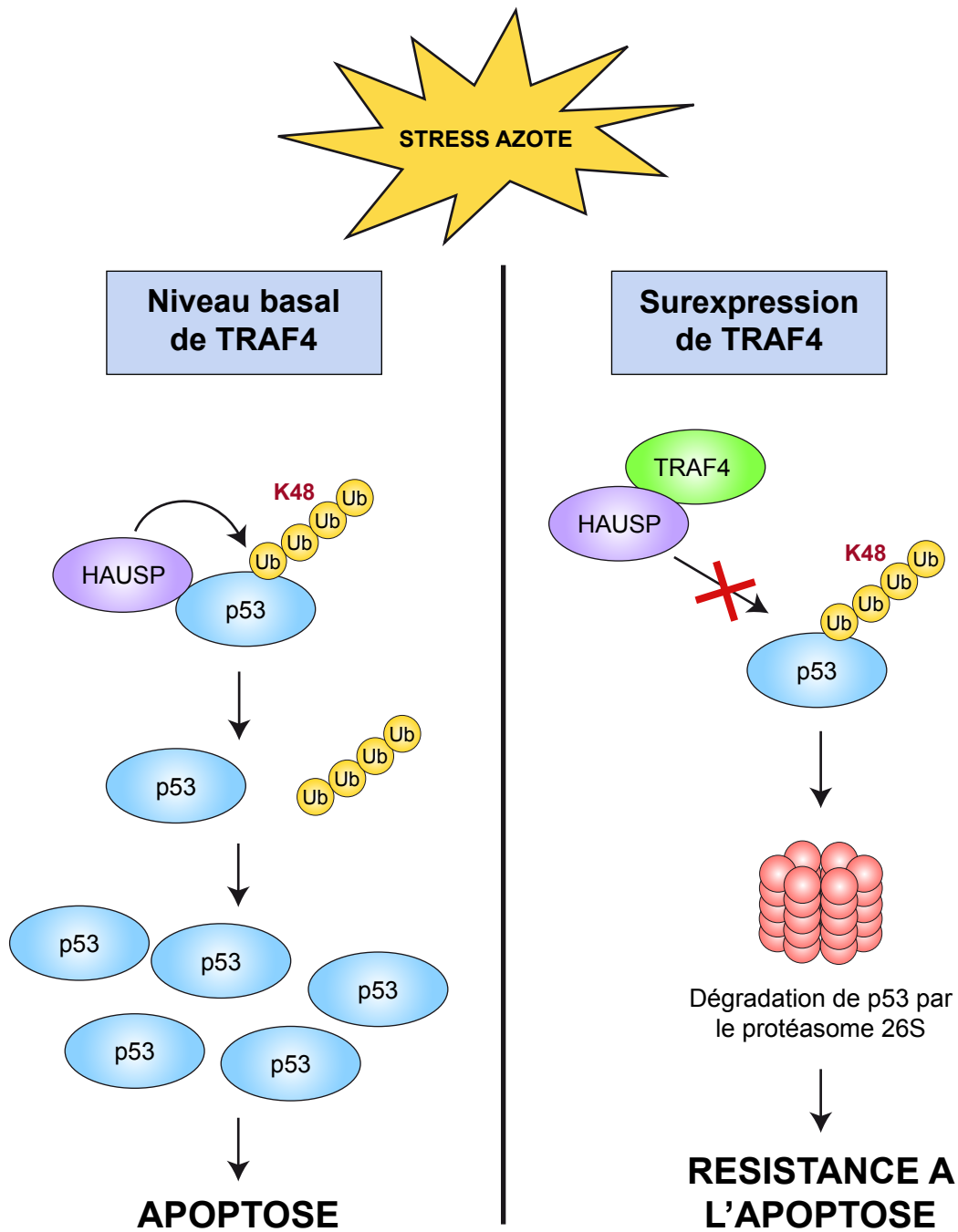


Figure 14 : TRAF4 prévient l'induction de p53 suite à un stress azoté

Suite à un stress azoté, la protéine déubiquitinase HAUSP interagit avec p53 et induit sa déubiquitinylation. La forme non ubiquitinylée de p53 étant stable, elle s'accumule et induit l'apoptose si le stress est maintenu. La surexpression de TRAF4 prévient l'interaction entre HAUSP et p53, ce qui conduit à une absence de déubiquitinylation de p53. La forme polyubiquitinylée de p53 est dirigée vers le protéasome 26S où elle va être dégradée. La surexpression de TRAF4, en empêchant la stabilisation de p53, conduit donc à une résistance à l'apoptose induite par un stress azoté.

1.5.2.4. TRAF4, une protéine pro-tumorale

Un criblage différentiel réalisé au laboratoire a permis d'identifier TRAF4 comme étant un gène surexprimé dans les cancers du sein (Tomasetto et al., 1995). Depuis, il a été montré que la surexpression de TRAF4 est retrouvée dans environ 40% des carcinomes tous types confondus (Camilleri-Broët et al., 2007; Rhodes et al., 2004). Bien que sa surexpression soit clairement acceptée, son implication dans les cancers reste mal caractérisée.

SRC3 (Steroid Receptor Coactivator 3) est une protéine coactivatrice de la transcription qui interagit avec les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes (Garabedian and Logan, 2008). La surexpression de SRC3 chez la souris est suffisante pour induire la formation de carcinomes mammaire (Torres-Arzayus et al., 2004). De manière intéressante, il a récemment été décrit que TRAF4 est impliquée dans la voie de signalisation médiée par SCR3 et que leurs expressions sont corrélées dans les cancers du sein (Yi et al., 2013). Au niveau cellulaire, il a été montré que les cellules sur-exprimant TRAF4 et/ou SRC3 sont résistantes à l'apoptose due à un stress oxydatif. La surexpression de l'une de ces deux protéines est suffisante pour la déstabilisation de p53 induite par un stress oxydatif (Yi et al., 2013). Au niveau moléculaire, TRAF4 diminue l'interaction entre p53 et l'enzyme déubiquitineuse HAUSP (Herpesvirus-Associated Ubiquitin-Specific Protease), ce qui engendre une augmentation de la polyubiquitinylation de p53 conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S (Figure 14). Cette étude a également montrée que la surexpression de TRAF4 dans les cancers du sein est associée à un mauvais pronostic (Yi et al., 2013).

Ce travail apporte de nouvelles données quant au rôle de TRAF4 dans la carcinogénèse mammaire. Dans ce travail c'est le rôle de la protéine dans les compartiments cytoplasmique et/ou nucléaire qui est évoqué. La fonction de TRAF4 dans les jonctions serrées, des structures clés dérégulées dans la carcinogénèse, reste peu claire à ce jour. Le déchiffrement de la fonction de TRAF4 dans les jonctions serrées des cellules épithéliales mammaires a été l'objet principal de mes travaux de thèse.

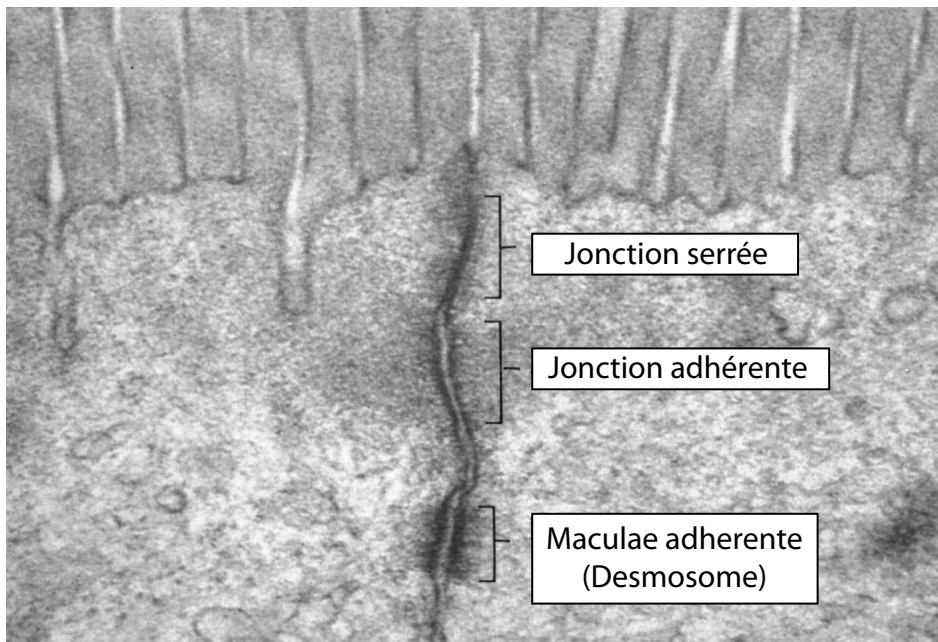


Figure 15 : Les jonctions d'adhésion intercellulaires

Morphologie des complexes jonctionnels de la région apicale de l'intestin de hamster par analyse en microscopie électronique à transmission. Les jonctions serrées forment une structure jointive dense qui scelle l'espace paracellulaire et servent de barrière sélective au passage des molécules de la lumière de l'intestin. Les jonctions adhérentes sont formées par deux lignes membranaires séparées par 20 nm de distance étroitement reliées au cytosquelette d'actine. Les desmosomes forme un bouton d'adhésion relié aux filaments intermédiaires du cytosquelette (adapté de Fawcett DW, *The Cell: An Atlas of Fine Structure*).

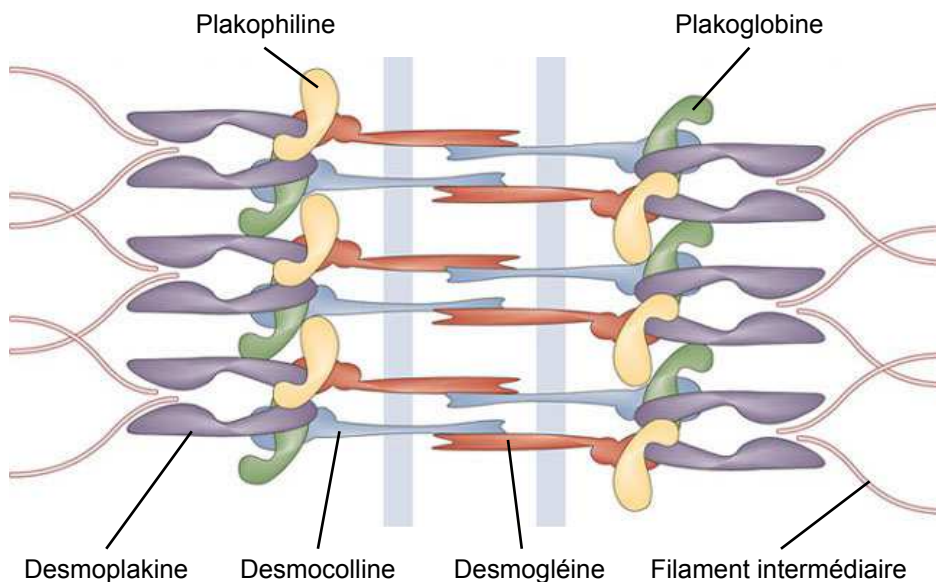


Figure 16 : Architecture d'un desmosome

Représentation schématique de l'organisation d'un desmosome avec ses différents constituants. Les desmocollines et les desmogléines, des protéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines, forment des interactions hétérophiles. Elles sont reliées aux protéines de la plaque dense (Desmoplakine) par l'intermédiaire des plakophilines et des plakoglobines. La plaque dense sert de support à l'ancrage des filaments intermédiaires du cytosquelette (adapté de Tintelen et Hauer, 2009).

CHAPITRE 2 : LA POLARITE APICO-BASALE DES CELLULES EPITHELIALES

2.1. INTRODUCTION

La formation des contacts intercellulaires est essentielle pour la fonction des tissus et organes. C'est particulièrement vrai pour l'épithélium qui est formé par des cellules épithéliales qui adhèrent les unes aux autres. Les épithélia sont des feuillets cellulaires couvrant les cavités de certains organes qui servent de barrières entre les différents compartiments du corps (Franke, 2009; Niessen, 2007). Les épithélia sont impliqués dans de nombreux processus tels que l'absorption, la sécrétion, la diffusion sélective de molécules et l'intégrité physique du corps. Les jonctions intercellulaires telles que les desmosomes, les jonctions adhérentes (JAs) et les jonctions serrées (JSs), jouent un rôle crucial dans la formation et le maintien de l'épithélium. Ces trois systèmes de jonctions ont une architecture similaire fondée sur des protéines transmembranaires associées à des protéines formant une plaque cytoplasmique (Figure 15) (St Johnston and Sanson, 2011). Les jonctions communicantes (JCs) forment, quant à elles, un système de canaux intercellulaires permettant l'échange direct de molécules de petites tailles entre les cellules. Ainsi, en plus de participer à l'adhésion intercellulaire, elles ont un rôle homéostatique au sein du tissu (Matsuuchi and Naus, 2013).

2.2. LES DESMOSOMES

Les desmosomes sont majoritairement présents au sein des tissus épithéliaux mais ils sont également retrouvés au sein d'autres tissus comme le muscle et le thymus. Leur rôle principal est de maintenir les cellules voisines assemblées et d'offrir des points d'ancrage aux filaments intermédiaires du cytosquelette (Garrod and Chidgey, 2008). L'architecture ultrastructurale des desmosomes a été caractérisée dès les années 70 (Figure 15) (Farquhar and Palade, 1963; Staehelin, 1974). Les desmosomes sont des complexes moléculaires formés de trois composants : des protéines transmembranaires (desmocolline et desmogléine), des protéines d'ancrage (desmoplakine, plakoglobine et plakophiline) et des filaments intermédiaires (kératine et vimentine respectivement au sein des cellules épithéliales et fibroblastiques) (Figure 16). La desmocolline et la desmogléine, deux protéines de la famille des cadhérines, vont établir des interactions hétérophiles entre cellules voisines de manière calcium-dépendante (Figure 16). Sur la face cytosolique, les desmoplakines forment la plaque dense

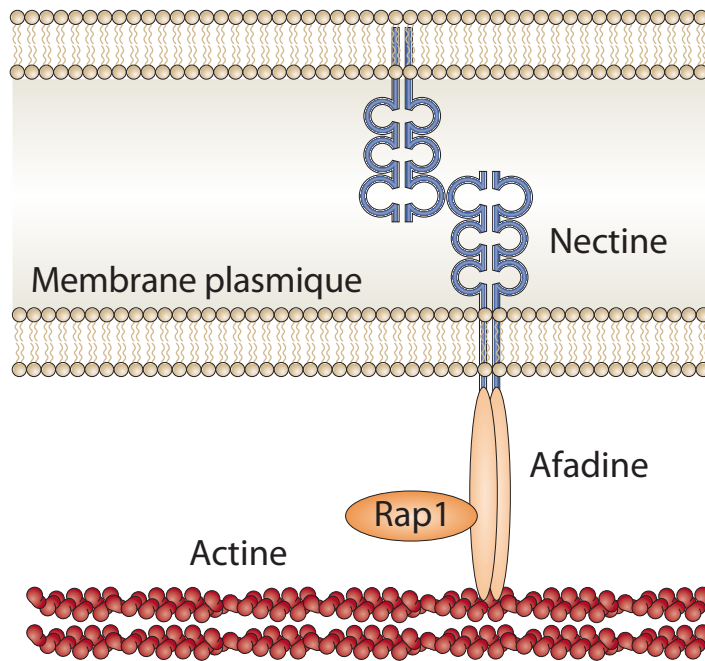


Figure 17 : Les jonctions adhérentes médiées par le complexe nectine/afadine

Représentation schématique du complexe nectine/afadine formant les jonctions adhérentes (JAs). Les nectines forment des interactions homophiles ou hétérophiles par leurs domaines extracellulaires de type immunoglobuline. Leurs queues cytoplasmiques recrutent les protéines afadines qui servent d'intermédiaire à l'ancrage du cytosquelette d'actine. L'afadine est une protéine multidomaine qui, en interagissant avec d'autres médiateurs cytoplasmiques comme Rap1, est impliquée dans la transduction de signaux initiés aux JAs (adapté de Takai et al., 2008).

qui sert d'ancrage aux filaments intermédiaires du cytosquelette. Deux protéines d'ancrage permettent l'association entre les protéines transmembranaires et celles de la plaque dense : la plakoglobine et la plakophiline (Figure 16) (Delva et al., 2009).

2.3. LES JONCTIONS ADHÉRENTES

Les jonctions adhérentes constituent des points d'ancrage pour le réseau d'actine, de manière à assembler les cytosquelettes des cellules d'un épithélium en un robuste réseau. Selon l'axe apico-basal, elles sont positionnées juste en-dessous des JSs et sont caractérisées à l'échelle ultrastructurale par deux membranes parallèles séparées par environ 20 nm de distance (Figure 15). Les JAs sont constituées de deux unités d'adhésion : le complexe nectine/afadine et le complexe cadhérine/caténine (Harris and Tepass, 2010).

2.3.1. Le complexe nectine-afadine

La famille des nectines est composée de 4 membres (nectine 1 à 4) qui forment des interactions homophiles ou hétérophiles avec leurs analogues des cellules voisines (Figure 17). Les nectines ont un domaine extracellulaire constitué de trois motifs de type immunoglobuline, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant un motif de liaison au domaine PDZ (acronyme de : PSD95 (post synaptic density protein 95), Dlg1 (disc large tumor suppressor 1) et ZO-1 (zonula occludens-1)). Les nectines sont liées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines afadines (Figure 17). L'afadine est une protéine modulaire contenant un domaine PDZ, deux domaines de liaison à Ras, un domaine DIL (Dilute Domain), un domaine FHA (Forkhead-Associated) et trois domaines riches en proline (PRR). Ce grand nombre de domaines suggère que l'afadine, en plus de faire le lien entre les nectines et le cytosquelette d'actine, sert de plateforme permettant l'association de protéines adaptatrices relayant les signaux initiés aux JAs. Il a notamment été décrit que le domaine de liaison à Ras de l'afadine lie la protéine Rap1, ce qui participe au maintien d'un état non prolifératif de la cellule (Figure 17) (Baum and Georgiou, 2011).

2.3.2. Le complexe cadhérine/caténine

Les protéines transmembranaires clés des JAs appartiennent à la superfamille des cadhérines composée de plus de 80 membres (Angst et al., 2001). L'E-cadhérine, principalement exprimée au sein des épithélia, est la plus caractérisée de la famille. La partie extracellulaire de l'E-cadhérine contient cinq domaines EC (Ectodomain) répétés en tandem

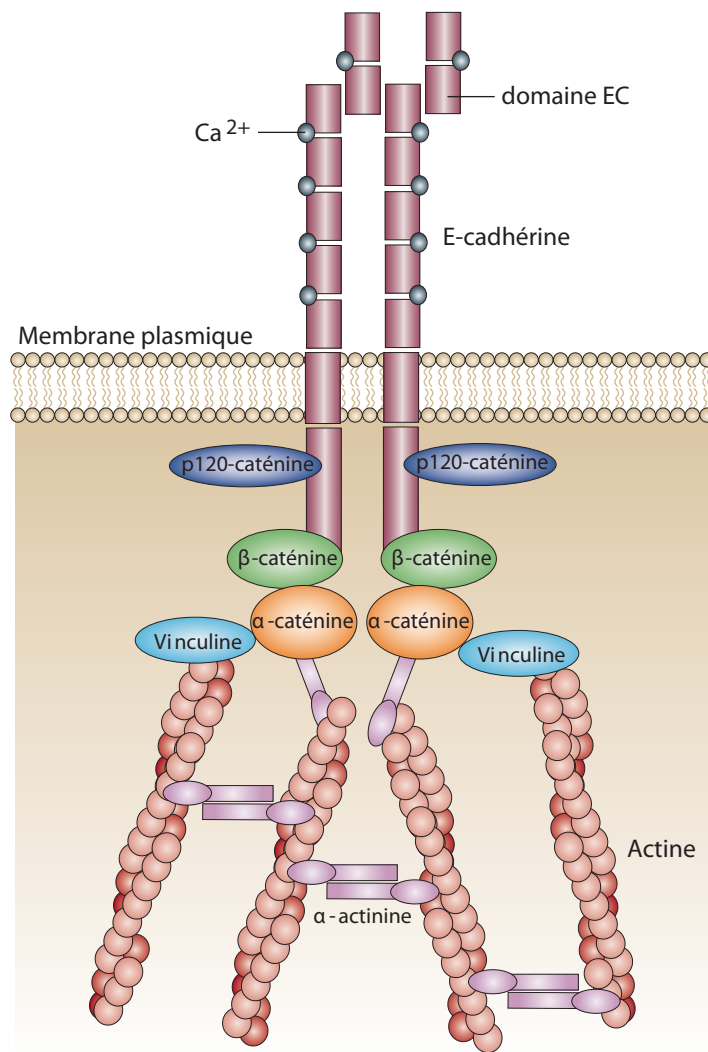


Figure 18 : Les jonctions adhérentes médiées par le complexe E-cadhérine /caténine

Représentation schématique du complexe E-cadhérine/caténine formant les jonctions adhérentes (JAs). Les E-cadhérines forment des interactions homophiles grâce à leurs domaines extracellulaires EC (Ectodomain) de manière calcium dépendante. Sa queue cytoplasmique recrute la β -caténine qui sert d'intermédiaire au recrutement de l' α -caténine. L' α -caténine permet l'ancrage du cytosquelette en liant directement ou indirectement (via α -actinine et vinculine) l'actine. La protéine p120-caténine est un régulateur des JAs appartenant à la famille des protéines à répétitions Armadello (adapté de Kobiellak and Fuchs, 2004).

qui, après avoir lié du calcium, forment des liaisons homophiles avec leurs analogues des cellules voisines (Figure 18). La taille du domaine extracellulaire de l'E-cadhérine est ~22 nm, ce qui est cohérent avec la séparation d'environ 20 nm des deux membranes plasmiques formant la JA. L'E-cadhérine a une région cytoplasmique de 150 acides aminés qui est très conservée dans l'évolution. Cette région contient des sites de liaison pour la β -caténine et la plakoglobine, deux membres de la superfamille des protéines à répétitions Armadillo (Figure 18) (Harris and Tepass, 2010; Yonemura et al., 1995). Il a été montré que l'interaction entre la queue cytoplasmique de l'E-cadhérine avec les 12 répétitions Armadillo de la β -caténine était requise au trafic des E-cadhérines néosynthétisées vers la membrane plasmique (Chen et al., 1999). Le domaine N-terminal de la β -caténine et de la plakoglobine lient directement l' α -caténine. Comme l' α -caténine est capable d'interagir directement ou indirectement (via l' α -actinine et la vinculine) avec les microfilaments d'actine, elle permet l'ancrage du complexe E-cadhérine/caténines au cytosquelette d'actine (Figure 18) (Baum and Georgiou, 2011). La liaison de l' α -caténine à la protéine afadine permet également de rassembler les complexes d'adhésion E-cadhérine/caténine et nectine/afadine au niveau des JAs. Ces mécanismes sont importants pour la stabilisation des interactions cellule-cellule ainsi que pour la coordination entre les JAs et le cytosquelette d'actine (Baum and Georgiou, 2011).

La protéine p120-caténine, un autre membre de la famille des protéines à répétitions Armadillo, est un régulateur central des JAs médiées par les cadhérines (Figure 18). En effet, la liaison de p120-caténine à l'E-cadhérine est nécessaire au maintien d'un nombre adéquat d'E-cadhérines au sein des JAs. Plusieurs agents tels que l'histamine et la thrombine régulent la phosphorylation de p120-caténine par la protéine kinase C (PKC), permettant une modulation rapide de l'adhésion cellule-cellule (Xia et al., 2003).

2.4. LES JONCTIONS SERREES

En 1963, Farquhar et Palade ont découvert les JSs par des observations d'épithélias en microscopie électronique (Figure 15) (Farquhar and Palade, 1963). Ce sont les premiers à proposer l'idée que les JSs, en formant une structure jointive, servent de barrière sélective régulant le passage des molécules à travers l'espace paracellulaire (Figure 15). Les JSs sont positionnées dans la région apicale séparent la membrane cellulaire en deux territoires distincts : apical et basolatéral, dont la composition en lipides et protéines diffère. La perte des JSs conduit à un mélange des protéines et lipides de ces deux compartiments et ainsi à la perte de la polarité apico-basale (Furuse, 2010; Shin et al., 2006).

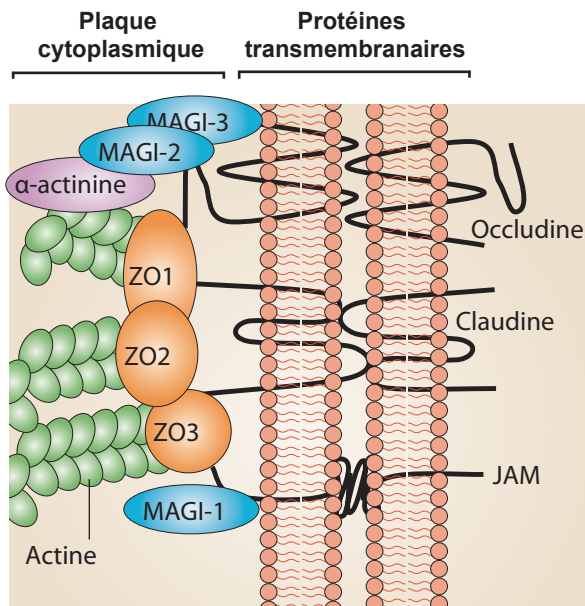


Figure 19 : Les jonctions serrées (JSs)
 Représentation schématique des différentes protéines constituant les JSs. L'architecture des JSs est caractérisée par la présence de protéines transmembranaires associées à des protéines formant une plaque cytoplasmique. Les protéines transmembranaires occludines, claudines et JAMs (Junctional Adhesion Molecule) forment une structure jointive permettant de sceller l'espace paracellulaire. Elles sont liées aux protéines des plaques cytoplasmiques comme les ZOs (Zonula occludens) et les MAGIs (Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure) qui servent d'intermédiaires à la liaison au cytosquelette d'actine. Les protéines MAGIs sont liées à l'actine de manière indirecte via l' α -actinine (adapté de Aktories et Barbieri, 2005).

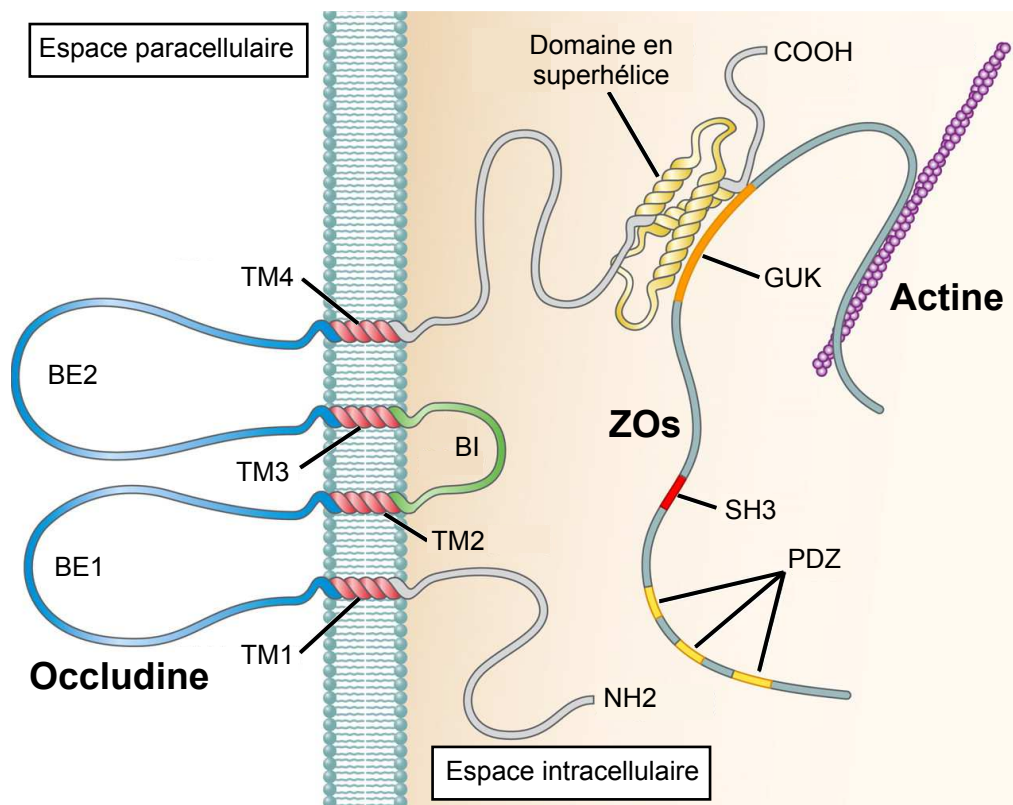


Figure 20 : Représentation schématique de l'occludine

L'occludine possède quatre domaines transmembranaires (TM1 à TM4), deux boucles extracellulaires (BE1 et BE2), une boucle intracellulaire (BI) et deux domaines intracellulaires. Les boucles extracellulaires forment des interactions homophiles tandis que le domaine intracellulaire lie des protéines de la plaque cytoplasmique comme les ZOs (zonula occludens). Les ZOs font l'intermédiaire entre les occludines et le cytosquelette d'actine. GUK (Guanylate Kinase); SH3 (Src Homology-3) et PDZ (PSD95, Dlg1 et ZO-1) (adapté de Cummins, 2012).

2.4.1. Structure des jonctions serrées

Les JSs sont formées par un échafaudage macromoléculaire complexe composé par au moins deux catégories de protéines distinctes : les protéines transmembranaires et les protéines de plaque cytoplasmique (Figure 19).

2.4.1.1. Les protéines transmembranaires

Les protéines transmembranaires sont primordiales pour la formation et le maintien des JSs. En interagissant avec leurs analogues des cellules adjacentes, elles forment une ligne jointive qui soude les membranes, ce qui permet de rendre l'espace intercellulaire imperméable au contenu intraluminal (Figure 15). Les JSs sont majoritairement composées par trois types de protéines : l'occludine, les claudines et les JAMs (Junctional Adhesion Molecule) (Figure 19).

2.4.1.1.1. L'occludine

L'occludine a initialement été identifiée à partir du foie de poulet comme la première protéine transmembranaire des JSs (Furuse et al., 1993). L'occludine est constituée de quatre domaines transmembranaires formant deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire ; ses extrémités amino- et carboxy-terminales sont présentes dans la région intracellulaire (Figure 20). Il a été montré que le domaine en superhélice présent dans la région carboxy-terminale de l'occludine permet le recrutement des protéines ZO-1 (Zonula occludens-1), ZO-2 et ZO-3 au niveau des JSs. Les protéines ZOs font office d'intermédiaire entre l'occludine et le cytosquelette d'actine (Figure 20) (Bauer et al., 2010). Dans des cellules épithéliales polarisées MDCKs (Madin-Darby Canine Kidney), l'expression d'un mutant d'occludine dépourvu de domaine intracellulaire carboxyterminal conduit à une augmentation de la perméabilité paracellulaire, ce qui souligne l'importance de cette région (Balda et al., 1996). Ce résultat a été confirmé par une étude réalisée chez le Xénope qui montre que le domaine intracellulaire de l'occludine est nécessaire à la formation des JSs lors du développement embryonnaire (Bamforth et al., 1999). De plus, l'addition d'un peptide correspondant au deuxième domaine extracellulaire de l'occludine sur des cellules A6 (cellules épithéliales de rein provenant du Xénope) perturbe l'intégrité des JSs (Wong and Gumbiner, 1997). La région extracellulaire de l'occludine participe également à la formation et au maintien des JSs. Au niveau fonctionnel, l'occludine joue un rôle important dans la localisation aux JSs du récepteur au TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Barrios-Rodiles

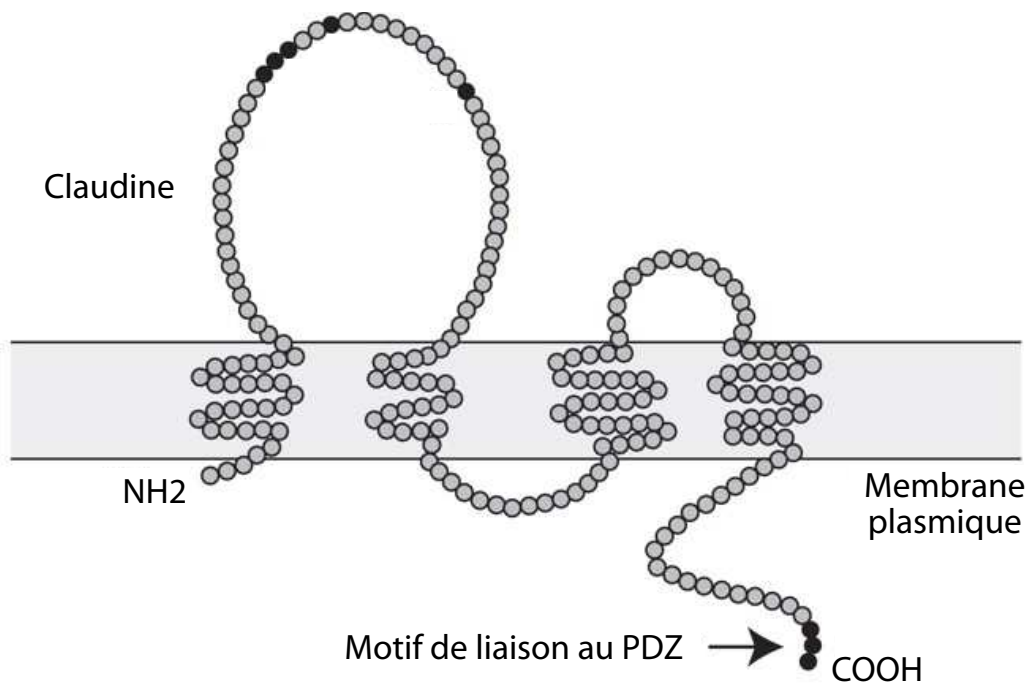


Figure 21 : Représentation schématique des claudines

Les claudines possèdent quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux domaines intracellulaires. Les boucles extracellulaires forment des interactions homophiles et hétérophiles tandis que le domaine intracellulaire lie les domaines PDZ. Les résidus importants pour les interactions protéine-protéine sont colorés en noir (adapté de Furuse, 2010).

et al., 2005). Ce mécanisme pourrait être requis pour l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) médiée par le TGF- β , un processus qui nécessite la perte des jonctions intercellulaires.

2.4.1.1.2. Les claudines

A l'instar de l'occludine, les claudines ont quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux domaines intracellulaires (Figure 21). Malgré cette ressemblance topologique, aucune similarité de séquence n'est observée entre ces deux familles. Tsukita et ses collègues sont les premiers à avoir isolé des claudines à partir du foie de poulet (Furuse et al., 1998). Actuellement, 27 claudines différentes ont été identifiées chez les mammifères (Günzel and Yu, 2013). La formation de liaisons homophiles et hétérophiles via leurs domaines extracellulaires est un mécanisme clé pour la formation et le maintien des JSs. Il a notamment été montré que l'expression ectopique des claudines 1 et 2 au sein de cellules fibroblastiques induit une agrégation cellulaire. Une analyse en microscopie électronique a révélé la présence de contacts cellulaires composés d'un réseau jonctionnel bien développé, similaire à celui des JSs. Lorsque l'occludine et les claudines sont co-exprimées dans ces fibroblastes, l'occludine est recrutée dans les structures jonctionnelles formées par les claudines. Ces résultats suggèrent que les claudines sont les protéines initiatrices des JSs et qu'elles vont servir de base au recrutement d'autres composants (Furuse, 2010; Furuse et al., 1998). La région carboxyterminale des claudines possède un motif de liaison au domaine PDZ très conservé au sein de la famille (Figure 21). Ce domaine permet aux claudines d'interagir avec les protéines des plaques cytoplasmiques comme les protéines ZO_s et PATJ (Protein-Associated with Lin Seven 1(PALS1)-Associated Tight Junction protein) (Shin et al., 2006).

Les claudines sont régulées au niveau transcriptionnel par la protéine Snail, un facteur de transcription à doigt de zinc impliqué dans la TEM. Snail est un répresseur de l'expression de plusieurs protéines des jonctions intercellulaires incluant l'E-cadhérine, l'occludine et les claudines. De ce fait, l'expression de Snail dans des cellules polarisées conduit à une augmentation de la perméabilité paracellulaire et *in fine* à une perte des JSs (Ikenouchi et al., 2003).

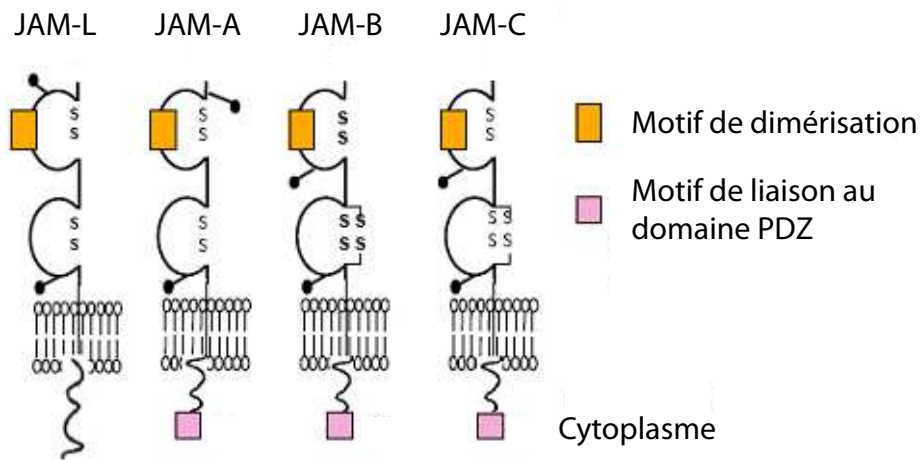


Figure 22 : Représentation schématique des protéines JAMs

Les JAMs (Junctional Adhesion Molecules) ont un seul domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire contenant deux motifs de type immunoglobuline et une queue cytoplasmique. Les domaines extracellulaires, en plus de permettre la dimérisation des JAMs, forment des interactions homophiles et/ou hétérophiles. La plupart des protéines JAMs ont un motif de liaison au domaine PDZ dans leurs régions cytoplasmiques (adapté de Pierre-Olivier Couraud, Institut Cochin, Paris).

2.4.1.1.3. Les protéines JAMs

Les JAMs sont des membres de la superfamille des immunoglobulines qui sont majoritairement exprimés au sein des cellules épithéliales. Quatre protéines JAMs ont été identifiées chez les mammifères : JAM-A, JAM-B, JAM-C et JAM-L (Figure 22) (Furuse, 2010). Au sein des épithélia, JAM-A, JAM-B et JAM-L sont localisées au JSs, tandis que JAM-B est présente tout le long de la membrane basolatérale (Shin et al., 2006). Les protéines JAMs ont un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire contenant deux motifs de type immunoglobuline et une queue cytoplasmique (Figure 22). Le domaine extracellulaire, en plus de médier des interactions homophiles et/ou hétérophiles, possède un motif de dimérisation (Figure 22). Il a été montré que l'inhibition de la dimérisation de JAM-A par un anticorps monoclonal, conduit à un désassemblage des JSs et à une augmentation de la perméabilité cellulaire. Le phénotype observé suite à l'inhibition de la dimérisation de JAM-A serait en partie dû à une modification du profil d'expression des claudines (Severson and Parkos, 2009).

Mise à part JAM-L, les protéines JAMs ont un motif de liaison au domaine PDZ dans leurs régions cytoplasmiques, ce qui permet de recruter les protéines des plaques cytoplasmiques telles que ZO-1, MAGI-1 (Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure 1), MUPP1 (Multi-PDZ domain Protéin 1) et PAR3 (Partitioning defective 3) (Figure 22) (Furuse, 2010; Monteiro and Parkos, 2012). Bien que la plupart de ces interactions semble être requises à la fonction des JAMs, les mécanismes moléculaires sous-jacents nécessitent d'être approfondis.

2.4.1.2. Les protéines des plaques cytoplasmiques

Les protéines transmembranaires des JSs lient, via leurs domaines intracellulaires, les protéines des plaques cytoplasmiques (Furuse, 2010). Des études génétiques et biochimiques ont identifiées les protéines de la famille des MAGUKs (Membrane-Associated Guanylate kinase) comme étant des composants structuraux majeurs des plaques cytoplasmiques (González-Mariscal et al., 2000). Les MAGUKs sont caractérisées par la présence d'un module de base formé de trois domaines distincts :

- Un domaine GUK (Guanylate Kinase), qui catalyse la phosphorylation du GMP (Guanosine monophosphate) en GDP (Guanosine diphosphate) de manière ATP dépendante. Néanmoins, les domaines GUKs des protéines MAGUKs peuvent lier le GMP mais n'ont pas d'activité catalytique.

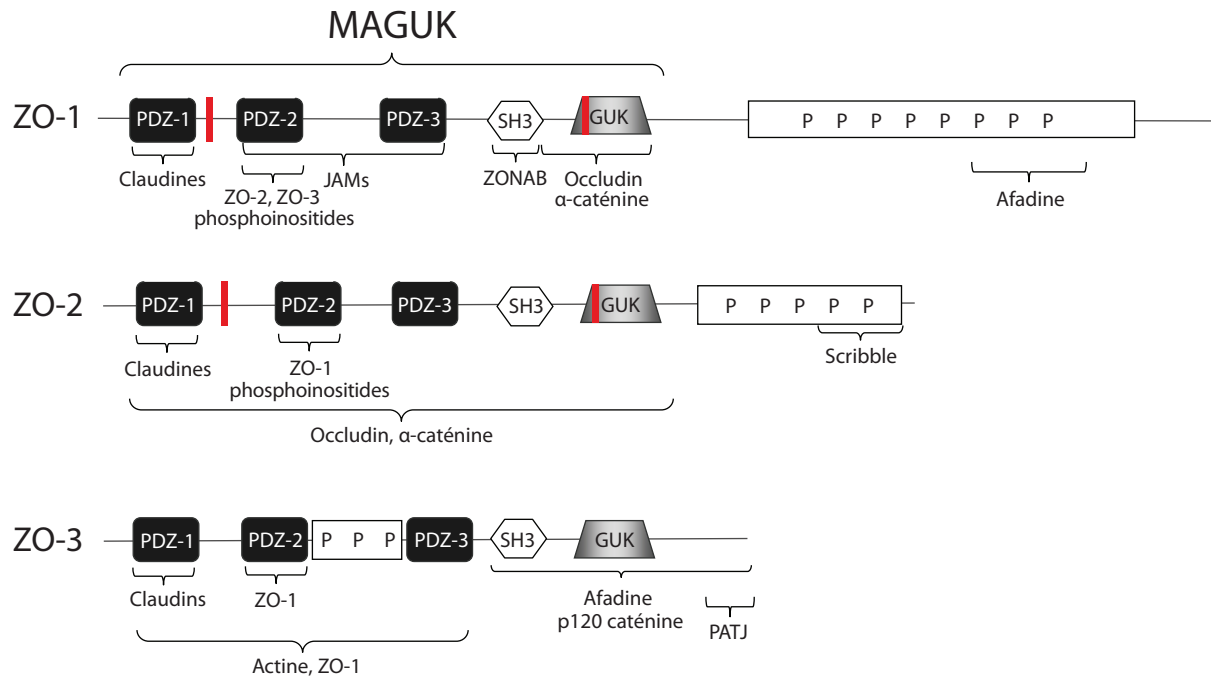


Figure 23 : Représentation schématique des protéines ZO

Les ZO (Zonula Occludens) font partie de la superfamille des MAGUKs qui est caractérisée par la présence d'un module de base formé de trois domaines : un domaine GUK (Guanylate Kinase), un domaine SH3 (Src Homology-3) et un ou trois domaines PDZ (PSD95, Dlg1 et ZO-1). Le domaine GUK qui catalyse la phosphorylation du GMP (Guanosine monophosphate) en GDP (Guanosine diphosphate) est non fonctionnel au sein des MAGUKs. Le domaine SH3 interagit avec des motifs riches en prolines tandis que les domaines PDZs lient des protéines et/ou des phosphoinositides. P-P-P : région riche en prolines. Les motifs NLSs sont représentées par des boites rouges (adapté de Bauer et al., 2010).

- Un ou plusieurs domaines PDZs qui sont des domaines d'interaction protéine-protéine.
- Un domaine de liaison aux régions riches en prolines, majoritairement de type SH3 (Src Homology-3).

Les deux membres les plus étudiés de cette famille sont les protéines ZOs et les protéines MAGIs (Figure 19) (Guillemot et al., 2008).

2.4.1.2.1. La famille ZO

La famille ZO est composée de trois membres : ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Figure 23). Les ZOs sont généralement localisées au niveau des JSs des cellules épithéliales et endothéliales. ZO-3 est restreinte aux cellules épithéliales. ZO-1 est également exprimée dans des cellules non épithéliales comme les astrocytes, les cellules de Schwann et les fibroblastes. ZO-2, à l'instar de ZO-1, n'est pas restreinte aux cellules épithéliales et endothéliales, mais est également exprimée par les fibroblastes et les cellules musculaires cardiaques (Bauer et al., 2010; Inoko et al., 2003).

Plusieurs études ont montré que ZO-1 joue un rôle clé dans la formation et le maintien des JSs. En effet, ZO-1 participe au développement des JSs lors de la formation du blastocyste chez la souris. Les cellules épithéliales dérivées de souris déficientes pour ZO-1, cultivées *in vitro*, montrent un retard dans la formation des JSs (Umeda et al., 2004). ZO-1, en plus de posséder les domaines caractéristiques des MAGUKs, contient deux signaux de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal) et un domaine riche en proline (PRR : Proline-Rich Region) (Figure 23). Plusieurs études ont montré que ZO-1 a une localisation nucléaire durant la formation de l'épithélium, où elle régule la prolifération cellulaire en interagissant avec le facteur de transcription ZONAB (ZO-1-associated Nucleic Acid-Binding) (Bauer et al., 2010). Il a également été montré que ZO-1, une fois dans le noyau, peut réguler l'expression de gènes cibles comme l'IL-8, une cytokine impliquée dans la progression tumorale (Brysse et al., 2012).

Dans les cellules épithéliales non confluentes, ZO-2 a une localisation nucléaire induite par ses deux séquences NLS (Figure 23). Dans ce compartiment, elle interagit directement avec plusieurs facteurs de transcription incluant Fos et Jun (Bauer et al., 2010). Dans les cellules épithéliales confluentes, sa localisation subcellulaire est restreinte aux JSs. Ces données suggèrent que la présence des JSs est suffisante pour recruter ZO-2 et que la perte de ces structures jonctionnelles conduit à sa délocalisation dans le cytoplasme et dans le noyau

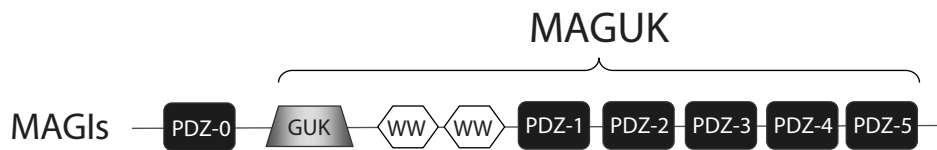


Figure 24 : Représentation schématique des protéines MAGIs

Les MAGIs font parties de la superfamille des MAGUKs, à ce titre elles possèdent les trois domaines caractéristiques de la famille : un domaine GUK (Guanylate Kinase), deux domaines de liaison aux séquences riches en proline (WW) et des domaines PDZ (PSD95, Dlg1 et ZO-1). Néanmoins, l'arrangement de ces trois domaines est différent dans ces protéines MAGIs. De plus, les MAGIs ont six domaines PDZs (adapté de Bauer et al., 2010).

(Jaramillo et al., 2004). A l'inverse des autres membres de la famille, ZO-3 est dépourvue de séquences NLS (Bauer et al., 2010).

Comme mentionné ci-dessus, les ZOs sont des protéines structurales des plaques cytoplasmiques qui interagissent avec de nombreuses protéines incluant des protéines transmembranaires et des composants du cytosquelette. ZO-1 peut interagir avec ZO-2 et ZO-3 via son deuxième domaine PDZ (Figure 23). Toutes les protéines ZOs interagissent directement avec la queue cytoplasmique de l'occludine et des claudines (Feldman et al., 2005). Elles peuvent également lier directement et indirectement les filaments d'actine, ce qui permet l'ancrage du cytosquelette d'actine aux JSs (Bauer et al., 2010). De plus, au sein des cellules épithéliales non confluentes, ZO-1 interagit avec des protéines des JAs telles que l'E-cadhérine et les caténines (Figure 23) (Harris and Tepass, 2010; Niessen, 2007). Prises dans leur ensemble, ces observations indiquent que les protéines ZOs sont recrutées aux JAs au sein des cellules épithéliales non confluentes ; après polarisation, elles vont se concentrer dans les JSs en interagissant avec l'occludine et les claudines (Müller et al., 2005).

2.4.1.2.2. *La famille MAGI*

Les protéines MAGI-1, -2 et -3 appartiennent à la famille des MAGUKs mais ont trois différences majeures avec les autres membres : (1) le domaine GUK est localisé en N-terminal au lieu d'être en C-terminal, (2) le domaine SH3 est remplacé par un domaine WW, qui est également un module d'interaction protéine-protéine liant les domaines riches en prolines, et (3) les protéines MAGIs ont six domaines PDZ alors que les autres protéines de cette famille en ont un ou trois (Figure 24) (Dobrosotskaya et al., 1997). Tandis que MAGI-1 et MAGI-3 sont exprimées dans de nombreux tissus, MAGI-2 est essentiellement retrouvée dans le cerveau. MAGI-1 est localisée aux JSs mais est également présente dans les JAs du fait de son interaction avec la β -caténine. L'augmentation du recrutement de MAGI-1 aux JAs dans les cellules non polarisées suggère que, à l'instar des protéines ZOs, la localisation subcellulaire de MAGI-1 évolue au cours de la polarisation des cellules (Guillemot et al., 2008). De plus, MAGI-1 interagit avec la synaptopodine et l' α -actinine-4, deux protéines de liaison à l'actine, respectivement via ses domaines WW et PDZ-5. Ces interactions suggèrent qu'elle joue un rôle dans l'ancrage du cytosquelette d'actine aux jonctions intercellulaires (Patrie et al., 2002).

Les protéines MAGIs sont impliquées dans la transduction de signaux initiés aux jonctions intercellulaires grâce à leurs interactions avec des protéines de signalisation comme K-Ras, β -caténine et PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) (Guillemot et al., 2008).

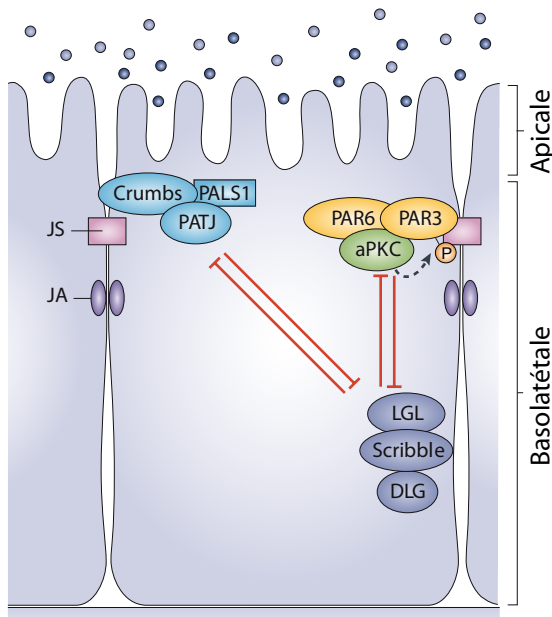


Figure 25 : Asymétrie des complexes protéiques de polarité

La formation d'un épithélium implique la coordination de l'assemblage de plusieurs complexes protéiques qui régissent la formation de la polarité apico-basale. Trois complexes majeurs ont été décrit : le complexe apical Crumbs, le complexe Par localisé aux JS et le complexe basolatéral Scribble. Le complexe Crumbs est composé de trois protéines : la protéine transmembranaire Crumbs et les adaptateurs cytoplasmiques PALS1 (Protein-Associated with Lin Seven) et PATJ (PALS1-Associated Tight Junction protein). Le complexe Par est composé de deux protéines adaptatrices, PAR6 et PAR3, et d'une kinase atypique nommée aPKC (atypical Protein Kinase C). Le complexe Scribble est composé de trois protéines : Scribble, DLG (Disc Large) et LGL (Lethal Giant Larvae). JS : Jonction Serrées et JA : Jonction Adhérente (adapté de Iden et Collard., 2008).

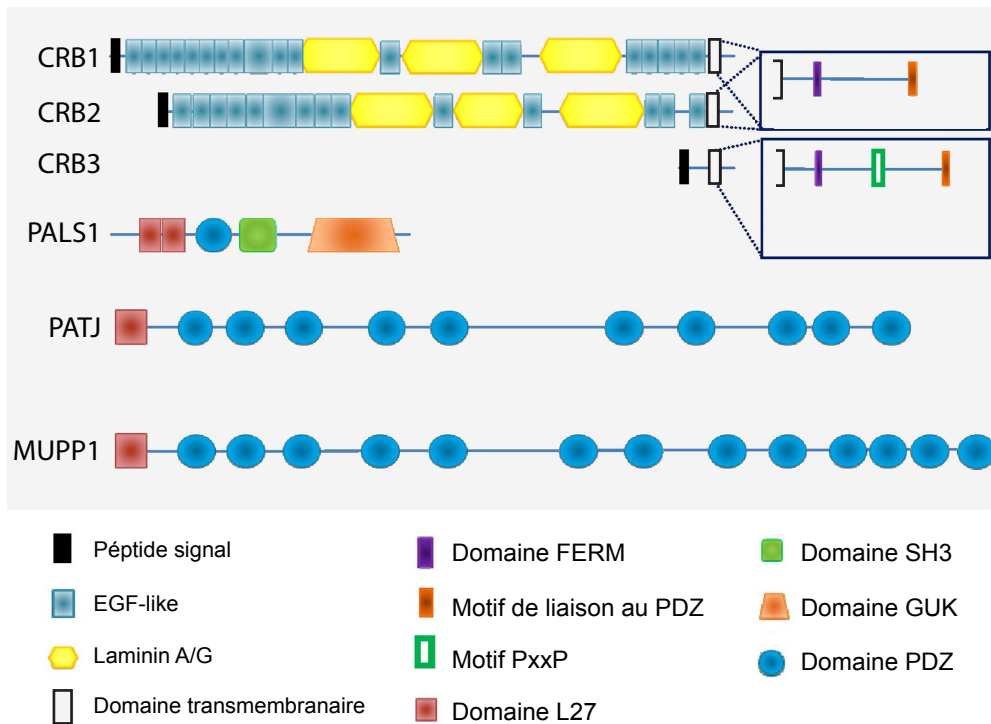


Figure 26 : Représentation schématique des protéines appartenant au complexe Crumbs

Le complexe Crumbs est composé de trois protéines : Crumbs (CRB), PALS1 (Protein-Associated with Lin Seven) et PATJ (PALS1-Associated Tight Junction protein). Trois protéines Crumbs ont été identifiées chez les mammifères : CRB1, CRB2 et CRB3. La région extracellulaire de CRB1 et CRB2 est composée de 3 domaines « Laminin A/G » et respectivement de 19 et 14 domaines « EGF-like ». CRB3 a un domaine extracellulaire très court. La région cytoplasmique des CRBs est conservée, elle contient un domaine FERM (acronyme de : band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin) et un motif de liaison au domaine PDZ. CRB3 possède un motif PxxP additionnel qui lie les domaines SH3. PALS1 est une protéine adaptatrice de la famille des MAGUKs. La protéine PALS1, en plus de posséder le module de base des protéines MAGUKs, contient deux domaines L27. Les domaines PDZ et L27 de PALS1 lient respectivement le motif de liaison au PDZ des protéines CRBs et le domaine L27 de PATJ et MUPP1. Il existe deux protéines PATJ chez les mammifères, PATJ et MUPP1 (Multi-PDZ domain Protéin 1). Le domaine L27 de PATJ et MUPP1 est suivi respectivement par 10 et 13 domaines PDZ médiant des interactions protéine-protéine (adapté de Assémat et al., 2008).

2.4.2. Asymétrie protéique médiée par les JSs

La formation d'un épithélium fonctionnel implique la présence de plusieurs complexes protéiques qui régissent la mise en place de la polarité apico-basale et la formation des complexes jonctionnels. A ce jour, trois complexes majeurs ont été décrits : le complexe apical Crumbs, le complexe Par localisé aux JSs et le complexe basolatéral Scribble (Figure 25) (Iden and Collard, 2008; St Johnston and Sanson, 2011).

2.4.2.1. Le complexe Crumbs

Le complexe Crumbs a initialement été identifié au sein de cellules épithéliales de la drosophile comme étant impliqué dans l'établissement de la polarité cellulaire (Tepass et al., 1990). Ce complexe est composé de trois protéines : une protéine transmembranaire de la famille Crumbs (CRB) et deux adaptateurs cytoplasmiques PALS1 (Protein-Associated with Lin Seven) et PATJ (PALS1-Associated Tight Junction protein) (Figure 25).

2.4.2.1.1. Crumbs

Chez les mammifères, trois protéines Crumbs ont été identifiées : CRB1, CRB2 et CRB3 (Figure 26). La région extracellulaire de CRB1 et CRB2 est de grande taille ; elle est composée de 3 domaines « Laminin A/G » et respectivement de 19 et 14 domaines « EGF-like ». A l'inverse, CRB3 a un domaine extracellulaire très court qui ne possède que des sites de N- et O-glycosylation (Figure 26) (Médina et al., 2002). Ces trois protéines ont un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique très conservée. La région cytoplasmique contient un domaine FERM (acronyme de band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin) et un motif de liaison au domaine PDZ (Figure 26). Le domaine FERM est un module d'interaction protéine-protéine qui sert généralement à la connexion entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine (Chishti et al., 1998). CRB3 possède un motif PxxP additionnel qui lie les domaines SH3 suggérant une fonction spécifique pour ce membre (Figure 26). Fogg et ses collaborateurs ont montré que la mutation du domaine FERM et du domaine de liaison au PDZ de CRB3 prévient la formation des JSs au sein des cellules épithéliales mammaires MCF10A. À l'inverse, la mutation du motif PxxP n'affecte pas la formation des JSs suggérant qu'il n'intervient pas dans ce mécanisme (Fogg et al., 2005).

2.4.2.1.2. *PALS1*

PALS1 est une protéine adaptatrice de la famille des MAGUKs qui joue le rôle d'intermédiaire entre les CRBs et *PATJ*. La protéine *PALS1*, en plus de posséder le module de base des protéines MAGUKs, contient deux domaines L27 impliqués dans des interactions protéine-protéine (Figure 26). Il a été montré que le domaine PDZ de *PALS1* interagit directement avec le motif de liaison au domaine PDZ des protéines CRBs (Makarova et al., 2003; Roh et al., 2002). De plus, le premier domaine L27 de *PALS1* lie le domaine L27 de *PATJ* (Straight et al., 2004). Au niveau fonctionnel, il a été décrit que la sous-expression de *PALS1* au sein des cellules MDCKs conduit à un défaut de formation des JSs ainsi qu'à une absence de recrutement de l'E-cadhérine à la membrane plasmique (Wang et al., 2007).

2.4.2.1.3. *PATJ*

Il existe deux protéines *PATJ* chez les mammifères, *PATJ* et *MUPP1*. Le domaine L27 de *PATJ* et *MUPP1* est suivi respectivement par 10 et 13 domaines PDZ (Figure 26). Les domaines PDZ de *PATJ* et *MUPP1* sont très homologues et peuvent interagir avec les mêmes protéines cibles incluant la claudine-1 et ZO-3. Il a été montré que la sous-expression de *PATJ* abolit le recrutement de *CRB3* et *PALS1* au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, un mécanisme requis pour la formation et le maintien des JSs (Michel et al., 2005). A l'inverse, il semblerait que *MUPP1* ne soit pas requise à l'établissement de la polarité cellulaire (Adachi et al., 2009).

2.4.2.2. Le complexe PAR

Le complexe PAR est composé de deux protéines adaptatrices, *PAR6* et *PAR3*, et d'une kinase atypique nommée aPKC (atypical Protein Kinase C) (Figure 25). Ce complexe a initialement été identifié chez le vers *C. elegans* comme étant impliqué dans la division asymétrique des cellules (Kemphues, 2000; Margolis and Borg, 2005).

2.4.2.2.1. *PAR6*

Trois protéines *PAR6* ont été identifiées chez les mammifères : *PAR6A*, *PAR6B* et *PAR6G* (Figure 27). Ces trois protéines sont de taille similaire (37 kDa) et partagent trois domaines conservés : un domaine aminoterminal PB1 (Phox/Bem 1) qui lie le domaine PB1 d'aPKC, un domaine semi-CRIB (semi-Cdc42/Rac Interaction Binding) qui lie les formes activées des GTPases Cdc42 et Rac (liés au GTP (Guanosine triphosphate)), et un domaine

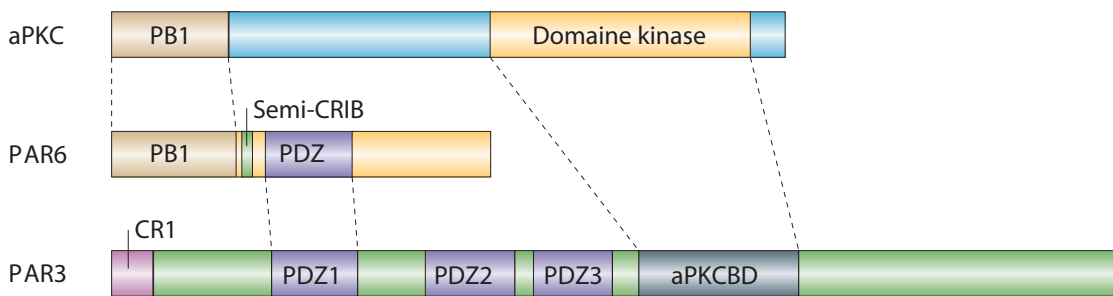


Figure 27 : Représentation schématique des protéines appartenant au complexe PAR

Le complexe PAR est constitué de trois protéines : aPKC (atypical Protein Kinase C), PAR6 (Partitioning defective 6) et PAR3. aPKC contient un domaine aminoterminal PB1 (Phox/Bem 1) qui interagit avec le domaine PB1 de PAR6. Le domaine kinase d'aPKC, en plus de phosphoryler différents substrats comme PAR3, lie le domaine aPKCBD (aPKC Binding Domain). PAR6 possède un domaine semi-CRIB (Cdc42/Rac Interaction Binding) qui recrute les GTPases Cdc42 et Rac sous leur forme active. PAR6 et PAR3 possèdent respectivement 1 et 3 domaines PDZs. Le domaine PDZ de PAR6 interagit avec le premier PDZ de PAR3. PAR3 possède également un domaine CR1 aminoterminal qui permet son oligomérisation (adapté de Macara, 2004).

PDZ carboxyterminal qui interagit avec PAR3 et CRB3 (Figure 27) (Margolis and Borg, 2005; Shin et al., 2006). Bien que ces trois protéines soient structurellement similaires, elles ne partagent pas la même localisation subcellulaire. En effet, au sein des cellules MDCKs, PAR6A localise à la fois aux JSs et dans le cytoplasme tandis que PAR6B est cytoplasmique. PAR6G est, quant à elle, majoritairement localisé aux JSs (Gao and Macara, 2004).

Les protéines PAR6 n'ayant pas d'activité enzymatique, elles vont servir de base au recrutement d'autres protéines comme les GTPases Cdc42 et Rac et la kinase aPKC. Il a notamment été montré que la surexpression de PAR6B retarde la formation des JSs au sein des cellules MDCK (Gao et al., 2002). A l'inverse, la surexpression de PAR6G n'affecte pas la cinétique de formation des JSs (Gao and Macara, 2004).

2.4.2.2.2. *PAR3*

Deux protéines PAR3 ont été identifiées chez les mammifères, PAR3A et PAR3B (Figure 27). De plus, le gène *PAR3A* code trois variants d'épissage qui possèdent tous 3 domaines PDZ dont le premier interagit avec PAR6. Tous ces variants, excepté le plus court, interagissent avec aPKC via leur domaine aPKCBD (aPKC binding domain) (Figure 27). A l'instar de PAR3A, PAR3B possède trois domaines PDZ et un domaine aPKCBD mais son mécanisme d'interaction avec PAR6 reste ambigu (Figure 27). Les protéines PAR3 possèdent également un domaine CR1 (Conserved Region 1) aminoterminal responsable de leur oligomérisation (Figure 27). Il a notamment été décrit que le second domaine PDZ de PAR3A et PAR3B interagit avec l'ensemble des phosphoinositides, un mécanisme nécessaire à leurs recrutements aux JSs (Wu et al., 2007). Aux JSs, PAR3A recrute les protéines PAR6 et aPKC pour former le complexe PAR. Plusieurs études ont montré que la sous- ou sur-expression de PAR3A conduit à la délocalisation du complexe PAR ainsi qu'à la perte de JSs (Chen and Zhang, 2013).

2.4.2.2.3. *aPKC*

Chez les mammifères, deux protéines aPKC ont été identifiées : aPKC λ et aPKC ζ . Elles ont une taille similaire et font toutes les deux parties du complexe PAR localisé aux JSs. Elles possèdent un domaine aminoterminal PB1 qui interagit avec PAR6 et un domaine catalytique en carboxyterminal qui phosphoryle plusieurs substrats incluant PAR3 (Figure 25 et 27) (Chen and Zhang, 2013; Suzuki et al., 2001).

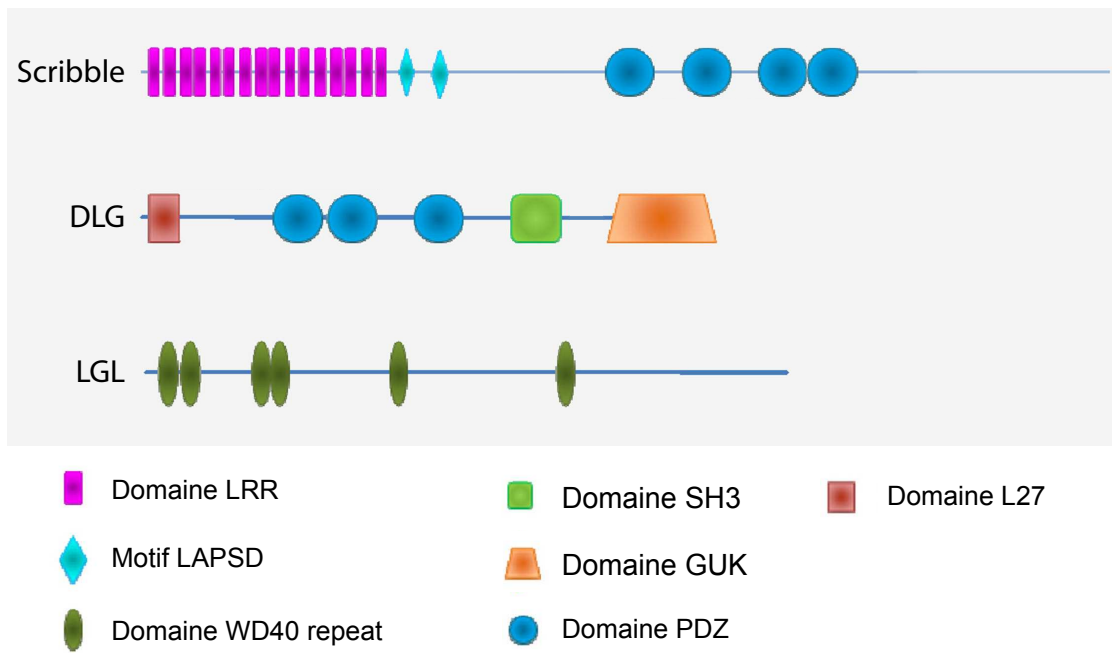


Figure 28 : Représentation schématique des protéines appartenant au complexe Scribble
 Chez les mammifères le complexe Scribble est composé de trois protéines : Scribble, DLG (Disc Large) et LGL (Lethal Giant Larvae). Scribble est une protéine cytoplasmique appartenant à la famille des protéines LAP (LRR and PDZ) qui est formée de 16 domaines LRR (Leucine Rich Repeats), de deux motifs LAPSD (LAP Specific Domain) et de quatre domaines PDZs. Les cinq protéines DLG chez les mammifères appartiennent à la superfamille des MAGUKs, elles possèdent le module de base des MAGUKs et un domaine L27 en aminoterminal. LGL a quatre paralogues chez les mammifères, elles contiennent toutes six domaines WD40 repeat (excepté pour LGL2 qui en a cinq) (adapté de Assémat et al., 2008).

2.4.2.3. Le complexe Scribble

Chez les mammifères le complexe Scribble est composé de trois protéines distinctes : Scribble, DLG (Disc Large) et LGL (Lethal Giant Larvae) (Figure 25). Ces trois protéines sont localisées à la membrane basolatérale des cellules épithéliales polarisées. (Gao and Macara, 2004).

2.4.2.3.1. Scribble

Scribble est une protéine cytoplasmique appartenant à la famille des protéines LAP (LRR and PDZ). Les membres de cette famille possèdent des caractéristiques structurales communes : 16 domaines LRR (Leucine Rich Repeats) du côté aminoterminal, suivis de deux motifs LAPSD (LAP Specific Domain) et de domaines PDZ (4 pour Scribble) (Figure 28) (Santoni et al., 2002). Il a été montré que les répétitions LRR de Scribble sont responsables de son recrutement à la membrane basolatérale. Scribble interagit directement avec l'extrémité carboxyterminale de ZO-2 via ses domaines PDZ 3 et 4. Néanmoins, la colocalisation entre Scribble et ZO-2 a lieu seulement au sein des cellules MDCK non polarisées. En effet, après polarisation, Scribble est exclusivement présente à la membrane basolatérale (Métais et al., 2005; Navarro et al., 2005). D'un point de vue fonctionnel, il a été décrit que la sous-expression de Scribble dans les cellules MDCK retarde la formation de JSs et altère la morphologie des cellules (Qin et al., 2005).

2.4.2.3.2. DLG

Il existe cinq protéines DLG chez les mammifères qui appartiennent à la superfamille des MAGUKs. Les protéines DLG, en plus d'avoir le module de base des MAGUKs, peuvent posséder un domaine L27 d'interaction protéine-protéine en aminoterminal (Figure 28). DGL5 a également un quatrième domaine PDZ et un domaine en superhélice du côté aminoterminal. DLG1 est le membre le plus proche de son orthologue de drosophile et également le plus étudié. Il a notamment été montré que DLG1 interagit avec deux suppresseurs de tumeur, APC (Adenomatous Polyposis Coli) et PTEN, suggérant un rôle de DLG1 dans la régulation de la prolifération cellulaire (Sotelo et al., 2012).

2.4.2.3.3. LGL

Quatre protéines LGL ont été identifiées chez les mammifères : LGL1 à LGL4 (Elsum et al., 2012). Elles contiennent toutes six domaines WD40 repeat, excepté pour LGL2 qui en a

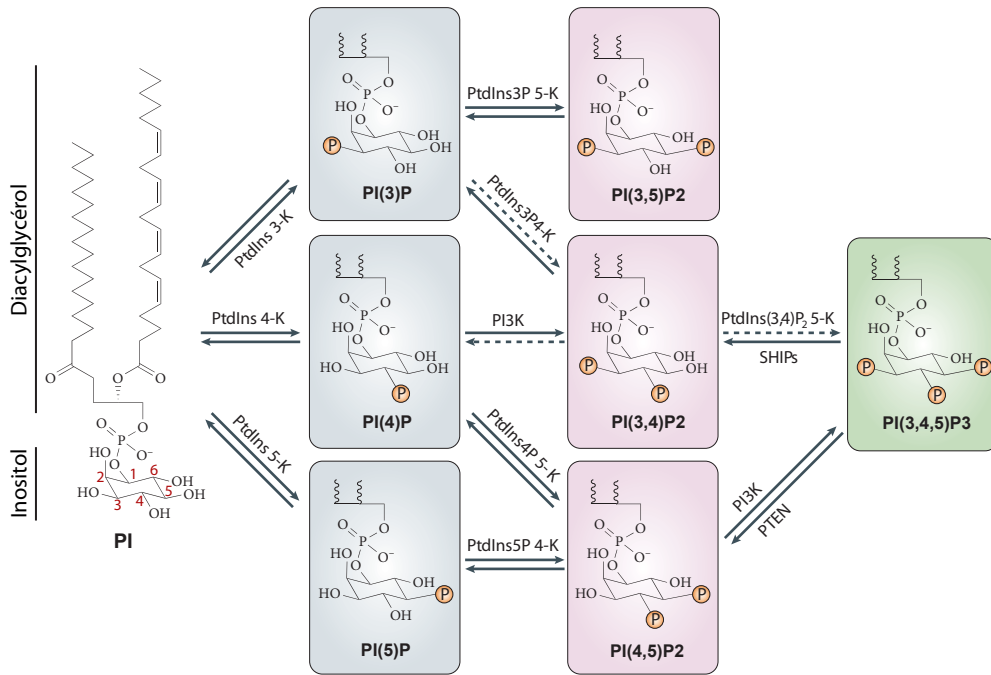


Figure 29 : Représentation schématique des phosphoinositides

Le phosphatidylinositol (PI) sert de précurseur à différents dérivés. Ce glycérophospholipide est formé d'un groupement inositol lié à un diacylglycérol par une liaison phosphodiester. Les dérivés du PI sont obtenus par phosphorylation du groupement inositol en position 3, 4 et 5 par les kinases indiquées sur le schéma. Des phosphatases régulent également l'abondance des différents PIPs (adapté de Lemmon, 2008).

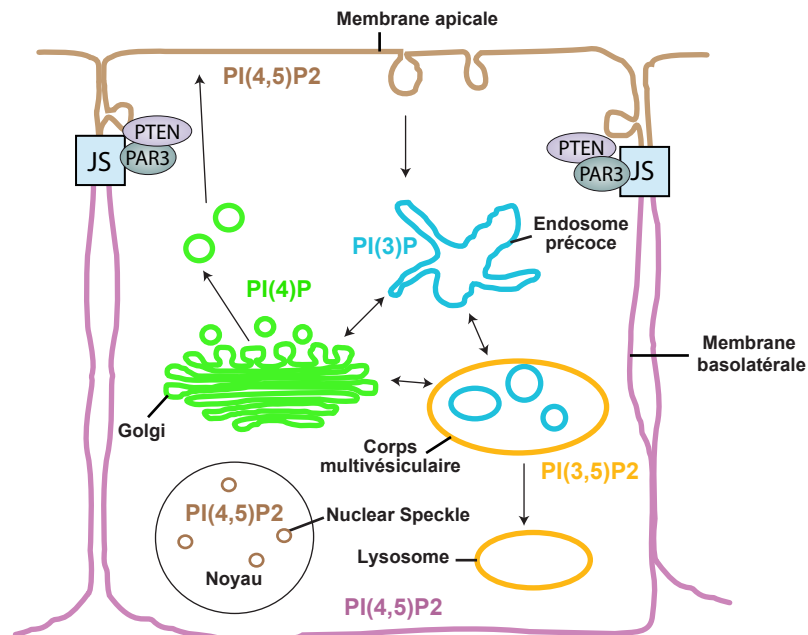


Figure 30 : Distribution subcellulaire des phosphoinositides

Les PIPs marquent les différents compartiments cellulaires et déterminent l'adressage de certaines protéines. Sur le schéma sont représentées les distributions subcellulaires des différents PIPs. La membrane apicale est enrichie en PI(4,5)P2 tandis que la membrane basolatérale contient du PI(3,4,5)P3; une assymétrie maintenue grâce aux JSs. Le Golgi, les endosomes précoces et les corps multivésiculaires sont respectivement enrichis en PI(4)P, PI(3)P et PI(3,5)P2. Le noyau contient du PI(4,5)P2 notamment au niveau des nuclear speckles.

seulement cinq (Figure 28). Ces domaines forment une plateforme servant de support au recrutement de protéines comme Scribble (Kallay et al., 2006). Les protéines LGL1 et LGL2 sont les plus étudiées et il a notamment été montré que leur sur-expression prévient la formation des complexes jonctionnels au sein des cellules MDCKs (Yamanaka et al., 2003). La phosphorylation de LGL1 et LGL2 est requise à leurs localisations basolatérales ; les formes non-phosphorylables de ces protéines étant localisées également au niveau apical (Müsch et al., 2002).

2.4.3. Asymétrie lipidique médiée par les JSs

La polarisation des cellules épithéliales conduit à la formation de deux territoires membranaires distincts séparés par les JSs. La surface apicale, en plus de servir de barrière, est spécialisée dans les échanges avec l'espace intraluminal tandis que la surface basolatérale est adaptée pour interagir avec les cellules voisines et pour échanger des molécules avec les vaisseaux sanguins. À l'image de leurs fonctions divergentes, la composition en protéines et lipides de ces deux domaines diffère. La distribution différentielle des lipides de la famille des phosphoinositides (PIP) illustre particulièrement bien l'asymétrie lipidique des différents territoires de la membrane plasmique.

2.4.3.1. Structure et fonction des phosphoinositides

Les PIPs sont des glycérophospholipides qui comptent pour ~15% des phospholipides des cellules eucaryotes. En termes de structure, le groupement inositol des PIPs est lié au diacylglycérol par une liaison phosphodiester (Figure 29). Le groupement inositol possède 5 hydroxyles libres, trois d'entre eux (P3, P4 et P5) pouvant être phosphorylés et déphosphorylés respectivement par des kinases et des phosphatases (Figure 29). Le phosphatidylinositol est la forme la plus abondante dans les cellules et sert de précurseur à la formation des différents PIPs.

Les PIPs peuvent servir de précurseurs à la formation de seconds messagers. C'est le cas du PI(4,5)P₂ qui, après catalyse par la phospholipase C, génère du DAG (Diacylglycérol) et de l'IP₃ (Inositol Triphosphate) (Smrcka et al., 2012). Ils jouent également un rôle important dans la compartimentalisation cellulaire et l'adressage de certaines protéines (Vicinanza et al., 2008). En effet, les différents compartiments cellulaires ont une composition en PIPs distincte (Figure 30). Par exemple, les endosomes précoces sont enrichis en PI(3)P, ce qui permet le recrutement de la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen 1) via son domaine FYVE

(acronyme de : Fab-1, YOTB, Vac-1, and EEA1), tandis que le TGN (Trans-Golgi Network) est enrichi en PI(4)P, ce qui permet le recrutement des protéines FAPP1/2 (Four-Phosphate-Adaptor Protein 1/2) via leurs domaines PH (Pleckstrin Homology) (Figure 30). Les PIPs permettent donc l'adressage des protéines en servant de molécules d'ancrage aux domaines liant les PIPs (Shewan et al., 2011). A ce jour, plus d'une dizaine de domaines différents sont connus pour lier les PIPs (Kutateladze, 2010). Bien que ces différents domaines ne présentent aucune conservation de leurs structures secondaires et tertiaires, il a été montré que les résidus basiques (Lys et Arg) sont instrumentaux pour la liaison aux PIPs. En effet, l'analyse de 25 complexes structuraux (Protéine en association avec un PIP) a montré que les domaines de liaison aux PIPs possèdent au moins deux résidus basiques dont une lysine ainsi qu'un résidu aromatique (dans 92% des cas une His ou une Tyr) (Rosenhouse-Dantsker and Logothetis, 2007).

2.4.3.2. Le rôle des PIPs dans la polarité cellulaire

La membrane apicale des cellules épithéliales polarisées est enrichie en PI(4,5)P₂ tandis que le PI(3,4,5)P₃ est restreint à la membrane basolatérale (Figure 30). Cette asymétrie lipidique est primordiale pour l'établissement de ces deux territoires membranaires. Il a été montré que l'ajout de PI(3,4,5)P₃ exogène sur le versant apical de la cellule la transforme en membrane basolatérale. Cela se traduit par l'exclusion des protéines apicales et le recrutement des protéines basolatérales (Gassama-Diagne et al., 2006). De manière analogue, l'ajout de PI(4,5)P₂ exogène au niveau de la membrane basolatérale transforme cette dernière lui donnant une identité apicale (Martin-Belmonte et al., 2007).

Durant la polarisation des cellules épithéliales, PAR3 est la première protéine du complexe à avoir une localisation apicale (Harris and Peifer, 2005). Il a été montré que le recrutement membranaire de PAR3 est dépendant de son interaction avec tous les PIPs via son deuxième domaine PDZ (Wu et al., 2007). Ces données n'expliquent pas la localisation apicale de PAR3 et suggèrent qu'il soit présent tout le long de la membrane plasmique. Il a alors été proposé que la localisation de PAR3 soit due à plusieurs mécanismes moléculaires : la liaison aux PIPs serait responsable de son recrutement membranaire tandis que sa localisation apicale serait médiée par des interactions protéine-protéine (Shewan et al., 2011). Une fois recruté à la membrane apicale, PAR3 recrute PTEN, une phosphatase qui va déphosphoryler le PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂ (Figure 30). Ce mécanisme permet l'accumulation du PI(4,5)P₂ à la membrane apicale, une étape nécessaire à la formation ce territoire membranaire apical. Il a d'ailleurs été montré que la sous-expression de PTEN prévient la

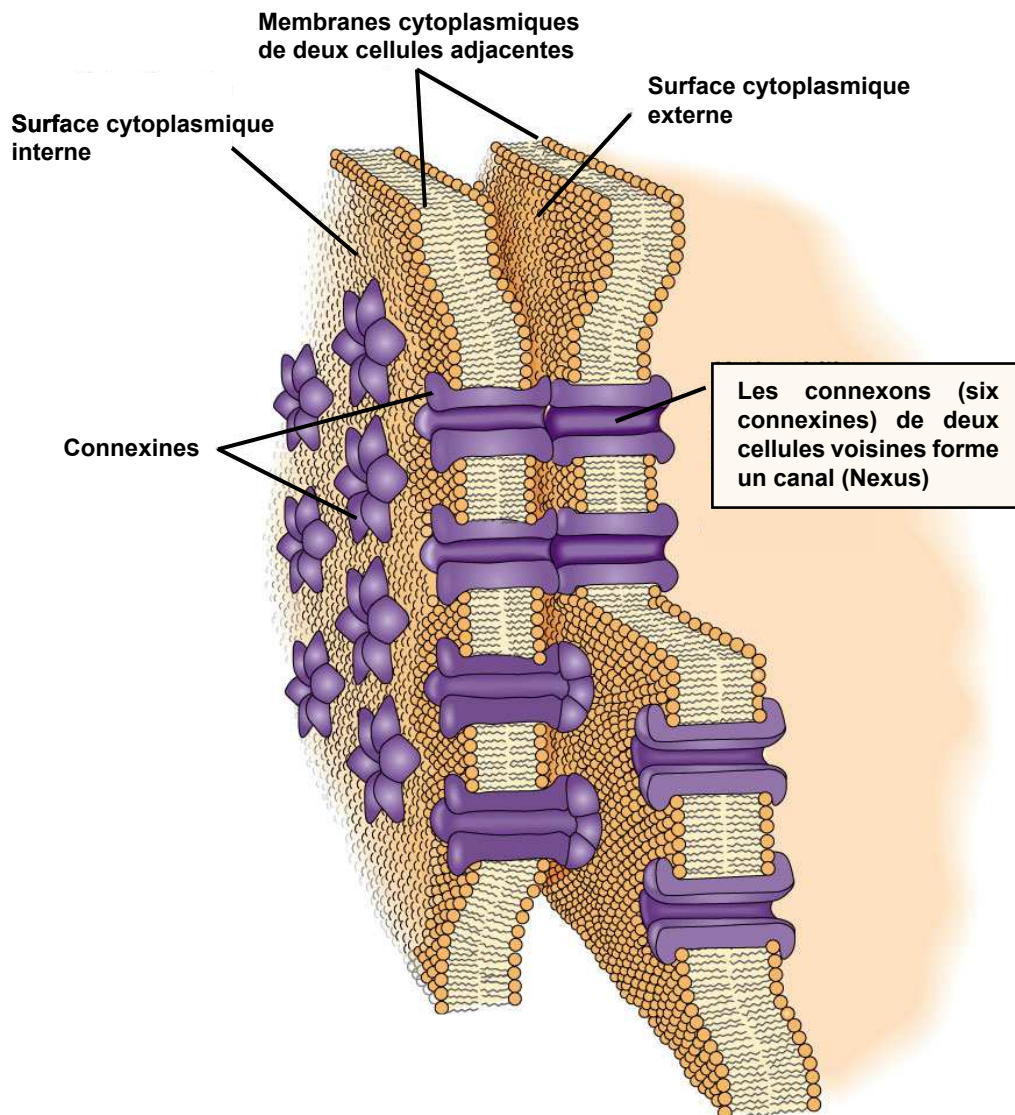


Figure 31 : Les jonctions communicantes

Représentation schématique des jonctions communicantes (JCs). L'unité de base, le connexon, est formé par l'association de 6 connexines. L'association de 2 connexons permet de créer un canal appelé Nexus. Ces canaux permettent la diffusion de seconds messagers, d'ions et d'autres molécules de taille inférieure à 1 kDa entre les cytoplasmes de deux cellules voisines (adapté de Pearson education, inc., 2012).

formation du domaine apical (Martin-Belmonte et al., 2007). Dans la cellule polarisée, le complexe PAR et PTEN sont présent aux JSs et participent au maintien de l'asymétrie des PIPs (Figure 30) (Tepass, 2012).

2.5. LES JONCTIONS COMMUNICANTES

Les JCs sont des canaux intercellulaires qui permettent la diffusion de seconds messagers, d'ions et d'autres molécules de taille inférieure à 1 kDa entre les cytoplasmes de deux cellules voisines. Les JCs sont donc nécessaires à diverses fonctions comme la transduction de signaux électriques ou chimiques. Il a été montré que la modulation de ces fonctions peut se faire en régulant l'ouverture et la fermeture de ces canaux (Matsuuchi and Naus, 2013). Les protéines transmembranaires formant ces canaux intercellulaires font partie de la famille des connexines qui compte plus de 20 membres à ce jour. Six connexines s'oligomérisent pour former un connexon et les connexons de deux cellules adjacentes s'associent pour former un canal appelé Nexus (Figure 31). ZO-1 est un partenaire protéique des JCs qui a pour rôle de limiter la taille des JCs (Hunter et al., 2005). Les JCs, à l'instar des autres jonctions intercellulaires, sont ancrées au cytosquelette (Giepmans, 2006).

2.6. PATHOLOGIES LIEES AUX COMPLEXES JONCTIONNELS

De nombreuses maladies génétiques sont dues à l'altération des gènes codant pour les composants des complexes jonctionnels. La connexine-32 est impliquée dans la forme liée à l'X du syndrome de Charcot-Marie-Tooth (OMMIM 302800) tandis que la connexine-31 est liée à une neuropathie périphérique associée à une surdité (Scott and Kelsell, 2011). La mutation de la plakophiline-1 est associée à la dysplasie ectodermique récessive (Ersoy-Evans et al., 2006). La mutation des claudines 16 et 19 est liée à une hypomagnésémie, une hypercalciurie et à une néphrocalcinose due à un défaut d'absorption du calcium et du magnésium. L'altération des protéines formant les jonctions serrées est également fréquemment retrouvée dans les cancers (Latorre et al., 2006; Martin et al., 2011). C'est le cas de l'occludine, des claudines (-1, -4, -6 et -7), de ZO-1 et de PAR3 dont l'expression est diminuée dans les cancers du sein. A l'inverse, PAR6B et JAM-A sont surexprimées dans certains cancers du sein, où ils vont promouvoir respectivement la prolifération et l'invasion (Brennan et al., 2010).

2.6.1. Anomalie des JAs

La β -caténine, en connectant les cadhérines au cytosquelette d'actine, est nécessaire à la formation et au maintien des JAs (Harris and Tepass, 2010). A l'inverse, dans la voie Wingless (Wnt)/ β -caténine, la β -caténine agit comme un facteur de transcription en s'associant aux facteurs LEF/TCF (Lymphoid Enhancing Factor/T-Cell Factor) dans le noyau, où elle régule l'expression de gènes cibles incluant des métalloprotéinases matricielles et des cytokines (Kim et al., 2013; Polette et al., 2007). Un équilibre entre les fonctions d'adhésion et de transcription de la β -caténine est primordial pour le maintien de l'homéostasie des épithélia. En effet, la rupture de cet état équilibre en faveur de la fonction de transcription est impliquée dans la carcinogénèse (Burgess et al., 2011). Plusieurs mécanismes moléculaires favorisent l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Il a notamment été montré que des mutations perte-de-fonction d'APC, une protéine qui participe à la dégradation de la β -caténine, sont retrouvées dans 85% des cancers colorectaux sporadiques (Cottrell et al., 1992). La perte d'expression de l'E-cadhérine conduit également à une augmentation du pool de β -caténines conduisant à son transfert dans le noyau (Orsulic et al., 1999). Enfin, l'analyse génétique exhaustive des tumeurs a révélé que des membres de la voie Wnt/ β -caténine sont mutés dans 90% des cancers colorectaux. Ces mutations conduisent à la stabilisation puis à la translocation de la β -caténine dans le noyau, où elle va permettre l'expression de ces gènes cibles impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire (Brembeck et al., 2006).

2.6.2. Anomalie des JSs

Les JSs, en séparant la membrane cellulaire en deux compartiments, permet la ségrégation des facteurs de croissance comme l'héréguline- α dans la région apicale tandis que leurs récepteurs (erbB3-4) vont exclusivement être présents dans la région basolatérale, ce qui prévient leur activation (Vermeer et al., 2003). Après une blessure ou la mort d'une ou plusieurs cellules au sein d'un épithélium, la perte des JSs des cellules saines adjacentes permet aux facteurs de croissances de lier leurs récepteurs, ce qui induit une prolifération et migration cellulaire afin de réparer la blessure. Basé sur ce modèle, il est facile de concevoir que la perte des JSs due aux mutations des protéines structurales et des régulateurs des JSs, peut favoriser la progression des cellules épithéliales cancéreuses (Latorre et al., 2006; Soler et al., 1999).

L'identification et la caractérisation des différents composants des JSs a permis de comprendre l'impact de la perte des JSs dans la formation et la progression des carcinomes au niveau moléculaire. Par exemple il a été montré que ZO-1 prévient la prolifération cellulaire

en séquestrant le facteur de transcription ZONAB tandis que la perte des JSs conduit à la translocation de ZONAB dans le noyau, où il va avoir un effet prolifératif en interagissant avec la protéine CDK4 (Cell Division Kinase 4) (Balda et al., 2003). Concernant la progression des carcinomes, il est accepté que la perte des JSs, en stimulant la migration et l'invasion des cellules tumorales, promeut la formation et la dissémination des métastases (Jin et al., 2009; Martin and Jiang, 2001; Martin et al., 2011). Plusieurs études démontrent d'ailleurs que les protéines des JSs sont souvent sous-exprimées dans les carcinomes et que leurs niveaux d'expression sont corrélés au degré de différenciation des cellules tumorales. Par exemple, l'expression de ZO-1 dans les carcinomes canaux infiltrants du sein est réduite de 42%, 83% et 93% respectivement dans les tumeurs fortement, modérément et faiblement différenciées (Hoover et al., 1998; Quan and Lu, 2003).

Il a été rapporté que PAR3 est sous-exprimé dans les cancers du sein, ce qui est de mauvais pronostic. La perte de PAR3 est associée chez la souris à une augmentation de l'incidence tumorale, et promeut la formation et la dissémination des métastases. Elle induit notamment l'activation de la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), ce qui conduit à la dégradation de la matrice grâce à la sécrétion de la métalloprotéinase matricielle MMP9. La sous-expression de PAR3 conduit également à l'activation de la GTPase Rac1 qui, en agissant sur le remodelage du cytosquelette, va avoir un effet pro-migratoire (McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 1 : LE ROLE DE TRAF4 DANS LES JONCTIONS SERRÉES

1.1. INTRODUCTION

Les cellules épithéliales polarisées forment une barrière sélective régulant le passage des molécules à travers l'espace paracellulaire. Elles possèdent deux domaines membranaires, apical et basolatéral, dont les compositions en lipides et protéines diffèrent. Les jonctions serrées (JS), en empêchant ces protéines et lipides de diffuser librement d'un compartiment à l'autre, contribuent au maintien de la polarité cellulaire (Brennan et al., 2010; Furuse, 2010). Des études récentes ont mis en évidence l'importance des jonctions serrées sur le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarité cellulaire, trois processus altérés dans les carcinomes (Brennan et al., 2010; Forster, 2008). TRAF4, étant surexprimée dans les tumeurs solides et localisée au sein des JS, nous avons émis l'hypothèse que cette protéine pourrait avoir un effet protumoral en dérégulant ces structures jonctionnelles. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord caractérisé le mécanisme moléculaire responsable du recrutement de TRAF4 aux JS pour ensuite y appréhender son rôle. Cette étude a donné lieu à la soumission d'un article (Rousseau et al., en révision, § 1.2). Des expériences complémentaires à cet article ont été réalisées et sont décrites au paragraphe § 1.3.

J'ai par ailleurs étudié si la liaison aux PIPs était conservée dans la famille des protéines TRAFs ; ces résultats sont décrits à la fin de ce chapitre (§ 1.4).

1.2. ARTICLE : TRAF4 is a novel phosphoinositides binding protein modulating tight junctions and favoring cell migration

Résumé de l'article:

TRAF4 (Tumor necrosis factor (TNF) Receptor-Associated Factor 4) est un gène fréquemment surexprimé dans les carcinomes suggérant qu'il y joue un rôle. Tandis que la protéine TRAF4 est majoritairement localisée dans les jonctions serrées (JS) des cellules épithéliales mammaires (CEM) normales, elle s'accumule dans le cytoplasme des CEM malignes. Le mécanisme responsable du recrutement de TRAF4 ainsi que de sa fonction dans les JS reste inconnu à ce jour. Dans cette étude, nous montrons que TRAF4 possède un nouveau domaine liant les phosphoinositides (PIP) et que ce dernier est requis pour son recrutement aux JS. Des analyses moléculaires et structurales ont montré que le domaine TRAF de TRAF4 forme un homotrimère qui peut lier jusqu'à trois molécules de lipides en

utilisant des résidus basiques présents à sa surface. Des études cellulaires indiquent que TRAF4 régule négativement les JS et augmente la migration cellulaire. Ces deux fonctions sont dépendantes de sa capacité à lier les PIPs. Nos résultats suggèrent que la surexpression de TRAF4 pourrait contribuer à la progression des cancers du sein en déstabilisant les JS et en favorisant la migration cellulaire.

TRAF4 Is a Novel Phosphoinositide-Binding Protein Modulating Tight Junctions and Favoring Cell Migration

Adrien Rousseau¹, Alastair G. McEwen¹, Pierre Poussin-Courmontagne¹, Didier Rognan², Yves Nominé³, Marie-Christine Rio¹, Catherine Tomasetto¹ and Fabien Alpy¹

1-Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7104, Centre National de la Recherche Scientifique/ U964 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/ Université de Strasbourg, BP 10142, 67404 Illkirch, C.U. de Strasbourg, France

2-Laboratory of Therapeutic Innovation, UMR 7200 Université de Strasbourg/CNRS, Medalis Drug Discovery Center, F-67400 Illkirch, France

3-Group Oncoproteins, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, UMR 7242 Université de Strasbourg / CNRS, BP 10413, 67400 Illkirch, France

ABSTRACT

TRAF4 (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4) is frequently overexpressed in carcinomas suggesting a specific role in cancer. While TRAF4 protein is predominantly found at tight junctions (TJ) in normal mammary epithelial cells (MEC), it accumulates in the cytoplasm of malignant MEC. How TRAF4 is recruited and functions at TJ is unclear. Here we show that TRAF4 possesses a novel phosphoinositide (PIP)-binding domain crucial for its recruitment to TJ. Molecular and structural analyses revealed that the TRAF domain of TRAF4 exists as a trimer which binds up to 3 lipids using basic residues exposed at its surface. Cellular studies indicated that TRAF4 acts a negative regulator of TJ and increases cell migration. These functions are dependent from its ability to interact with PIPs. Our results suggest that TRAF4 overexpression might contribute to breast cancer progression by destabilizing TJ and favoring cell migration.

INTRODUCTION

Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4) was originally identified as a gene overexpressed in breast carcinoma [1,2]. Interestingly, TRAF4 overexpression is not restricted to breast cancer and extends to a variety of different carcinomas [3,4]. TRAF4 belongs to the TRAF family that is composed of 7 members in human [5,6]. Among the seven TRAF family members, TRAF4 is one of the most conserved during evolution [7]. Indeed, a TRAF4 ortholog has already been identified in snail fur (*Hydractinia achinata*), a cnidaria [8]. Moreover, the unique TRAF protein in the worm shares a higher homology with human TRAF4 than with other human TRAF proteins [9]. Furthermore, one of the three fly TRAF proteins, dTRAF1, shares the highest homology with human TRAF4 [9,10]. In line with an essential and conserved biological function of TRAF4, flies that carry null-alleles of TRAF4 have many developmental abnormalities leading to lethality before the pupal stage [11,12]. Likewise, TRAF4 deficiency in mice was lethal at the embryonic stage in approximately one third of the homozygote mutants [13]. All surviving animals exhibited multiple defects including trachea alteration, and various non-fully penetrant phenotypes involving the axial skeleton and the central nervous system [13,14]. Surviving adult TRAF4-deficient mice also exhibited ataxia, associated to myelination alteration [15]. Together, these various genetic models suggest that TRAF4 has an essential function conserved in most, if not all, pluricellular animals.

TRAF4 encodes a 53 kDa adaptor protein with multiple subcellular localizations. Indeed, cytoplasmic, nuclear and membrane localizations have been described in the literature [1,16,17]. Of interest, the subcellular localization of TRAF4 is altered in cancers. While in normal breast tissue the protein is predominantly localized in the plasma membrane [18], more precisely in tight junctions (TJ) present at the apical membrane of polarized epithelial cells [19], in cancer samples the protein can be localized either in the cytoplasm and/or in the nucleus of cancer epithelial cells [1,3,16]. Until recently the implication of these multiple localizations were unclear. A recent report shed light into the significance of the nuclear localization of TRAF4 in breast cancers [20]. This study indicated that TRAF4 nuclear localization in breast tumors was associated with poor survival in breast cancer patients after adjuvant therapy. Moreover, this report showed that TRAF4 promotes p53 protein destabilization in the nucleus of cancer cells and contributes to resistance to cytotoxic stress in cancer cells [20]. To date, the function of TRAF4 in TJ and in the cytoplasm remains unclear. Many lines of evidence indicate that TRAF4 functions in the organization and patterning of

the cell cortex [12,21]. TRAF4 is required for the polarized trafficking of NADPH oxidase to filopodia in migrating endothelial cells [22,23]. In the fly, TRAF4 can interact with proteins involved in asymmetric division [21] and functions in the establishment of the junctional architecture of mesodermal cells [12]. In the mouse nervous system, TRAF4 deficiency altered the formation and/or stability of axoglial and interglial junctions [15]. Collectively, all these data indicate that TRAF4 might exert a function related to cell junctions and polarity [24]. However, TRAF4 appears to function in a cell specific manner making its functional characterization difficult. While TRAF4 is ubiquitously expressed at a basal level, there exists a spatial and temporal upregulation of TRAF4 gene expression during specific developmental stages [25,26]. For example, during gastrulation in frogs, mRNA encoding TRAF4 and one of its interacting partners SMURF1 become enriched in the neural plate and neural crest cells. In these cells, both TRAF4 and SMURF1 are essential for proper neural crest development and neural plate morphogenesis [25]. In human mammary epithelial cells (MEC), the role of TRAF4 in TJ remains unclear. However we showed previously that this localization was a highly dynamic process supporting the notion that TRAF4 might relay signals from the cell membrane to the cytoplasm, and possibly the nucleus [17]. Given the recently established role of nuclear TRAF4 in the destabilization of the tumor suppressor p53 protein [20], it is now necessary to understand how TRAF4 subcellular localization in the mammary epithelium is regulated under physiopathological conditions. To address this, we explored the molecular determinants involved in its subcellular localization at the plasma membrane and in TJ of MEC. We also directly addressed the function of TRAF4 in the formation and maintenance of TJ in polarized cells. Finally, having established that TRAF4 is a negative regulator of TJ in breast cells, we have explored its contribution to cell motility.

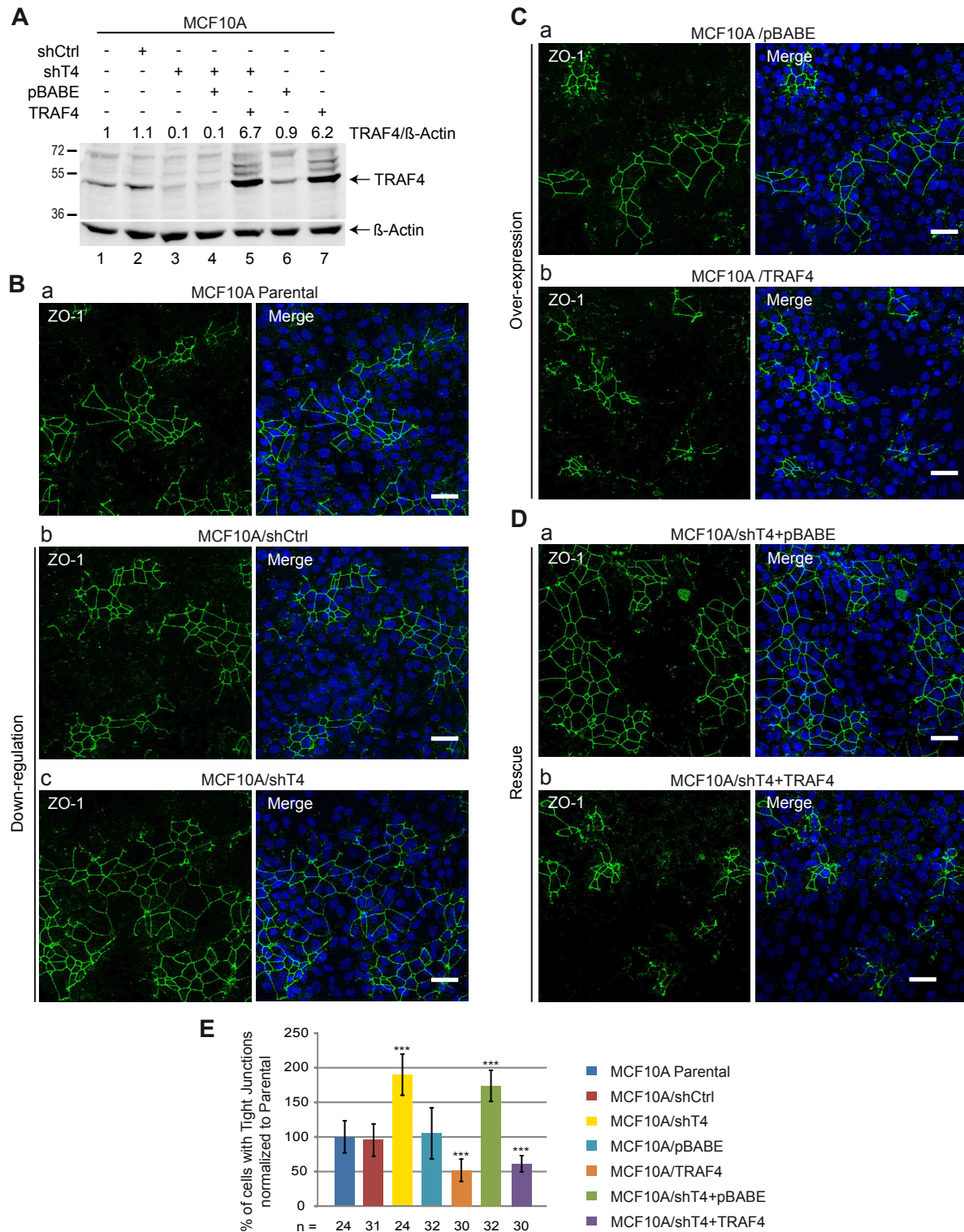


Figure 1: TRAF4 protein level modulates tight junctions in confluent MCF10A monolayers

A. Western-blot analysis of TRAF4 in parental and in established MCF10A cell lines. To knock-down TRAF4, parental MCF10A cells (lane 1) were transduced with a shRNA targeting TRAF4 (MCF10A/shT4, lanes 3-5); a non specific shRNA was used as control (MCF10A/shCtrl, lane 2). To restore TRAF4 expression, MCF10A/shT4 cells were transduced with a shT4-insensitive vector encoding TRAF4 (MCF10A/shT4+TRAF4, lane 5); the control cell line (MCF10A/shT4+pBABE, lane 4) was transduced with the empty vector. A gain of function and a control cell line were generated with a TRAF4 expression plasmid (MCF10A/TRAF4, lane 7) or the empty vector (MCF10A/pBABE, lane 6), respectively. TRAF4 expression levels normalized to actin are indicated.

B-D. The presence of TJ was estimated by ZO-1 staining in the different cell lines of TRAF4 loss-of function (B), gain of function (C) and rescue (D) experiments. Left panels are representative confocal sections of ZO-1 staining (green) and right panels are merges with Hoechst staining (blue). Scale bar: 20 μ m.

E. TJ quantification. Score representing the number of cells with a continuous ZO-1 staining, normalized to parental MCF10A cells (percentage). The number of microscopic fields used for the quantification is indicated at the bottom of the histogram.

TRAF4 knock-down increased the number of cells with TJ whereas TRAF4 overexpression had the opposite effect.

RESULTS

TRAF4 is a negative regulator of tight junctions

MEC form ducts and acini with an established apicobasal polarity [27]. Adhesion and tight junction formation are instrumental to the establishment of this polarity [28,29]. In polarized MEC, TRAF4 is mainly found in TJ [17] suggesting a specific function of the protein in the formation and/or dissociation of TJ. To address the function of TRAF4 in TJ, we used the human immortalized normal MEC model, MCF10A [30]. Monolayers of MCF10A provide a good system to study TJ because at confluence they form clusters of polarized cells exhibiting TJ and they can be used to measure the contribution of a given gene in the formation and/or stabilization of TJ [31,32]. In practice, quantification of cell clusters exhibiting a continuous membrane associated ZO-1 staining indicates the extent of cells making TJ. This cell system has been successfully used to demonstrate TJ alterations following long-term TGF- β treatment [31]. To study the role of TRAF4 on TJ, we downregulated its expression in MCF10A cells using a shRNA strategy (Figure 1A). In cells stably expressing a shRNA specific for TRAF4 (MCF10A/shT4), TRAF4 expression was reduced to less than 10% compared to parental MCF10A cells and to cells expressing a control shRNA (MCF10A/shCtrl). Next, MCF10A/shT4, MCF10A/shCtrl and MCF10A parental cells were plated at the same density and 48 hours later, cell monolayers were fixed and stained for the TJ marker ZO-1 (Figure 1B). The relative number of cells harboring TJ was then measured. Cells harboring TJ were defined as cells with an enclosed ring of contiguous apical ZO-1 staining. Compared to parental MCF10A and to MCF10A/shCtrl cell lines, TRAF4 silencing was associated with a twofold increase in cells harboring TJ (Figure 1B, E).

To support the role of TRAF4 expression on TJ, we performed the complementary experiment in which TRAF4 was overexpressed in MCF10A cells. In cells stably expressing the protein (MCF10A/TRAF4), TRAF4 was increased over 6 fold as compared to parental MCF10A cells and to cells transduced with the empty vector (MCF10A/pBABE). The presence of TJ was assayed in these different cell lines as described above; compared to parental MCF10A cells and to MCF10A/pBABE control cells, TRAF4 overexpression resulted in a twofold decrease in TJ-harboring cells (Figure 1C, E). To further substantiate the role of TRAF4 on TJ, we restored TRAF4 expression in MCF10A/shT4 cells (MCF10A/shT4+TRAF4) using an expression system insensitive to shT4-mediated down regulation. TRAF4 expression was efficiently restored as the protein was expressed over six times higher than in parental cells (Figure 1A). MCF10A/shT4 cells transduced with the

empty vector (pBABE) served as a negative control (MCF10A/shT4+pBABE). These cell lines were then assayed for the formation of TJ using ZO-1 staining on confluent monolayers. Similarly to TRAF4 silenced MCF10A cells, in the absence of rescue (MCF10A/shT4+pBABE), the number of TJ was two times higher than in parental and non-silenced cells (Figure 1D, E). Remarkably, compared to parental MCF10A cells, rescued cells (MCF10A/shT4+TRAF4) had a twofold decrease in TJ similar to TRAF4 overexpressing cells (MCF10A/TRAF4) (Figure 1D, E). Thus restoring TRAF4 expression rescues the TJ phenotype induced by its silencing.

To study whether TRAF4 might regulate the expression level of proteins involved in TJs and adherens junctions, levels of ZO-1, E-cadherin and beta-catenin were measured in the different cell lines by immunoblotting. Modulating TRAF4 expression did not modify significantly ZO-1, E-cadherin and beta-catenin protein levels (Figure S1A). In addition, immunofluorescence of endogenous beta-catenin showed that TRAF4 does not affect the membrane-bound beta-catenin pool suggesting that TRAF4 specifically targets TJ (Figure S1B-D).

To know whether TRAF4 acts on TJ assembly, we next used the “calcium switch” model in MCF7 cells. This assay involves reversible disruption of epithelial junctions by extracellular calcium removal followed by a rapid reassembly triggered by calcium repletion [33]. MCF7 cells form well-defined TJ in tissue culture conditions [34] and endogenous TRAF4 is predominantly localized at TJ [17]. To address the role of TRAF4 on TJ assembly, we generated a TRAF4-silenced cell line in MCF7 cells using a shRNA strategy. Compared with parental (MCF7) and control (MCF7/shCtrl) cells, TRAF4 silencing (MCF7/shT4) resulted in a 90% reduction in protein levels (Figure S2A). We next examined if TRAF4 silencing affected reassembly of MCF7 TJ using the “calcium switch” assay. TRAF4 down-regulation accelerated the reassembly of TJ, as shown by the appearance of continuous junctional labeling of ZO-1 (Figure S2B). After 3, 5 and 7 hours of calcium repletion, TRAF4-silenced cells showed more formed TJ than parental and control cells (Figure S2B, C). After 20 hours of calcium repletion all cells recovered TJ (Figure S2B). Moreover, reintroduction of TRAF4 in silenced cells rescued the phenotype of TRAF4 depleted cells, since cells expressing a sh-insensitive TRAF4 construct (MCF7/shT4+TRAF4) reassembled TJ in a kinetic comparable to that of parental MCF7 cells (Figure S2B, C).

Thus, in the normal MEC MCF10A, TRAF4 negatively regulates TJ. Moreover, in the malignant MEC MCF7 forming well-defined TJ, TRAF4 delays the reassembly of TJ.

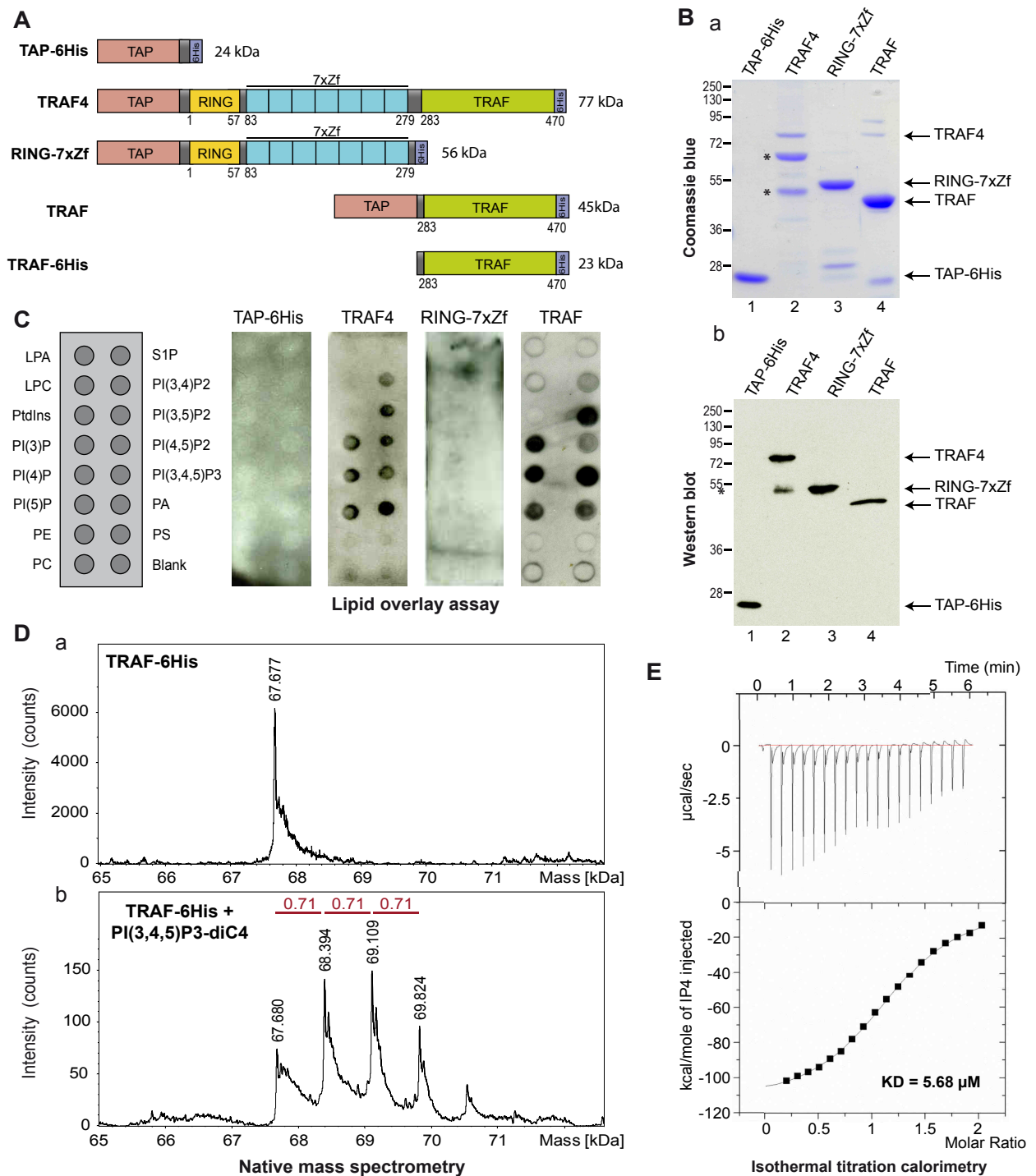


Figure 2: TRAF4 binds PIPs through its TRAF domain

A. Schematic representation of the recombinant proteins used in lipid overlay assays. TAP and 6His tags were used for the purification. RING, Zf and TRAF are conserved structural domains present in the TRAF4 protein.

B. Coomassie blue staining (a) and Western blot analysis (b) of purified recombinant proteins. TRAF4 degradation products are indicated by asterisks.

C. Lipid-overlay assay. Left: schematic view of a PIP-strip membrane. LPA: lysophosphatidic acid; S1P: Sphingosine-1-phosphate; LPC: Lysophosphocholine; PI: Phosphatidylinositol; PI(3)P: PI-(3)-phosphate; PI(4)P: PI-(4)-phosphate; PI(5)P: PI-(5)-phosphate; PI(3,4)P2: PI-(3,4)-bisphosphate; PI(3,5)P2: PI-(3,5)-bisphosphate; PI(4,5)P2: PI-(4,5)-bisphosphate; PI(3,4,5)P3: PI-(3,4,5)-trisphosphate; PA: Phosphatidic acid; PE: Phosphatidylethanolamine; PS: Phosphatidylserine; PC: Phosphatidylcholine. The TAP-6His recombinant protein served as a negative control. Immunodetection of bound proteins was performed using a TAP identifying antibody.

D. The TRAF domain of TRAF4 binds PIP in solution. Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry deconvoluted spectra of the TRAF domain of TRAF4 in the absence (a) and in the presence (b) of PI(3,4,5)P3-diC4. In isolation and in the absence of lipid, the TRAF domain is a trimer (a). In the presence of PIP, three additional peaks corresponding to one to three bound lipids are detected (b). Theoretical masses of the TRAF trimer and PI(3,4,5)P3-diC4 are 67.678 kDa and 0.714 kDa, respectively.

E. Affinity of TRAF4 for PIP was measured by Isothermal titration calorimetry. Titration was performed with 16 μM TRAF-6His recombinant protein, to which 500 μM of inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate were added incrementally.

Collectively these data indicate that TRAF4 modulates TJ by delaying their formation and/or by favoring the dissociation of TJ.

TRAF4 is a novel phosphoinositide binding protein

In MEC, TRAF4 was shown to be present at the plasma membrane in a highly dynamic manner. Indeed Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments showed that the protein has a short residency time in the membrane. These experiments supported the notion that TRAF4 is shuttling between the plasma membrane, the cytoplasm and possibly the nucleus [17]. In addition, in flies, TRAF4 was shown to interact with proteins from TJ including PAR3 (Partitioning-defective 3) [21], making this protein a good candidate to explain TRAF4 addressing in junctions. However, in human cells, we failed to find a direct interaction between TRAF4 and PAR3 (F.A. data not shown) suggesting that another mechanism is responsible for TRAF4 membrane targeting. Of interest, it was shown that adaptor proteins from TJ, including PAR3 and ZO-1, were localized to cell membrane via an interaction with membrane lipids belonging to the phosphoinositide (PIPs) family [35,36]. We thus reasoned that TRAF4 might be addressed to the cell membrane and possibly TJ by using a similar mechanism. To address the potential TRAF4 interaction with membrane lipids, we used an *in vitro* lipid binding assay called lipid overlay assay [37]. To this aim, recombinant TRAF4 protein was produced and purified from *E. Coli*. Recombinant TRAF4 was flanked by two tags, a Tandem Affinity Purification (TAP)-tag [38] and a 6His-tag at the amino- and carboxy-terminal parts, respectively (Figure 2A). The efficiency of the purification was probed by Coomassie blue staining (Figure 2Ba) and Western blot (Figure 2Bb). Recombinant proteins were detected using an antibody recognizing the immunoglobulin-binding domain of protein-A from the TAP tag. We next tested the direct interaction of recombinant TRAF4 with lipids immobilized on membranes by lipid overlay assay (Figure 2C). While the control TAP-6His protein did not bind to any lipid, recombinant TRAF4 did bind to all PIPs and phosphatidic acid (PA). Interestingly, TRAF4 did not bind to other negatively charged lipids like phosphatidylserine and phosphatidylinositol (Figure 2C). Thus lipid overlay assay showed that TRAF4 binds PIPs *in vitro*.

TRAF4 is a modular protein composed of a RING domain, seven TRAF-type zinc-fingers and a TRAF domain (Figure 2A) [24]. To narrow-down the domain involved in this binding, we produced two deletion mutants of TRAF4: one lacking the TRAF domain and thus only composed of the RING domain and of the seven zinc fingers (RING-7xZf); the second one lacking all domains except the TRAF domain (TRAF) (Figure 2A). While the RING-7xZf

part of the protein showed no detectable binding to lipids, the TRAF domain showed a lipid-binding profile similar to the wild type TRAF4 protein (Figure 2C). This result shows that the TRAF domain of TRAF4 is responsible for the interaction of the protein with PIPs.

We next used a different method called native mass spectrometry to show the binding of the TRAF domain with PIPs. This method is sensitive enough to measure the molecular weight of lipid-protein complexes and address their stoichiometry [39]. In this assay, the recombinant TRAF domain in isolation (Figure 2A) was incubated with a soluble form of PI(3,4,5)P3 and analyzed by Electrospray Ionisation Time of Flight (ESI-TOF) mass spectrometry (Figure 2D). In absence of lipid, the TRAF domain fused to a 6His tag (TRAF-6His) was detected as a single peak of 67.7 kDa (Figure 2Da). Consistent with the trimerization property of the TRAF proteins via the TRAF domain [40], this peak represents three times the size of the monomeric TRAF domain (22.6 kDa). When TRAF-6His was incubated with PI(3,4,5)P3 prior to the ESI-TOF analysis, three additional major peaks were detected (Figure 2Db). Interestingly, each new peak has a size shift of ~710 Da which corresponds to the theoretical mass of one PI(3,4,5)P3 molecule. This indicates that the TRAF domain as a trimer can directly interact with one to three PI(3,4,5)P3 molecules (Figure 2D). Altogether, this shows that the recombinant TRAF domain of TRAF4 is well folded, and trimerizes in solution similarly to the TRAF domains of TRAF2 and TRAF6 [40,41]. In addition, it can bind up to three PI(3,4,5)P3 molecules thus suggesting that each TRAF monomer has a binding site for one PIP molecule.

To gain insight about the affinity between the TRAF domain and PIPs, we performed isothermal titration calorimetry (ITC) experiments [42]. ITC was done with 16 μ M TRAF-6His to which 500 μ M inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (IP4) were added incrementally (Figure 2E). In these conditions the TRAF domain is a homotrimer and the calculated numbers of IP4 binding sites indicated a 3:1 stoichiometry of IP4 to TRAF-6His trimer. The lipid binding affinity was then calculated. The dissociation constant (KD) for one lipid-binding site of the TRAF domain and one IP4 molecule was 5.68 μ M. This magnitude is consistent with KD found for other PIP interacting proteins from TJ including PAR3 (KD = 8 μ M), ZO-1 (KD = 1.3 μ M) and ZO-2 (KD = 2.6 μ M) [35,36].

Altogether, these data show that TRAF4 has the ability to bind to PIPs and PA. The protein exists as a homotrimer that binds up to three lipid molecules. This interaction is mediated by the TRAF domain and the affinity of binding is in the micromolar range which is consistent with the KD of other PIP-binding domains [36,43,44].

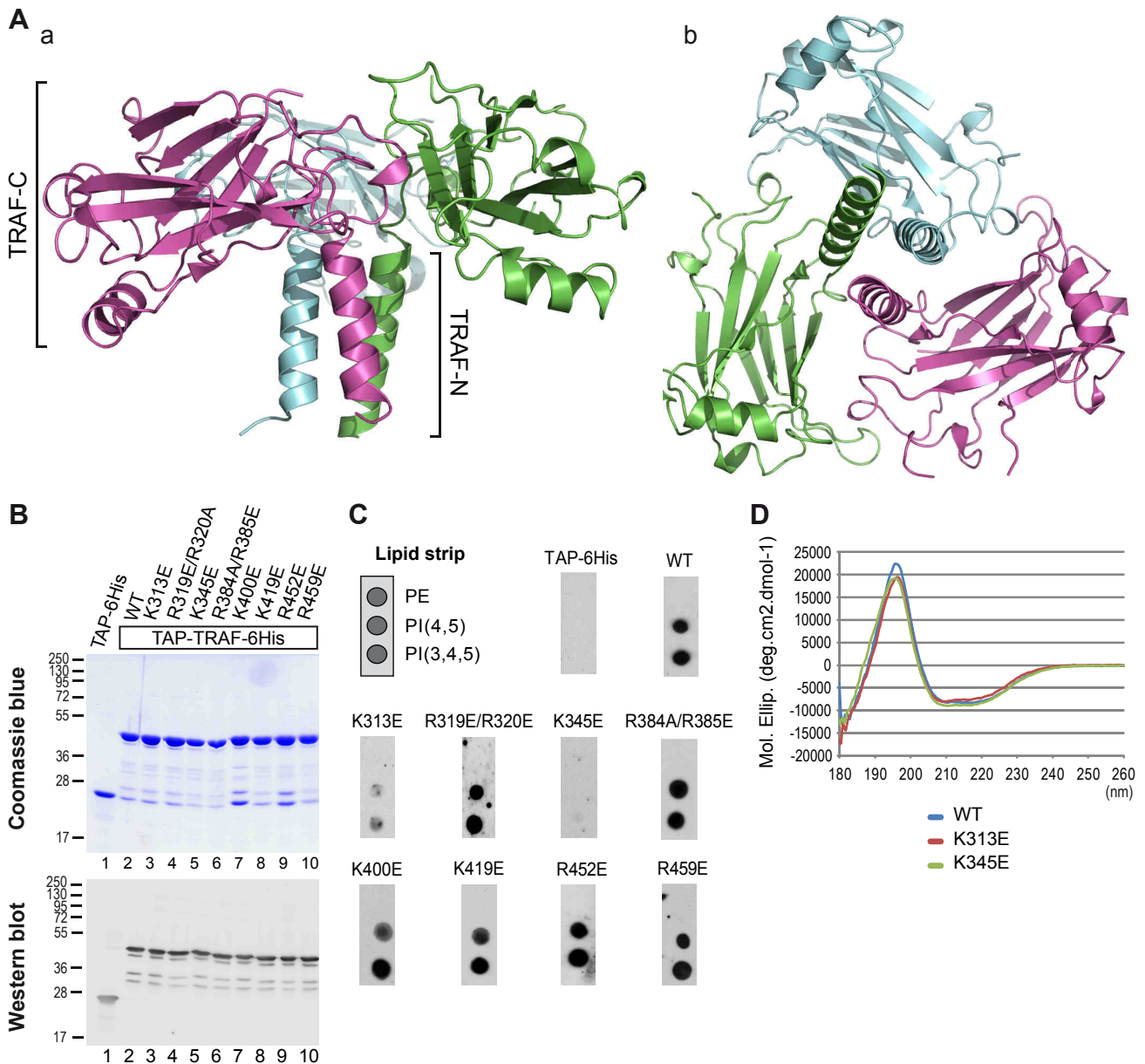


Figure 3: TRAF4-PIP-binding involves lysines K313 and K345

A. Ribbon drawing of the mushroom-shaped trimeric TRAF domain of human TRAF4. Three-fold axis into the page and vertical are shown in (a) and (b), respectively. The three TRAF monomers are colored in magenta, cyan and green, respectively. The β -sheet regions (TRAF-C) exhibited proper three-fold symmetry.

B. Coomassie staining (upper panel) and Western blot analysis (bottom panel) of recombinant purified WT and mutant TRAF domains of TRAF4. Mutated residues are indicated on the top.

C. Lipid-overlay assay of TRAF4 TRAF domain mutants. Left: schematic view of a simplified PIP-strip. In this assay, the TAP-6His tag and the WT TRAF domain are used as negative and positive control, respectively. Immunodetection of membrane-bound proteins was performed as described in the Figure 2C. Mutagenesis of conserved basic residues showed that replacement of lysines 313 and 345 by a glutamic acid decreases and abolishes binding to PIPs, respectively.

D. Structural integrities of WT and mutant TRAF domains of TRAF4 were analyzed by circular dichroism. Replacement of lysines 313 and 345 with a glutamic acid did not affect the secondary structure of the corresponding mutant TRAF domains.

Structural insight on PIP - TRAF domain interaction

To get mechanistic insights about this interaction, we determined the crystal structure of the TRAF domain of human TRAF4 (PDB 3ZJB). The structure was resolved to 1.85 Å by molecular replacement using the structure of human TRAF2 (PDB ID 1CA9, [40]) (Table S1). The structure was refined to convergence ($R_{work} = 0.1632$, $R_{free} = 0.1995$) and includes residues 283-470 of the TRAF domain (Figure 3A). The most striking structural feature of the TRAF domain is the formation of a mushroom-shaped trimer with the coiled-coil domain (TRAF-N) as the stalk and the TRAF-C domain as the cap (Figure 3A), which is similar to the described structure of the TRAF domain of TRAF2 [40] and TRAF5 [45]. The structural architecture of the TRAF-C domain contains an eight-stranded anti-parallel β -sandwich and a three turn helix present in the crossover connection between two β -strands as previously described for TRAF2, TRAF3 and TRAF6 proteins [46].

The structure of the TRAF domain was used to further characterize structural determinants involved in the binding with PIPs and to seek out TRAF4 mutants defective in this binding. Several protein domains including PH (pleckstrin homology), PX (phox homology), ENTH (Epsin N-terminal homology), FYVE (Fab1, YotB, Vac1p, and EEA1) and PDZ (PSD95, Dlg1 and ZO-1) domains bind PIPs [47]. These evolutionarily unrelated domains have in common the presence of at least two positively charged residues, lysine and/or arginine directly interacting with PIPs [48]. Eleven lysines and 15 arginines are present within the TRAF domain of TRAF4. To identify critical residues for PIP-binding within TRAF4, we focused on positively charged residues present at the surface of the TRAF domain (Figure S3). Eight positively charged residues: K313; R319/320; K345; R384/R385; K400; K419; R452 and R459 (Figure S3) were selected and mutated independently into glutamic acid to produce and purify the corresponding recombinant proteins in *E. Coli* (Figure 3B). These mutants were then tested by lipid overlay assay using a simplified lipid-coated membrane (Figure 3C). While 6 out of the 8 mutants still bound PIPs (Figure 3C), the K313E and K345E TRAF4 mutants bound poorly and not at all to PIPs, respectively (Figure 3C). To exclude the possibility that the loss of PIP-binding of both mutants was due to structural alterations, we checked their folding by circular dichroism spectroscopy, a method allowing the determination of protein secondary structures [49]. The near far-UV CD spectra of the two mutants were highly similar to that of wild-type (WT) TRAF domain (Figure 3D) indicating that the K313E and K345E mutations did not affect the TRAF domain secondary structure. This mutagenesis study showed that two positive amino acids, lysine 313 and lysine 345 are contributing and essential residues for the binding of TRAF4 to PIPs, respectively.

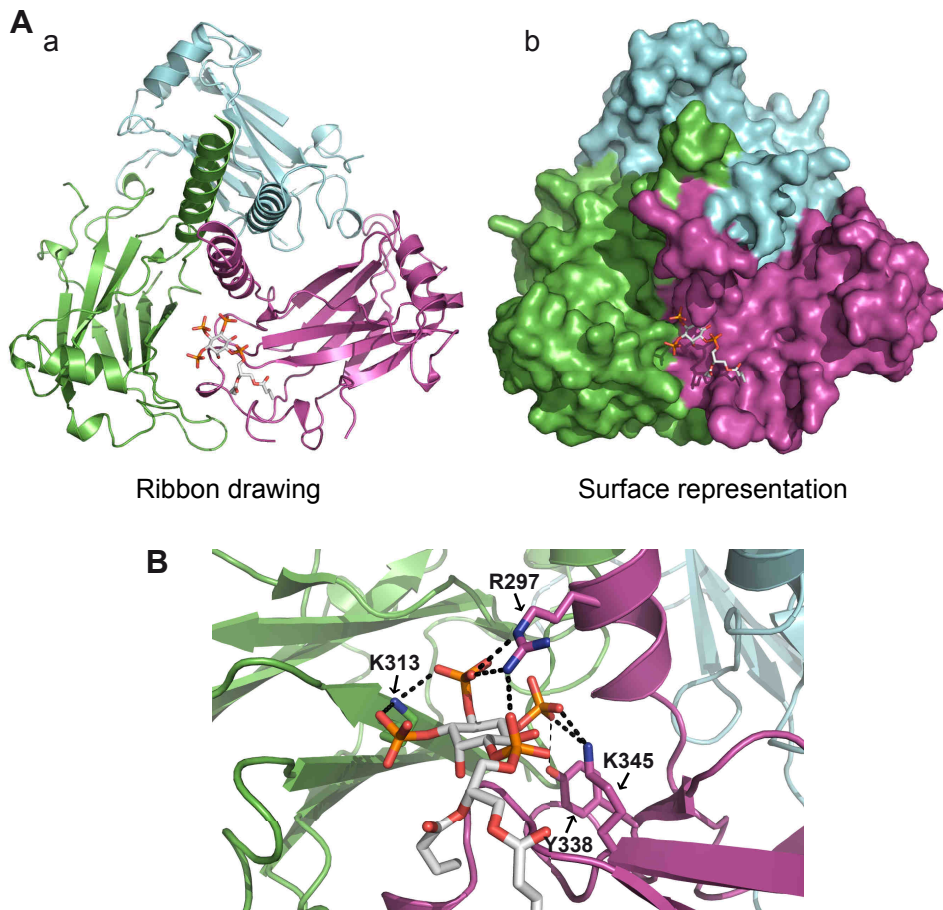


Figure 4: Modeling of the PIP3-diC4 binding onto the crystallized TRAF domain of TRAF4

A. Model of PIP3-diC4 binding onto the TRAF domain of TRAF4 in ribbon drawing (a) and surface (b) representations. The PIP3-diC4 is bound in a pocket at the interface between two different TRAF monomers.

B. PIP3-diC4-interacting residues and PIP3-diC4 ligand are depicted in stick models. Phosphate, nitrogen and oxygen atoms are colored in orange, blue and red, respectively. Hydrogen bond interactions are shown as dashed lines. In this model, three basic residues (R297, K313 and K345) and one aromatic residue (Y338) interact directly with the lipid.

We next used this mutant analysis to build a model representing the binding of PI(3,4,5)P3-diC4 to the TRAF domain of TRAF4 (Figure 4). The GOLD program was used; indeed this software is an automated ligand docking program broadly used to model ligand-protein binding [50]. Hydrogen bonding of the ligand to lysines 313 and 345 atoms was set as prerequisite. In our model, the PI(3,4,5)P3-diC4 molecule binds to the TRAF domain at the interface between two protomers (Figure 4). Indeed, the lipid interacts with lysine 313 from one protomer and lysine 345 from the adjacent protomer. Lysine 313 directly interacts with both phosphates at positions 3 and 4 of the PI(3,4,5)P3-diC4 whereas lysine 345 only binds the phosphate at position 5 (Figure 4B). This model highlighted the presence of two other interacting residues, arginine 297 which interacts with the phosphate at position 4 and tyrosine 338 which binds to the phosphate at position 5. Interestingly, it has been reported in the literature that PIP-binding domains must have an aromatic residue (Tyr or His) that interacts with the lipid in addition to basic residues [48]. Altogether, these results show that TRAF4 is a novel PIP-binding protein which uses the TRAF domain, a mushroom-shaped trimer fold, to bind up to three lipid molecules.

TRAF4 is recruited at the plasma membrane via its interaction with PIPs

Even though they are quantitatively minor components of membranes, PIPs play a crucial role in cellular compartmentalization and in protein targeting [47,51]. We hypothesized that owing to its affinity for PIPs, the TRAF domain would be targeted to PIP-enriched membranes. First, we compared the subcellular localization of the full-length TRAF4 protein to that of the TRAF domain in isolation in MCF7 MEC. To this aim, we expressed EYFP-tagged full-length TRAF4 or the TRAF domain of TRAF4 in MCF7 and labeled them with the TJ marker ZO-1 (Figure 5A). Consistent with a previous report [17], TRAF4 is mainly localized in TJ (Figure 5Aa). Strikingly, in isolation, the TRAF domain was distributed homogeneously along the plasma membrane and was not enriched in TJ (Figure 5Ab). A variety of PIP species can be found along cellular membranes. We next looked whether the localization of specific PIPs could explain the recruitment of the TRAF4-TRAF domain all along the plasma membrane in MCF7 cells. Two major plasma membrane PIPs, PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 can be localized using specific probes, the GFP-tagged PH domain of phospholipase C δ (PH-PLC δ) and the GFP-tagged PH domain of Akt (PH-Akt), respectively [52,53]. PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 mark the apical and basolateral membranes, respectively [54,55]. We therefore analyzed the localization of the TRAF domain with respect to the subcellular distribution of PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 in MCF7 cells. Both the PH-PLC δ and

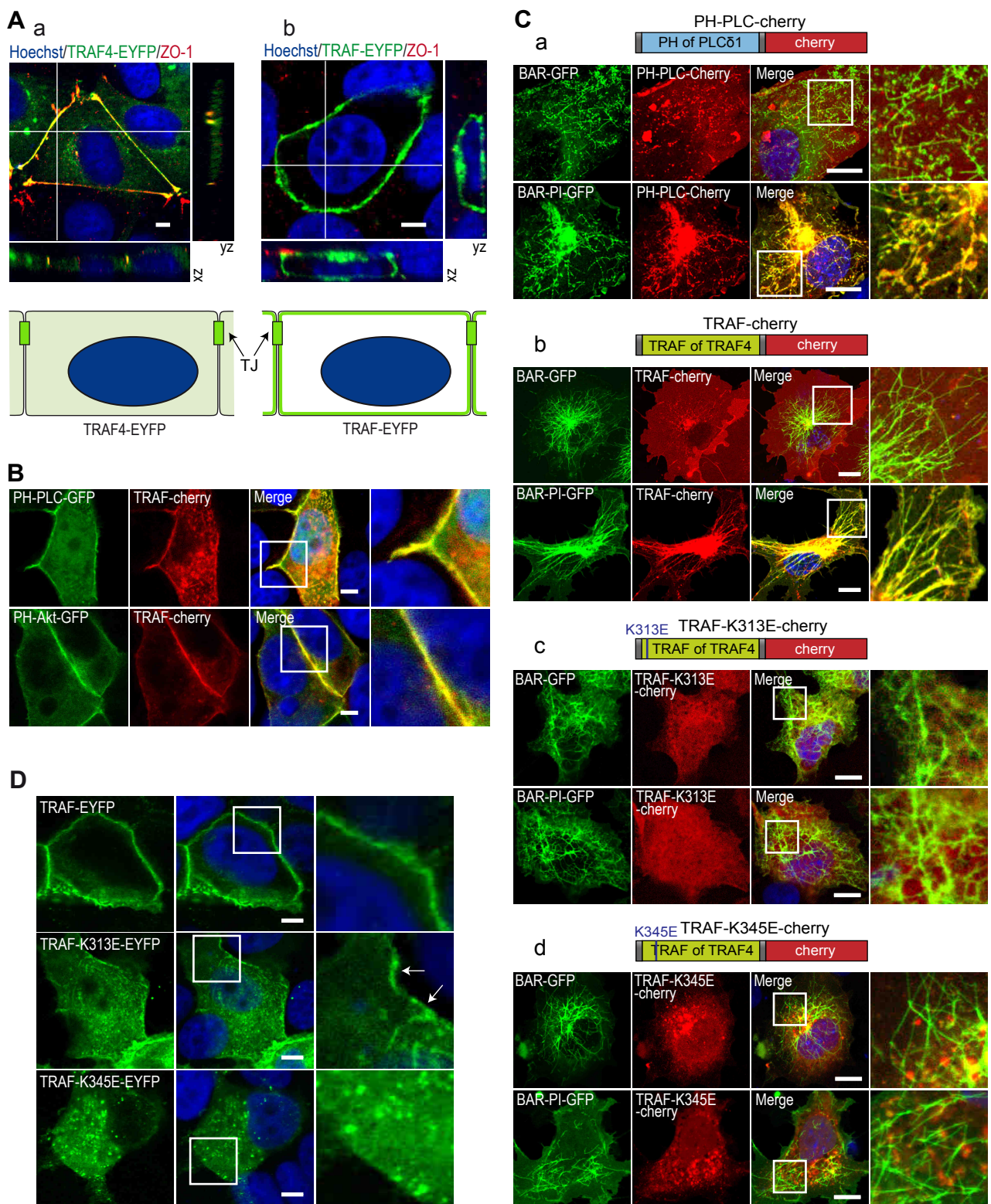


Figure 5: K313 is contributing and K345 is essential to the plasma membrane recruitment of the TRAF domain

A. Colocalization of TRAF4 protein and of the TRAF domain with the TJ protein ZO-1 in MCF7 cells. Cells transiently transfected with YFP-tagged (green) complete TRAF4 protein (a) and TRAF domain (b) were labeled for endogenous ZO-1 (red) and nucleus (blue). Confocal sections are shown together with xz- and yz-scans. Schematic representation of the localization of the EYFP-tagged proteins is presented at the bottom.

B. Colocalization between the TRAF4-TRAF domain and PIP-fluorescent probes. MCF7 cells were co-transfected with the mCherry-tagged TRAF domain and EGFP-tagged PH domains of the phospholipase C (PH-PLC-GFP, top) and Akt (PH-Akt-GFP, bottom) proteins. PH-PLC-GFP and PH-Akt-GFP proteins bind PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3, respectively. Nuclei were stained using Hoechst (blue). Insets on the right represent a 2.5X magnification. Scale bar: 5 μ m.

C. Tubulation assays in COS7 cells. The recruitment of PH-PLC-Cherry (a), WT TRAF-Cherry (b) and mutant TRAF domains TRAF-K313E-Cherry (c) or TRAF-K345E-Cherry (d) on membrane tubes was studied by colocalization with BIN1/BAR-GFP (top panels) and BIN1/BAR-PI-GFP (bottom panels). Nuclei were stained using Hoechst (blue). Similarly to PH-PLC-Cherry, a known PI(4,5)P2 binding domain, TRAF-Cherry protein was specifically recruited to PIP-enriched membrane tubes. (a-d) Confocal sections; insets on the right are 3.5X magnification, Scale bar: 5 μ m.

D. Confocal sections of MCF7 cells transfected with WT and mutant TRAF domains of TRAF4 fused to EYFP. The WT TRAF domain is recruited to the plasma membrane (PM) (top panels). While the K313E mutant (middle panel) is mostly cytoplasmic, part of the protein still localizes to the PM (arrows). The K345E mutant is only detected in the cytoplasm (bottom panel). Nuclei were stained using Hoechst (blue). Insets on the right are 3X magnification, Scale bar: 5 μ m.

the PH-Akt probes colocalized with the TRAF-Cherry protein (Figure 5B), indicating that in isolation the TRAF domain of TRAF4 is localized in both PI(4,5)P₂- and PI(3,4,5)P₃-enriched regions which include most of the plasma membrane.

The co-localization of the TRAF domain with the major plasma membrane PIPs suggests that it is recruited to membranes owing to its interaction with PIPs. To test this hypothesis, we performed a BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) domain-induced membrane tubulation assay [56]. In this assay, membrane tubes are induced in the cytoplasm of COS-7 cells by the expression of the BAR domain of BIN1 [56] (Figure 5C). Moreover, by using the isolated BAR domain and a fusion between the BAR and the PI domains of BIN1 protein, one can initiate the formation of numerous intracytoplasmic naked- and PI(4)P/PI(4,5)P₂-decorated membrane tubes, respectively. To calibrate this assay, we first studied the recruitment of the known PI(4,5)P₂ interactor PH-PLC δ in both naked- and PIP-decorated BAR-induced membrane tubes (Figure 5Ca). Consistent with the known affinity of this sensor for PI(4,5)P₂ [57], the mCherry-tagged PH-PLC δ protein hardly co-localized with naked tubes induced by the BIN1/BAR construct; conversely, in cells harboring PIPs-decorated membrane tubes induced by BIN1/BAR-PI construct, the mCherry-tagged PH-PLC δ was massively recruited onto membrane tubes (Figure 5Ca). We next studied the recruitment of the mCherry-tagged TRAF domain in this system (Figure 5Cb). Remarkably, the TRAF domain was massively recruited onto PIP-decorated membrane tubes (Figure 5Cb, bottom panel) and did not colocalize with naked tubes (Figure 5Cb, upper panel). This result shows that the TRAF domain is specifically recruited onto PIPs-enriched membranes and supports the notion that this interaction is necessary for its subcellular localization.

We then used the BAR domain-induced membrane tubulation assay to study the membrane recruitment of PIP-binding deficient TRAF mutants which have been previously characterized biochemically (Figure 3). To this aim, the K313E and K345E mutants were constructed in fusion with the mCherry protein (Figure 5C) and expressed in COS-7 cells in the presence of either BIN1/BAR or BIN1/BAR-PI induced membrane tubes. In contrast to the WT TRAF domain which colocalizes specifically with PIP-decorated tubes (Figure 5Cb), both mutants did not colocalize with either naked- or PIP-decorated membrane tubes and were cytoplasmic (Figure 5Cc-d).

We also looked at the subcellular localization of these two PIP-binding deficient mutants in MCF7 cells. In these cells the WT TRAF domain is localized at the plasma membrane (Figure 5D, upper panel). Consistent with the biochemical *in vitro* binding assays which showed that the K313 and the K345 residues were contributive and essential to the binding

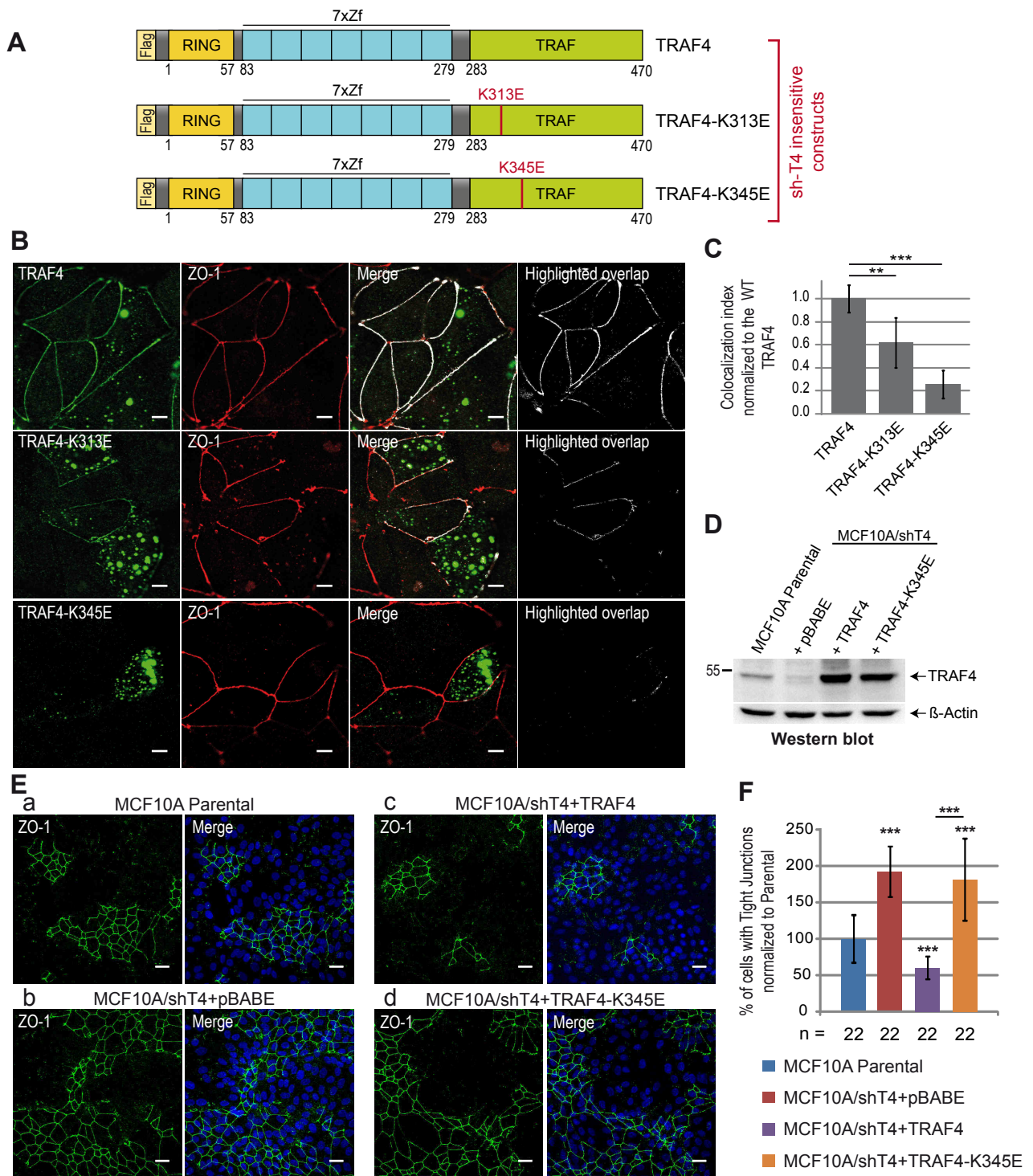


Figure 6: TJ recruitment of TRAF4 is PIP-binding dependent

A. Schematic representation of sh-insensitive Flag-tagged WT and mutant TRAF4 constructs used to reintroduce TRAF4 expression in MCF7/shT4 cells.

B. Recruitment of WT and mutants TRAF4 proteins (green) at TJ was analyzed by colocalisation with ZO-1 (red). The highlighted overlap (white) between TRAF4 and ZO-1 staining is shown on merge panels and alone on the right panel. While, the TRAF4-K313E mutant is still partially colocalized with ZO-1 (middle panels), the TRAF4-K345E mutant does not colocalize anymore with ZO-1 (bottom panels). Scale bar: 10 μ m.

C. Quantification of WT and mutants TRAF4 recruitment at TJ. The colocalization index (CI = overlapping area between TRAF4 and ZO-1 staining divided by the TJ length) was measured on ten microscopic fields. Compared to the WT protein, the CI was reduced by 40% and 78% for K313E and K345E TRAF4 mutants, respectively.

D. Western-blot analysis of TRAF4 protein level in parental MCF10A and in TRAF4-silenced cells (MCF10A/shT4) where WT (MCF10A/shT4+TRAF4) and mutant (MCF10A/shT4+TRAF4K345E) TRAF4 expression was restored. The MCF10A/shT4+pBABE cell line represents a control line transduced with the empty vector. Beta-actin was used as a loading control.

E. The presence of TJ was estimated by ZO-1 staining in cells presented in D. The PIP-binding deficient TRAF4-K345E cannot rescue the phenotype induced by TRAF4 silencing on TJ. Left panels: representative confocal image sections of ZO-1 staining (green); right panels: merge with Hoechst staining (blue). Scale bar: 20 μ m.

F. TJ quantification in cell lines described in D and E was performed as described in Figure 1E. n: number of microscopic fields used for the quantification.

with PIPs, respectively (Figure 3), the TRAF-K313E mutant was localized both in the cytoplasm and at the plasma membrane (Figure 5D, middle panel, arrows), while the TRAF-K345E mutant was completely absent from the plasma membrane and exclusively present in the cytoplasm (Figure 5D, bottom panel). Altogether, these data are consistent with the notion that the subcellular localization of TRAF4 at the plasma membrane is governed by its binding to membrane resident PIPs.

TRAF-PIP interaction is crucial for TRAF4 recruitment in tight junctions.

Compared with the complete protein which localizes predominantly in TJ, the TRAF domain of TRAF4 in isolation has a broader localization all along the plasma membrane. To know whether the binding with PIPs is a prerequisite for the addressing of the complete TRAF4 protein in TJ, we studied the subcellular localization of PIP-binding deficient TRAF4 mutants in the context of the whole protein. To this aim, sh-insensitive Flag-tagged WT or mutant TRAF4 protein (Figure 6A) were expressed in MCF7/shT4 cell line (Figure S2). We used this experimental setting to avoid misinterpretations due to the possible trimerization of ectopically expressed TRAF4 with endogenous TRAF4 protein. The localization of the proteins to TJ was then evaluated by quantification of their colocalization with ZO-1 and the derivation of a colocalization index (Figure 6B). A complete colocalisation between WT TRAF4 and ZO-1 was measured confirming its presence in TJ (Figure 6B). Consistent with the finding that the K313 residue contributes but is not essential to the binding of TRAF4 with PIPs, the TRAF4-K313E mutant only partially localized with ZO-1 (Figure 6B, middle panel). Interestingly, the TRAF4-K345E mutant was absent from TJ (Figure 6B). Indeed, after quantification, the colocalization index was reduced by 40% and 80% for the TRAF4-K313E and TRAF4-K345E mutants, respectively (Figure 6C). Taken together, these data show that PIP-binding is a prerequisite for the localization of TRAF4 at TJ.

TRAF4 functions on tight junctions in a PIP-binding dependent manner

Our results indicate that TRAF4 is a negative regulator of TJ in MEC (Figure 1) and the TRAF domain is a novel PIP-binding domain which is essential for the addressing of the protein to the plasma membrane. In addition, we showed that the PIP-binding dependent membrane recruitment of TRAF4 is necessary for its addressing to TJs. We then wondered whether the role of TRAF4 on TJ was dependent on its association with PIPs at the membrane and moreover on its presence to TJ. To address this, the K345E PIP-binding deficient mutant of TRAF4 was used to rescue the TJ phenotype found in TRAF4-silenced MCF10A cells (MCF10A/shT4) (Figure 1). Both WT and mutant TRAF4 proteins were efficiently expressed

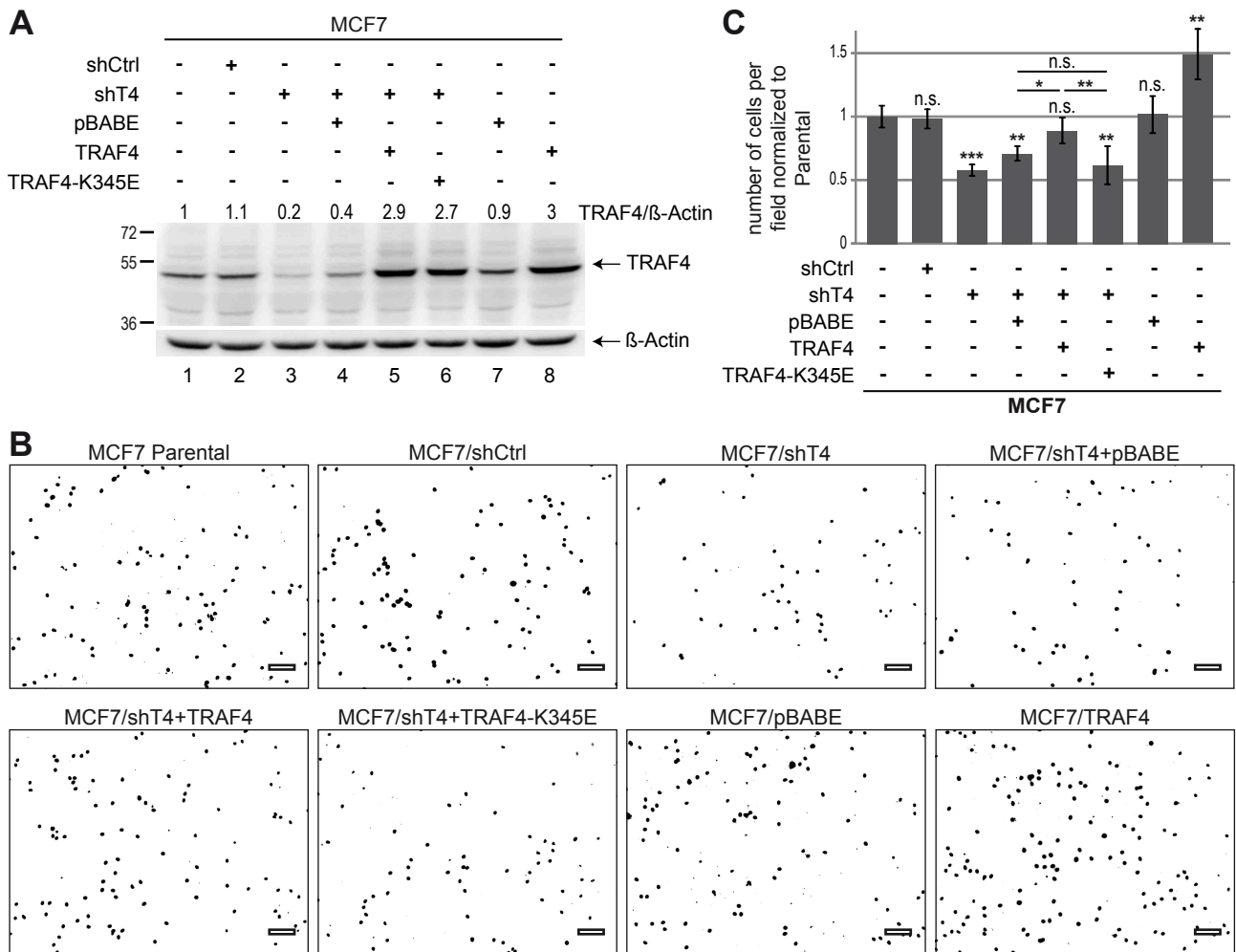


Figure 7: TRAF4 promotes MCF7 cell migration

A. Western-blot analysis of TRAF4 expression. In MCF7 cells, TRAF4 expression has been silenced (lanes 2-6), increased (lane 8) and restored in silenced cells using the WT (lane 5) and the K345E mutant (lane 6). Parental (lane 1), control shRNA (lane 2), control expression vector (lane 7) together with a TRAF4 silenced line transduced with the empty vector (lane 4) were used as controls. TRAF4 expression levels were normalized to control parental cells using β -actin as loading control; values are indicated on the top.

B. Representative microscopic field of the bottom side of the transwell. Migrating cell nuclei were stained with Hoechst and images are shown as inverted look-up table.

C. Histogram representing the quantification of cell migration in MCF7 cells. The number of cells that migrated were counted and normalized to control parental cells. 36 microscopic fields from three independent experiments were used for the quantification.

in MCF10A/shT4 cells to levels above endogenous TRAF4 (Figure 6D). As previously mentioned (Figure 1B), TRAF4 silenced cells (MCF10A/shT4+pBABE) have a ~2 fold increase in cells with TJ (Figure 6Ea-b, F), while cells with restored TRAF4 expression had two fold less TJ than the parental (Figure 6Ea-c, F). In contrast, restoring TRAF4 expression by using the TRAF4-K345E mutant did not rescue the phenotype induced by TRAF4 silencing (Figure 6Ed, F).

These results provide a novel illustration of the importance of TRAF4 subcellular localization on cell biology. Indeed, they show that to act as a negative regulator on TJ formation and/or stability, TRAF4 must be addressed to the plasma membrane/TJ via a PIP-binding dependent mechanism. Therefore preventing or favoring its presence in the plasma membrane and in TJ represents a means to regulate its action on tissue homeostasis.

TRAF4 promotes MEC migration

Of interest, TJ proteins in addition to their characterized role in mediating cell–cell adhesion and assuring epithelial barrier can have an active role in cell migration. The protein ZO-1 actively regulates cell migration by modulating cytoskeletal dynamics [58]. Given that TRAF4 is overexpressed in breast cancer and that migration of cancer cells participates to tumor progression, we addressed the role of TRAF4 in the migration of breast cancer cells. To this aim, TRAF4 expression was modulated in MCF7 cells, and cell migration was measured using the Boyden chamber assay. We first studied cell migration in TRAF4-depleted MCF7 cells. Compared to parental (MCF7) and to a control cell line (MCF7/shCtrl), TRAF4 was expressed by less than 20% in TRAF4-silenced cells (MCF7/shT4) (Figure 7A). Migration was impaired by 40% in this line compared to the controls (Figure 7B, C). We next reintroduced TRAF4 expression in this silenced cell line (MCF7/ShT4+TRAF4) and TRAF4 was expressed at level above the parental cells (Figure 7A). Consistently, reintroduction of TRAF4 was associated with increased cell migration similar to parental MCF7 cells (Figure 7B, C). To complement these findings, MCF7 cells stably expressing TRAF4 were generated (MCF7/TRAF4). TRAF4 was increased 3 fold as compared to parental and control cells (Figure 7A). Supporting the role of TRAF4 in cell migration, compared with parental and control lines, migration was increased by 40% in these cells (Figure 7B, C). To know whether this promigratory function is linked with its ability to interact with PIP and to localize at TJ, we then used the PIP-binding deficient TRAF4-K345E mutant in the Boyden chamber migration assay. To this end, this mutant was reintroduced and expressed in TRAF4 silenced cells (MCF7/shT4+TRAF4-K345E) (Figure 7A). In contrast to the WT protein, the TRAF4-

K345E mutant did not restore cell migration in TRAF4-silenced MCF7 cells, indicating that a PIP-binding deficient mutant could not rescue the migration phenotype induced by the loss of TRAF4 expression (Figure 7B, C). The positive impact of TRAF4 on cell migration was also addressed in MCF10A cells. Consistent with the results obtained using MCF7 cells, TRAF4 positively regulated cell migration in this cell line (Figure S4). Altogether, these results support the role of TRAF4 as a novel regulator of cell migration operating at the TJ level in a PIP-binding dependent manner.

DISCUSSION

In the normal breast, TRAF4 is predominantly localized in TJ of polarized epithelial cells. The molecular mechanism targeting TRAF4 to these adhesion structures as well as its function at these regions remained elusive. The experiments presented here provide for the first time, to our knowledge, a molecular explanation for the recruitment of TRAF4 in TJ. Indeed TRAF4 uses its TRAF domain as a novel PIP-binding domain to be addressed to the plasma membrane, an essential step for its recruitment in TJ. Moreover, they show that TRAF4 acts as a negative regulator of TJ and favors migration of breast cancer cells.

Several lines of evidence indicate a link between TRAF4 and cell polarity [24]. During development, breast epithelial cells polarize and assemble into duct and acini structures. One of the earliest manifestations of breast cancer is the loss of this cellular organization. Indeed, loss of cell-cell contact and epithelial polarity are hallmarks of carcinomas and contribute to their development as carcinomas in situ or their progression to invasive adenocarcinomas. TRAF4 expression is altered in breast carcinomas and the protein shifts from TJ to other subcellular territories suggesting that it could be part of the mechanisms leading to the disruption of the polarized breast epithelium.

Of interest, the epithelial polarity program relies on several conserved cellular machineries, including the domain-identity machinery which builds a TJ fence between apical and basolateral plasma membrane domains by using specific proteins and lipids [59]. The asymmetric distribution of lipids from the PIP family within the plasma membrane plays a key role in the establishment of cell polarity. These lipids represent optimal signaling mediators by forming docking sites for PIP-binding protein effectors [47,52,60]. To date, 11 PIP-binding domains have been described including PH (pleckstrin homology), PX (Phox homology) and FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 and EEA1) domains [61]. While the majority of PIP-binding modules selectively bind to one PIP depending on its phosphorylation status, it has recently emerged that some proteins bind PIPs in a promiscuous manner. It is the case for the polarity proteins PAR3, ZO-1 and α -syntrophin. They do not contain a consensus PIP-binding motif but use their PDZ or PH domains to bind PIPs [35,36,62]. It has been proposed that the loose binding of these proteins to PIPs served to enhance their affinity for membranes and that additional factors are required to fine-tune their subcellular localizations [47]. In this study, we show that TRAF4 uses its TRAF domain as a novel PIP-binding module. Similarly to PAR3, ZO-1 and α -syntrophin, the TRAF domain of TRAF4 has a broad affinity for PIPs. Consistently, the TRAF domain in isolation localizes homogeneously along the plasma membrane while the full-length TRAF4 protein is restricted to TJ, suggesting that the binding

with PIP is a prerequisite for the addressing of TRAF4 in TJ. Additional mechanisms are subsequently required to refine TRAF4 localization to TJ. Moreover, we solved the 3D structure of the TRAF domain of TRAF4 and showed that it exists as a trimer. Ligand binding studies show that under its trimeric form TRAF4 can bind one to three lipid molecules, thus avidity might increase its affinity to lipid membranes. These structural data suggest that the TRAF domain serves to enrich TRAF4 at the plasma membrane and its membrane association can be modulated by the local concentration in PIPs.

The TRAF4-TRAF trimer has a mushroom-shaped structure. The globular part defined as TRAF-C form the cap and the coiled-coil part known as TRAF-N is the stalk. To date, among the solved TRAF domains from TRAF2, TRAF5 and TRAF6 proteins [40,63,64], all share this specific architecture. In the canonical mode of action, TRAFs are cytoplasmic adaptor proteins which bind to the cytoplasmic tail of activated TNF and interleukin-1/Toll-like receptors to mediate a wide range of biological functions including immune and inflammatory responses [65]. When the TRAF domain of TRAF2 and TRAF6 were crystallized in the presence of a peptide representing their receptor ligand, the structure showed the peptide bound to a shallow surface depression on the side of one protomer without contact to the adjacent protomer [40,64]. This mode of binding is very distinct from the PIP-binding model that we predict from the structure of the TRAF domain. In this model, each PIP molecule binds at the interface between two neighboring protomers. Very interestingly, the superimposition of the receptor peptide tail and lipid binding sites shows that they do not overlap. Therefore a synergistic interaction between both modes of binding is possible in theory. The measured affinity constants between TRAF proteins and their receptor ligand were quite low (40-60 μ M range) [42,66], it has been proposed that the high and specific affinity for TRAF proteins with their receptors is achieved through avidity [46]. Our results suggest that in addition, a synergistic interaction of TRAF proteins with a membrane lipid would likewise stabilize and orient the TRAF adaptors at the membrane and increase interaction with their receptors [42,66]. This potential mechanism remains to be addressed experimentally.

Other novel results from this study are the function of TRAF4 on TJ and cell migration. These findings provide a rationale for most of the developmental defects that were reported in TRAF4 deficient animals. For example, it has been shown that TRAF4 is essential for neural tube closure (NTC) and neural crest cell development, two processes involving TJ remodeling prior to cell migration [67,68]. Indeed, TRAF4 knock-down in *Xenopus laevis* causes neural plate folding defects and impairs neural crest cell formation whereas TRAF4 overexpression

expands the neural crest [12]. TRAF4 involvement in NTC has also been described in mice as TRAF4-deficient mice exhibit NTC defects giving rise to mild spina bifida phenotypes and embryonic lethality [13]. In addition, it has been recently shown that TRAF4 is a direct target of Twist, a transcription factor involved in neural crest formation and fate determination in frog [69]. Our results are consistent with these observations and suggest that TRAF4 contributes to TJ plasticity, a key process regulating NTC and neural crest cell formation and migration. Thus, we believe that in TRAF4 knock-out animals, neural crest cells might fail to disrupt their TJs impairing their ability to undergo epithelial-to-mesenchymal transition and to achieve their proper destination contributing to the observed abnormalities.

To conclude, TRAF4 acts both as a negative regulator of TJ and a cell migration promoter. To achieve its function, TRAF4 needs to interact with PIPs which allows its trafficking to the plasma membrane and subsequently to the TJ. This suggests that TRAF4 acts in a signaling loop involving lipids; however, the molecular mechanisms involved remain unclear and will be addressed in the future. Importantly, gain of TRAF4 expression and protein mislocalization have been reported in a variety of carcinoma. Notably, TRAF4 was found to be overexpressed through gene amplification in about 20% of breast cancers [1,3,70]. It is therefore tempting to speculate that gain of TRAF4 function contributes to the development and progression of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture, transfections and infections

COS7 cells were maintained in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and 40 µg/ml gentamycin. MCF7 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS, 0.6 µg/ml insulin and 40 µg/ml gentamycin. MCF10A cells were cultured in DMEM/HAM F12(3:1) supplemented with 20 µg/ml adenine, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml human apo-Transferrin, 1.5 ng/ml triiodothyronin, 2 ng/ml hEGF, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 10% FCS and 40 µg/ml gentamycin. Plasmid transfection was performed with Fugene6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. For retroviral infection, retroviral vectors were co-transfected with pCL-Ampho vector (Imgenex) into 293T retroviral packaging cell line using Fugene6 reagent. For lentiviral infection, pLKO.1 vectors were cotransfected with 3 packaging plasmids pLP1, pLP2 and pLP/VSVG (Invitrogen) into the 293T cell line using Fugene6 reagent. Both retroviral and lentiviral particles were collected 48h after transfection, supplemented with 10 µg/ml polybrene and 20 mM Hepes and incubated with MCF7 or MCF10A cells. Cells were then selected by addition of 0.5 mg/ml puromycin for lentiviral infection or 10 µg/ml blasticidin for retroviral infection.

Cloning and Constructs

A pET28a(+)-TAP/6His expression vector was made by inserting a sequence encoding the Tandem Affinity Purification (TAP) tag between the NdeI and NcoI restriction sites of the pET28a(+) vector (Novagen) [71]. To produce the recombinant protein corresponding to the TAP and the 6His tags in fusion, the synthetic oligonucleotide 5'- GGA TCC GAA TTC GTT AAC CTC GAG GCG GCC GC-3' was cloned into the BamHI and NotI restriction sites of the pET28a(+)-TAP/6His vector. To produce recombinant proteins flanked by a TAP and a 6His tag at the amino- and carboxy-terminal extremity, respectively, the coding sequence of the full-length TRAF4 (pET28a(+)-TAP-TRAF4-6His), the RING-7xZf domains (pET28a(+)-TAP- RING-7xZf -6His) or the TRAF domain (pET28a(+)-TAP-TRAF-6His) of TRAF4 were amplified by PCR using the synthetic primers GAGA GGA TCC ATG GCG CCT GGC TTC/GAGA GTC GAC TCA GCT GAG GAT CTT CCG, GAGA GGA TCC ATG GCG CCT GGC TTC/ GAGA GTC GAC TCA ACA CAT CAT GGC CAG and GAGA GGA TCC GCC CTG GTG AGC CGG/ GAGA GTC GAC TCA GCT GAG GAT CTT CCG, respectively. PCR products were cloned into the BamHI and SalI restriction sites of the modified pET28a(+)-TAP/6His.

The sequence encoding the TRAF domain of TRAF4 was inserted between the NcoI and XhoI restriction sites of the pET28a(+) vector after PCR amplification using the synthetic primers AGA CCA TGG CCC TGG TGA GCC GGC AAC GG/AGA CTC GAG GCT GAG GAT CTT CCG GGG CAG to generate a vector encoding the 6His-tagged TRAF domain of TRAF4.

The pRK7N TRAF4 plasmid expressing Flag-tagged TRAF4, the pEYFP-N1-TRAF4 and pEYFP-N1-TRAF plasmids designed to express EYFP-fused TRAF4 and TRAF domain of TRAF4 in isolation, respectively, were previously described [72].

The BIN1/BAR and the BIN1/BAR-PI expression plasmids were kind gifts from Dr. Karim Hnia (IGBMC). The PH-PLCδ1-GFP and the PH-Akt-GFP expression plasmids were kind gifts from Dr. Bruno Beaumelle (Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Montpellier, France) and Dr. Nicolas Vitale (Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, Strasbourg, France). The PH-PLCδ1 coding sequence was subcloned into the XhoI and SalI restriction sites of the pmCherry-C1 vector (Clontech) after PCR amplification using the synthetic oligonucleotides GAG ACT CGA GCA ATG GAC TCG GGC CGG/GAG AGT CGA CTC ACT GGA TGT TGA G to generate pmCherry-C1-PH-PLCδ1 expression plasmid.

The sequence encoding the TRAF domain of TRAF4 was inserted between the KpnI and BamHI restriction sites of the pmCherry-N1 vector after PCR amplification using the synthetic primers GAG AAA GCT TGC GCC CTG GTG AGC CGG CAA CGG/GAG AGT CGA CTCA GCT GAG GAT CTT CCG GGG CAG to generate a vector encoding the TRAF domain of TRAF4 fused to pmCherry.

To obtain a shRNA expression vector targeting TRAF4 (target sequence: CCA GGA CAT TCG AAA GCG AAA) and a control vector (target sequence: CAA CAA GAT GAA GAG CAC CAA), annealed oligonucleotides were cloned into the pLKO.1 vector to generate pLKO.1-shT4 and pLKO.1-shCtrl vectors, respectively [73].

The retroviral pBABE vector was a kind gift from Dr. Pattabhiraman Shankaranarayanan (IGBMC). The sequence encoding TRAF4 was inserted into the EcoRI restriction site of the pBABE vector after PCR amplification using the synthetic primers GAG ACA ATT GCC CGC CAT GGC GCC TGG CTT CGA CTA CAA GTT C/ GAG ACA ATT GTC AGC TGA GGA TCT TCC GGG G.

Site-directed mutagenesis was performed using the synthetic oligonucleotides: 5'-GTG CTC ATC TGG GAG ATT GGA TCC TAT GGA CGG CGG-3', 5'-GGC AGC TAT GGA GCG GAG CTC CAG GAG GCC AAG-3', 5'-AAG TAT GGT TAC GAG CTC CAG GTG TCT GCA-3', 5'-GTG GCC CTT TGC TGC AGA AGT CAC CTT CTC C-3', 5'-GAT CAG AGC GAC CCC GGG CTG GCT GAA CCA CAG CAC-3', 5'-TGG AAG AAT TTC CAG GAA CCC GGG ACG TGG CGG GGC TCC-3', 5'-ATT CGA AAG CGA AAC TAC GTA GAG GAT GAT GCA GTC TTC-3' and 5'-GCA GTC TTC ATC GAA GCT GCA GTT GAA CTG CCC-

3' to generate K313E, R319E/R320E, K345E, R384E/R385E, K400E, K419E, R452E and R459E mutant TRAF4 expressing constructs, respectively (QuikChange site-directed mutagenesis kit, Agilent). To generate shT4-insensitive constructs, TRAF4 expression vectors were mutated by site-directed mutagenesis using the synthetic oligonucleotide 5'-CAA GTT CAT CTC CCA CCA GGA TAT CAG GAA AAG GAA CTA TGT GCG-3'.

Production and purification of recombinant proteins

Proteins were expressed overnight in E.Coli BL21 (DE3) at 16 °C in the presence of 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma). The cell pellet was lysed and sonicated in 50 ml of Lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole [pH 8.0]) containing EDTA-free complete protease inhibitor tablets (Roche). The lysate was centrifuged at 10 000xg for 1 hr at 4 °C. The supernatant was incubated with 1 ml of His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) overnight at 4 °C under agitation. The resin was washed with wash buffer 1 (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 25 mM imidazole [pH 8.0]) and wash buffer 2 (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole [pH 8.0]). Bound proteins were eluted with elution buffer (20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 250 mM imidazole [pH 7.4]). Eluted fractions were dialyzed into Calmodulin Exchange buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Mg(CH₃COO)₂, 1 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% NP40, 2 mM CaCl₂, complete protease inhibitor (Roche) [pH 8]). Dialyzed fractions were incubated with 1 ml of Calmodulin Affinity Resin (Stratagene), supplemented with 3 μ l of 2M CaCl₂ and then incubated overnight at 4 °C under agitation. The resin was washed three times with Calmodulin Exchange buffer. Bound proteins were eluted with Calmodulin Elution buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Mg(CH₃COO)₂, 1 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% NP40, 2 mM EGTA [pH 8]). The fractions were then analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue or Western blotting.

Coomassie blue staining and Immunoblotting

Proteins were assayed by BCA protein assay (Pierce). Equal amounts of protein lysates in Laemmli were loaded onto 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. For Coomassie Blue staining, the gel was incubated in Coomassie brilliant blue R 250 (Merck) solution. For immunoblotting, the SDS-PAGE gel was transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with PBST- 4% non-fat dry milk and then incubated overnight with the following antibodies: rabbit polyclonal anti-STAR3 (1/1000; IGBMC [74]), mouse anti- β -actin (A5441; 1:1,000; Sigma) or mouse monoclonal anti-TRAF4 2H1 (1:2000; IGBMC). The anti-STAR3 antibody does not recognize recombinant proteins but the immunoglobulin-binding domain of the protein A within the TAP-tag directly binds the antibody. Secondary antibodies coupled with HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) were incubated for 1 h, and antibody binding was detected by ECL (Thermo Fisher Scientific).

Lipid Overlay Assay

Binding of recombinant proteins flanked by the TAP and the 6His tags to PIP (Phosphatidylinositol Phosphate) strips (Echelon Biosciences) or to homemade lipid-coated membranes was done as described by Dowler and collaborators [75]. Briefly, lyophilized lipids (phosphatidylethanolamine (Avanti: 850757P), phosphatidic acid (Avanti: 840875P), PI(3,5)P₂ (Avanti: 850154P), PI(4,5)P₂ (Avanti: 850155P) and PI(3,4,5)P₃ (Avanti: 850156P)) were reconstituted to 1 mM stocks in a 1:1 solution of methanol and chloroform. Lipids were diluted in a 2:1:0.8 solution of methanol:chloroform:water to 500 μ M. 1 μ l aliquots of each lipid and solvent were spotted onto hybond-C extra membrane (Amersham).The membranes were then dried at room temperature for 1 hour. Recombinant proteins (10 nM) were incubated for 1 h at room temperature (RT) with the preblocked PIP strips or homemade lipid-strips membranes. Membranes were then washed ten times with TBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) and incubated for 1 h at RT with the rabbit polyclonal anti-STAR3 antibody (1/1000; IGBMC). After ten washes with TBST, membranes were incubated for 1h with a peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (1:10000; Jackson ImmunoResearch). After ten washing with TBST, bound proteins were detected by ECL (Thermo Fisher Scientific).

Recombinant TRAF-6His purification and mass spectrometry analysis

For mass spectrometry analysis, recombinant proteins were expressed as 6His fusion proteins and purified with His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) as described above. The protein was finally purified by gel filtration over a 16/60 Superdex 200 Column (GE Healthcare) in Ammonium bicarbonate buffer (100 mM NH₄HCO₃ [pH 8]). Fractions containing recombinant TRAF domain were pooled and concentrated with Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore). Recombinant TRAF-6His protein was incubated in presence or in absence of a soluble form of PI(3,4,5)P₃ (PI(3,4,5)P₃-diC₄ form Echelon Biosciences) in a 1:5 protein/lipid ratio and then submitted to Electrospray Ionisation Time of Flight (ESI-TOF; Micro-Tof II, Bruker, Bremen, Germany). The analysis of TRAF alone and TRAF incubated with PI(3,4,5)P₃ was performed in native condition with a final concentration of 20 pmol/ μ L of protein in ammonium bicarbonate buffer. The samples were continuously infused into the ion source at a flow rate of 3 μ L/min using a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA). The data were acquired in the positive mode. The calibration of the device was performed

with a solution of cesium iodide (Fluka) 1mg/mL in ethanol. To preserve the noncovalent complexes, relatively mild interface conditions were used, a declustering voltage (Capillary exit) was fixed at 200 V and the capillary temperature was set to 160 and 180 °C. The time of acquisition was between 1.5 min and 2 min. Data were analyzed with Data Analysis software (Bruker) and the multicharged spectra obtained were then deconvoluted with Maximum Entropy software.

Circular Dichroism

All the CD experiments were recorded by using a Jasco J-815 spectropolarimeter (Easton, MD) fitted with an automatic 6-position Peltier thermostated cell holder. The instrument was calibrated with 10-camphorsulphonic acid. Far-UV CD data were obtained using a 0.1 mm pathlength cell (Quartz-Suprasil, Hellma UK Ltd) at 25.0 °C ± 0.1 °C. Spectra were acquired using a continuous scan rate of 50 nm/min and are presented as an average of at least twenty successive scans. The response time and the bandwidth were 1 sec and 1 nm, respectively. The absorbance of the sample (at a concentration of 35 µM) and buffer were kept as low as possible. Spectra were carried out in 100 mM ammonium bicarbonate (pH 7.0) and recorded between 180 to 260 nm. All spectra were corrected by subtracting the corresponding solvent spectrum obtained under identical conditions. The signal is expressed in mean residue ellipticity (deg.cm².dmol⁻¹).

Isothermal titration calorimetry

ITC was carried out using an ITC 200 calorimeter (Microcal, Northampton, MA) at 25 °C. The recombinant TRAF-6His protein was dialyzed extensively against 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl. A typical titration consisted of injecting incrementally 2 µl of 500 µM inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (IP₄, Echelon) into the 16 µM protein sample, at time intervals of 3 min, to ensure that the titration peak returned to the baseline. Calorimetric data were analyzed with the evaluation software MicroCal ORIGIN (MicroCal Software, Northampton, MA).

Crystallization, data collection, and structure resolution

TRAF4 was crystallized at 6.4 mg.ml⁻¹ with a 1:1 molar ratio of inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (IP₄). The crystallization experiments were carried out by the sitting-drop vapour diffusion method at 293 K using a Cartesian nanolitre dispensing robot. A mixture consisting of 0.2 µl protein solution and 0.2 µl reservoir solution was equilibrated against 50 µl of reservoir solution. Several commercially available screens were used including The PEGs suite and the ProComplex suite (Qiagen) and Wizard I & II (Emerald Biosystems). Crystals appeared in several conditions with the best being 15% PEG 4000, 0.1 M HEPES pH 7.0. The crystals were briefly transferred to crystallization solution supplemented with 25% PEG 400 and flash cooled in liquid nitrogen.

Data were collected from a single cryo-cooled crystal (100K) on a MarMOSAIC 225 CCD detector (Marresearch) on the ID23-2 beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). 180° of data were collected to 1.85 Å using 2.25° rotation and 1.55 s exposure time per image. The data were indexed and processed with XDS [76] and scaled by AIMLESS [77,78] from the CCP4 suite [79]. The crystals belonged to the space-group P21 with unit cell parameters a = 54.625 Å, b = 85.443 Å, c = 61.646 Å, β = 108.076°. The structure was solved by molecular replacement using PHASER [80] in the PHENIX suite [81]. The structure of the trimer of human TRAF2 was modified using CHAINSAW [82] to trim the side chains to the last common atom, and was used as a search model. The asymmetric unit contains one copy of the TRAF4 homotrimer with a corresponding Matthews coefficient [83] of 2.02 Å³/Da and a solvent content of 39.2% (assuming a partial specific volume of 0.74 ml.g⁻¹). Refinement was performed using BUSTER (BUSTER-TNT 2.10) followed by iterative model building in COOT [84].

The quality of the refined model was assessed using MOLPROBITY [85] and Procheck [86]. Data collection and refinement statistics are summarized in Table S1. Molecular graphics Figs were generated using PyMOL [87]. Coordinates and structure factors have been deposited at the Protein Data Bank with accession code 3ZJB.

Docking of PI(3,4,5)P₃-diC₄ to human TRAF4

The 3D structure of PI(3,4,5)P₃ was obtained from a 2D sketch by Corina [88] and its protonation state at pH 7.4 was predicted using the Filter program [89]. Hydrogen atoms were added to the X-ray structure of human TRAF4 by means of the SYBYL X-2.0 package [90].

The ligand was then docked into the X-ray structure of human TRAF4 with the program GOLD [91]. The active site was defined by any residue within a 10 Å-radius sphere centered at the mid-distance between Lys313A and Lys345C C α atoms. Five residue side chains (Lys313A, Arg297C, Glu298C, Glu300C, Lys345C) were considered flexible during the docking using the GOLD default rotamer library. Hydrogen bonding of the ligand to Lys313A and Lys345 NZ atoms was set as a prerequisite using a constraint weight of 20.0 and a minimum geometry weight of 0.005. The best docking pose out of the 20 independent docking runs was finally saved. Upon parameterization of the ligand with Antechamber [92], the corresponding protein-ligand complex,

embedded in a box of 23668 TIP3P water molecules, was further refined in AMBER [93] by 1500 steps of steepest descent plus 4000 steps of conjugate gradient energy minimization.

Immunofluorescence

MCF7, COS-7 and MCF10A cells were grown on glass coverslips and transfected for 24h. Cells were then fixed for 20 min at RT with 4% paraformaldehyde in Phosphate Buffered Saline (PBS) and permeabilized for 10 min with 0.1% Triton X-100 in PBS. After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS, cells were incubated at RT with the primary antibodies, rabbit anti-Flag (1:2000; F-7425 Sigma) and mouse anti-ZO-1 (1:1,000; Zymed). After three washes in PBS, cells were incubated for 1 h with Cy3- and Alexa488-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch and Invitrogen-Molecular Probes, respectively). After 2 washes, nuclei were counterstained with Hoechst-33258 dye. Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen). Observations were made with a confocal microscope (Leica SP2 UV, 63x, NA 1.4). For TJ recruitment analysis, the overlapping staining between WT or mutant TRAF4 and ZO-1 was highlighted in white by the «colocalization analysis» tool from ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A colocalization index was then measured and corresponds to the overlapping area between TRAF4 and ZO-1 divided by the TJ length. Ten fields per condition were acquired for the quantification. For the measurement of TJ formation and/or stability, immunofluorescence was performed 48h after MCF10A cell lines plating as described above.

Calcium-switch assay

Calcium switch experiments were performed with minor modifications of previously published methods [94,95]. In brief, MCF7 cells were plated at high density in DMEM supplemented with 10% FCS, 0.6 µg/ml insulin and 40 µg/ml gentamycin (HCM). After they reached confluence, cells were washed twice with the EMEM low calcium medium (EMEM-LCM) and incubated with EMEM-LCM for 16 h. Cells were then switched back to HCM at $t = 0$, and junctional reassembly was followed for various times.

Boyden chamber assay

The lower Transwell chamber (Millicell, Merck Millipore) contained cell appropriate medium (10% fetal calf serum, 2% bovine serum albumin as chemoattractants). Cells in appropriate medium (0.2% bovine serum albumin) were seeded onto membranes of the upper Transwell chamber (6.5 mm diameter, 8 µm pores); MCF10A (40 × 104 cells, 16 h) and MCF7 (105 cells, 48 h). After incubation, cells were ethanol-fixed and nuclei were counterstained with Hoechst-33258 dye. Cells at the membrane upper face were scraped and those of the lower face were counted after acquisition using an inverted microscope. A total of 36 microscopic fields from three independent experiments were used for quantification. Nuclei were counted with the “nucleus counter” ImageJ plugin.

Statistical analysis

Average and standard deviation are shown in the graphs in Figures 1E, 6C, 6F, 7C, S2C and S4C. p values were determined using a Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

REFERENCES

1. Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard MP, Wendling C, et al. (1995) Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 270: 25715–25721.
2. Tomasetto C, Régnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, et al. (1995) Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* 28: 367–376. doi:10.1006/geno.1995.1163.
3. Camilleri-Broët S, Cremer I, Marmey B, Comperat E, Viguié F, et al. (2007) TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* 26: 142–147. doi:10.1038/sj.onc.1209762.
4. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, et al. (2004) Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9309–9314. doi:10.1073/pnas.0401994101.
5. Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20: 6482–6491. doi:10.1038/sj.onc.1204788.
6. Zotti T, Vito P, Stilo R (2012) The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol* 227: 1280–1284. doi:10.1002/jcp.24011.
7. Kedinger V, Rio M-C (2007) TRAF4, the unique family member. *Adv Exp Med Biol* 597: 60–71. doi:10.1007/978-0-387-70630-6_5.
8. Zapata JM, Martínez-García V, Lefebvre S (2007) Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv Exp Med Biol* 597: 1–24. doi:10.1007/978-0-387-70630-6_1.
9. Preiss A, Johannes B, Nagel AC, Maier D, Peters N, et al. (2001) Dynamic expression of *Drosophila* TRAF1 during embryogenesis and larval development. *Mech Dev* 100: 109–113. doi:10.1016/S0925-4773(00)00506-2.

10. Grech A, Quinn R, Srinivasan D, Badoux X, Brink R (2000) Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol Immunol* 37: 721–734.
11. Cha G-H, Cho KS, Lee JH, Kim M, Kim E, et al. (2003) Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 23: 7982–7991.
12. Mathew SJ, Rembold M, Leptin M (2011) Role for Traf4 in polarizing adherens junctions as a prerequisite for efficient cell shape changes. *Mol Cell Biol* 31: 4978–4993. doi:10.1128/MCB.05542-11.
13. Régnier CH, Masson R, Kedinger V, Textoris J, Stoll I, et al. (2002) Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5585–5590. doi:10.1073/pnas.052124799.
14. Shiels H, Li X, Schumacker PT, Maltepe E, Padrid PA, et al. (2000) TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am J Pathol* 157: 679–688. doi:10.1016/S0002-9440(10)64578-6.
15. Blaise S, Kneib M, Rousseau A, Gambino F, Chenard M-P, et al. (2012) In vivo evidence that TRAF4 is required for central nervous system myelin homeostasis. *Plos One* 7: e30917. doi:10.1371/journal.pone.0030917.
16. Glauner H, Siegmund D, Motejadedd H, Scheurich P, Henkler F, et al. (2002) Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4). *Eur J Biochem Febs* 269: 4819–4829.
17. Kedinger V, Alpy F, Baguet A, Polette M, Stoll I, et al. (2008) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *Plos One* 3: e3518.
18. Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, et al. (1998) TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 152: 1549–1561.
19. Kédinger V, Alpy F, Baguet A, Polette M, Stoll I, et al. (2008) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *Plos One* 3: e3518. doi:10.1371/journal.pone.0003518.
20. Yi P, Xia W, Wu R-C, Lonard DM, Hung M-C, et al. (2013) SRC-3 coactivator regulates cell resistance to cytotoxic stress via TRAF4-mediated p53 destabilization. *Genes Dev* 27: 274–287. doi:10.1101/gad.203760.112.
21. Wang H, Cai Y, Chia W, Yang X (2006) *Drosophila* homologs of mammalian TNF/TNFR-related molecules regulate segregation of Miranda/Prospero in neuroblasts. *Embo J* 25: 5783–5793. doi:10.1038/sj.emboj.7601461.
22. Li J-M, Fan LM, Christie MR, Shah AM (2005) Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol* 25: 2320–2330. doi:10.1128/MCB.25.6.2320-2330.2005.
23. Wu RF, Xu YC, Ma Z, Nwariaku FE, Sarosi GA Jr, et al. (2005) Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol* 171: 893–904. doi:10.1083/jcb.200507004.
24. Rousseau A, Rio M-C, Alpy F (2011) TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer. *Cancers* 3: 2734–2749. doi:10.3390/cancers3022734.
25. Kalkan T, Iwasaki Y, Park CY, Thomsen GH (2009) Tumor Necrosis Factor-Receptor-associated Factor-4 Is a Positive Regulator of Transforming Growth Factor- β Signaling That Affects Neural Crest Formation. *Mol Biol Cell* 20: 3436–3450. doi:10.1091/mbc.E08-03-0325.
26. Masson R, Régnier CH, Chenard MP, Wendling C, Mattei MG, et al. (1998) Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) expression pattern during mouse development. *Mech Dev* 71: 187–191.
27. Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ (1989) Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Dev Camb Engl* 105: 223–235.
27. Bazzoun D, Lelièvre S, Talhouk R (2013) Polarity proteins as regulators of cell junction complexes: Implications for breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813000454>. Accessed 9 April 2013.
29. Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, et al. (2002) The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111: 29–40.
30. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, et al. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50: 6075–6086.
31. Brown KA, Aakre ME, Gorska AE, Price JO, Eltom SE, et al. (2004) Induction by transforming growth factor- β 1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res* 6: 1–17. doi:10.1186/bcr778.
32. Brysse A, Mestdagt M, Polette M, Luczka E, Hunziker W, et al. (2012) Regulation of CXCL8/IL-8 expression by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res Mcr* 10: 121–132. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0180.
33. Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA (2005) Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 16: 2636–2650. doi:10.1091/mbc.E05-01-0043.

34. Van Deurs B, Zou ZZ, Briand P, Balslev Y, Petersen OW (1987) Epithelial membrane polarity: a stable, differentiated feature of an established human breast carcinoma cell line MCF-7. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 35: 461–469.
35. Meerschaert K, Tun MP, Remue E, Ganck AD, Boucherie C, et al. (2009) The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell Mol Life Sci* 66: 3951–3966. doi:10.1007/s00018-009-0156-6.
36. Wu H, Feng W, Chen J, Chan L-N, Huang S, et al. (2007) PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell* 28: 886–898. doi:10.1016/j.molcel.2007.10.028.
37. Dowler S (2002) Protein Lipid Overlay Assay. *Sci Stoke* 2002: 6pl–6. doi:10.1126/stke.2002.129.pl6.
38. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods San Diego Calif* 24: 218–229. doi:10.1006/meth.2001.1183.
39. Potier N, Rogniaux H, Chevreux G, Van Dorsselaer A (2005) Ligand–Metal Ion Binding to Proteins: Investigation by ESI Mass Spectrometry. In: A. L. Burlingame, editor. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. Volume 402. pp. 361–389. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905020112>. Accessed 4 March 2013.
40. Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* 398: 533–538. doi:10.1038/19110.
41. Zheng C, Kabaleeswaran V, Wang Y, Cheng G, Wu H (2010) Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol Cell* 38: 101–113. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.009.
42. Ye H, Wu H (2000) Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc Natl Acad Sci* 97: 8961–8966. doi:10.1073/pnas.160241997.
43. Yan J, Wen W, Xu W, Long J-F, Adams ME, et al. (2005) Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *Embo J* 24: 3985–3995. doi:10.1038/sj.emboj.7600858.
44. Yu JW, Mendrola JM, Audhya A, Singh S, Keleti D, et al. (2004) Genome-Wide Analysis of Membrane Targeting by *S. cerevisiae* Pleckstrin Homology Domains. *Mol Cell* 13: 677–688. doi:10.1016/S1097-2765(04)00083-8.
45. Zhang P, Reichardt A, Liang H, Aliyari R, Cheng D, et al. (2012) Single amino acid substitutions confer the antiviral activity of the TRAF3 adaptor protein onto TRAF5. *Sci Signal* 5: ra81. doi:10.1126/scisignal.2003152.
46. Wu H (2004) Assembly of Post-Receptor Signaling Complexes for the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. In: K. Christopher Garcia, editor. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, Vol. Volume 68. pp. 225–279. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323304680077>. Accessed 28 March 2013.
47. Shewan A, Eastburn DJ, Mostov K (2011) Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a004796. doi:10.1101/cshperspect.a004796.
48. Rosenhouse-Dantsker A, Logothetis DE (2007) Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 455: 45–53. doi:10.1007/s00424-007-0291-6.
49. Elavazhagan M, Lakshminarayanan R, Zhou L, Ting LW, Tong L, et al. (2012) Expression, purification and characterization of fourth FAS1 domain of TGFβ1p-associated corneal dystrophic mutants. *Protein Expr Purif* 84: 108–115. doi:10.1016/j.pep.2012.04.018.
50. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267: 727–748. doi:10.1006/jmbi.1996.0897.
51. Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651–657. doi:10.1038/nature05185.
52. Balla T, Várnai P (2009) Visualisation of cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-domains. *Curr Protoc Cell Biol* CHAPTER: Unit–24.4. doi:10.1002/0471143030.cb2404s42.
53. Várnai P, Balla T (2006) Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. *Biochim Biophys Acta Bba - Mol Cell Biol Lipids* 1761: 957–967. doi:10.1016/j.bbalip.2006.03.019.
54. Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, et al. (2006) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8: 963–970. doi:10.1038/ncb1461.
55. Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, et al. (2007) PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128: 383–397. doi:10.1016/j.cell.2006.11.051.
56. Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, et al. (2002) Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* 297: 1193–1196. doi:10.1126/science.1071362.
57. Garcia P, Gupta R, Shah S, Morris AJ, Rudge SA, et al. (1995) The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry (Mosc)* 34: 16228–16234.
58. Huo L, Wen W, Wang R, Kam C, Xia J, et al. (2011) Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCKβ complex at the leading edge controls cell migration. *Embo J* 30: 665–678. doi:10.1038/emboj.2010.353.

59. Tanos B, Rodriguez-Boulan E (2008) The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27: 6939–6957. doi:10.1038/onc.2008.345.
60. Gassama-Diagne A, Payrastra B (2009) Phosphoinositide signaling pathways: promising role as builders of epithelial cell polarity. *Int Rev Cell Mol Biol* 273: 313–343. doi:10.1016/S1937-6448(08)01808-X.
61. Kutateladze TG (2010) Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* 6: 507–513. doi:10.1038/nchembio.390.
62. Chockalingam PS, Gee SH, Jarrett HW (1999) Pleckstrin homology domain 1 of mouse alpha 1-syntrophin binds phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry (Mosc)* 38: 5596–5602. doi:10.1021/bi982564+.
63. Ni C-Z, Welsh K, Leo E, Chiou C, Wu H, et al. (2000) Molecular basis for CD40 signaling mediated by TRAF3. *Proc Natl Acad Sci* 97: 10395–10399. doi:10.1073/pnas.97.19.10395.
64. Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, et al. (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418: 443–447. doi:10.1038/nature00888.
65. Wang Y, Zhang P, Liu Y, Cheng G (2010) TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses. *Sci China Life Sci* 53: 159–168. doi:10.1007/s11427-010-0050-3.
66. Kuriyan J, Cowburn D (1997) Modular Peptide Recognition Domains in Eukaryotic Signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 259–288. doi:10.1146/annurev.biophys.26.1.259.
67. Eom DS, Amarnath S, Agarwala S (2013) Apicobasal polarity and neural tube closure. *Dev Growth Differ* 55: 164–172. doi:10.1111/dgd.12030.
68. Kalkan T, Iwasaki Y, Park CY, Thomsen GH (2009) Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor-beta signaling that affects neural crest formation. *Mol Biol Cell* 20: 3436–3450. doi:10.1091/mbc.E08-03-0325.
69. Lander R, Nasr T, Ochoa SD, Nordin K, Prasad MS, et al. (2013) Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat Commun* 4: 1542. doi:10.1038/ncomms2543.
70. Bièche I, Tomasetto C, Régnier CH, Moog-Lutz C, Rio MC, et al. (1996) Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res* 56: 3886–3890.
71. Degot S, Hir HL, Alpy F, Kedinger V, Stoll I, et al. (2004) Association of the Breast Cancer Protein MLN51 with the Exon Junction Complex via Its Speckle Localizer and RNA Binding Module. *J Biol Chem* 279: 33702–33715. doi:10.1074/jbc.M402754200.
72. Kédinger V, Alpy F, Bague M, Polette M, Stoll I, et al. (2008) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *Plos One* 3: e3518. doi:10.1371/journal.pone.0003518.
73. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, et al. (2006) A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124: 1283–1298. doi:10.1016/j.cell.2006.01.040.
74. Alpy F, Stoeckel ME, Dierich A, Escola JM, Wendling C, et al. (2001) The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem* 276: 4261–4269. doi:10.1074/jbc.M006279200.
75. Dowler S, Kular G, Alessi DR (2002) Protein Lipid Overlay Assay. *Sci Signal* 2002: pl6. doi:10.1126/stke.2002.129.pl6.
76. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 125–132. doi:10.1107/S0907444909047337.
77. Evans P (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 72–82. doi:10.1107/S0907444905036693.
78. Evans PR (2011) An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67: 282–292. doi:10.1107/S090744491003982X.
79. The CCP4 suite: programs for protein crystallography (1994). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 760–763. doi:10.1107/S0907444994003112.
80. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40: 658–674. doi:10.1107/S0021889807021206.
81. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 213–221. doi:10.1107/S0907444909052925.
82. Stein N (2008) CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *J Appl Crystallogr* 41: 641–643. doi:10.1107/S0021889808006985.
83. Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33: 491–497. doi:10.1016/0022-2836(68)90205-2.
84. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 486–501. doi:10.1107/S0907444910007493.
85. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 12–21. doi:10.1107/S0907444909042073.

86. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26: 283–291. doi:10.1107/S0021889892009944.
87. Delano W (2002) The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, USA: Delano Scientific. Available: <http://www.pymol.org/>.
88. Sadowski J, Gasteiger J, Klebe G (1994) Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-ray Structures. *J Chem Inf Comput Sci* 34: 1000–1008. doi:10.1021/ci00020a039.
89. FILTER (n.d.). Santa Fe: OpenEye Scientific Software. Available: <http://www.eyesopen.com/filter>.
90. SYBYL-X (n.d.). 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA: Tripos International.
91. GOLD (n.d.). Cambridge CB2 1EZ, United Kingdom: Cambridge Crystallographic Data Centre.
92. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* 25: 247–260. doi:10.1016/j.jmgm.2005.12.005.
93. Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, et al. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26: 1668–1688. doi:10.1002/jcc.20290.
94. Gao L, Joberty G, Macara IG (2002) Assembly of Epithelial Tight Junctions Is Negatively Regulated by Par6. *Curr Biol* 12: 221–225. doi:10.1016/S0960-9822(01)00663-7.
95. Gumbiner B, Simons K (1986) A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol* 102: 457–468. doi:10.1083/jcb.102.2.457.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Adeline Page, Benoit Fischer, Benoit Frisch, Fabrice Klein and Béatrice Heurtault for their help. We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advices and discussion ; Karim Hnia for providing BIN1/BAR constructs, Bruno Beaumelle for providing the PH-Akt-GFP construct, Pattabhiraman Shankaranarayanan for providing pBABE vector and Nicolas Vitale for providing PH-PLC-GFP construct. We thank Corinne Wendling, Pascal Kessler and Marc Koch for their technical assistance.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <http://www.ligue-cancer.net/cd71/actions-missions/la-recherche>). We acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.uds.fr/>). This work was also supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI; <https://www.structuralbiology.eu/networks/frisbi>) ANR-10-INSB-05-01, and Instruct as part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI). A.R. received an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France ; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>) and a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer (<http://www.ligue-cancer.net/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ABBREVIATIONS

MEC, mammary epithelial cell; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor; PIP, phosphoinositide; TJ, tight junction; AJ, adherens junction; ZO-1, zonula occludens 1; PAR3, partitioning-defective 3; PH, pleckstrin homology.

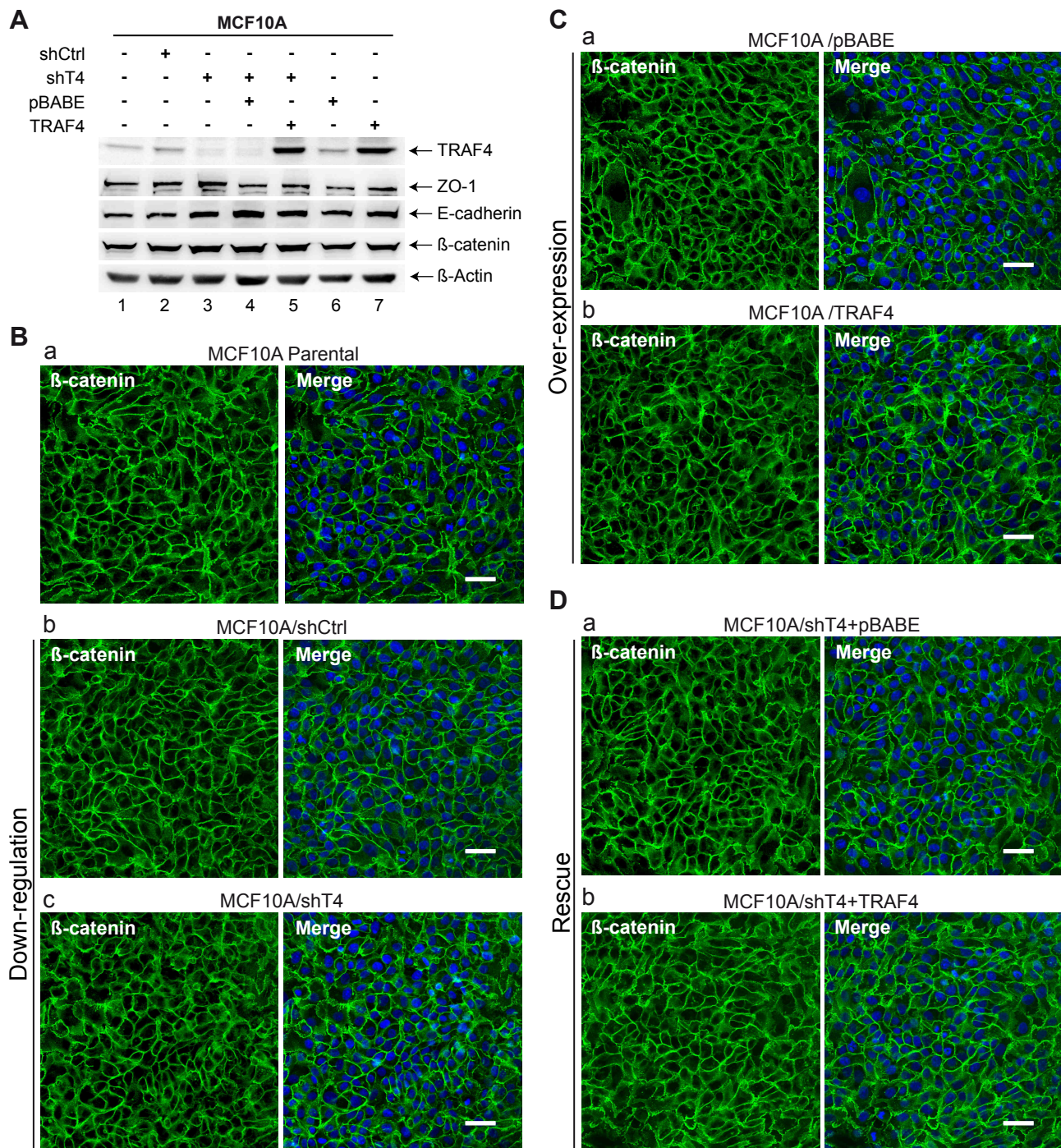


Figure S1: TRAF4 does not impact on adherens junctions in MCF10A cells

A. Western-blot analysis of adherens junction (AJ) and TJ proteins in parental and in established MCF10A cell lines (Figure 1A).

B-D The presence of AJ was estimated by the presence of membrane-bound β -catenin staining in the different cell lines of TRAF4 loss-of function (B), gain of function (C) and rescue experiments (D). Left panels are representative confocal sections of β -catenin staining (green) and right panels are merges with Hoechst staining (blue). Scale bar: 20 μ m.

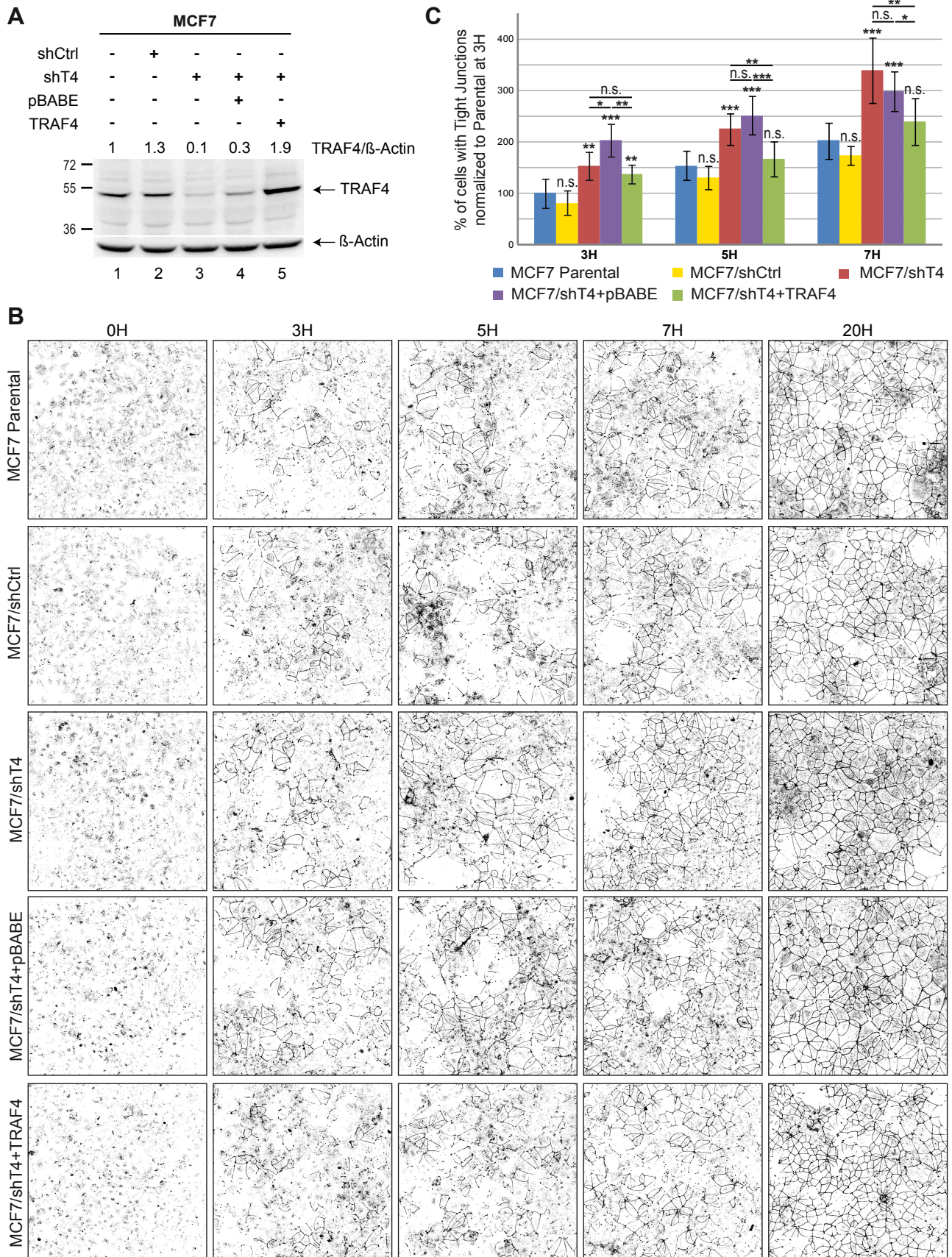


Figure S2: TRAF4 knock-down accelerates TJ reassembly in MCF7 cells

A. Western-blot analysis of TRAF4 expression. In MCF7 cells, TRAF4 expression has been silenced (lanes 3-5) and restored in silenced cells (lane 5). Parental (lane 1), control sh (lane 2) together with a TRAF4 silenced line transduced with the empty vector (lane 4) were used as controls. TRAF4 expression levels were normalized to control parental cells using β -actin as loading control; values are indicated on the top.

B. Calcium switch assay in MCF7 cells. This assay involves the disruption of epithelial junctions by extracellular calcium removal followed by a rapid reassembly triggered by calcium repletion. Representative confocal image of ZO-1 staining at 0, 3, 5, 7 and 20H after calcium repletion are shown from left to right, respectively (inverted grey look-up table).

C. TJ quantification at 3, 5 and 7H after calcium repletion. Score representing the number of cells with a continuous ZO-1 staining, normalized to parental MCF7 cells (percentage). Ten microscopic fields were used for the quantification.

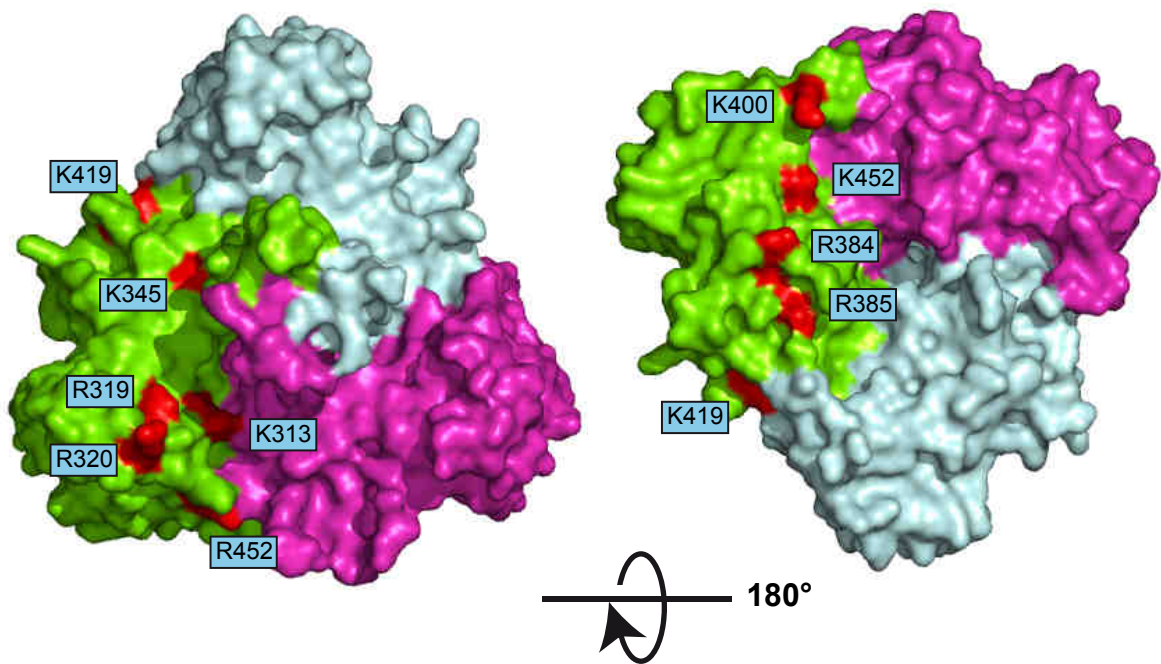


Figure S3: Crystal structure representing exposed basic residues of the TRAF domain of TRAF4 selected for mutagenesis

Top view (left) and bottom view (right) of the surface representation of the TRAF domain of TRAF4. The three TRAF monomers are colored in magenta, cyan and green, respectively. Surface exposed basic residues selected for the mutagenesis assay are colored in red.

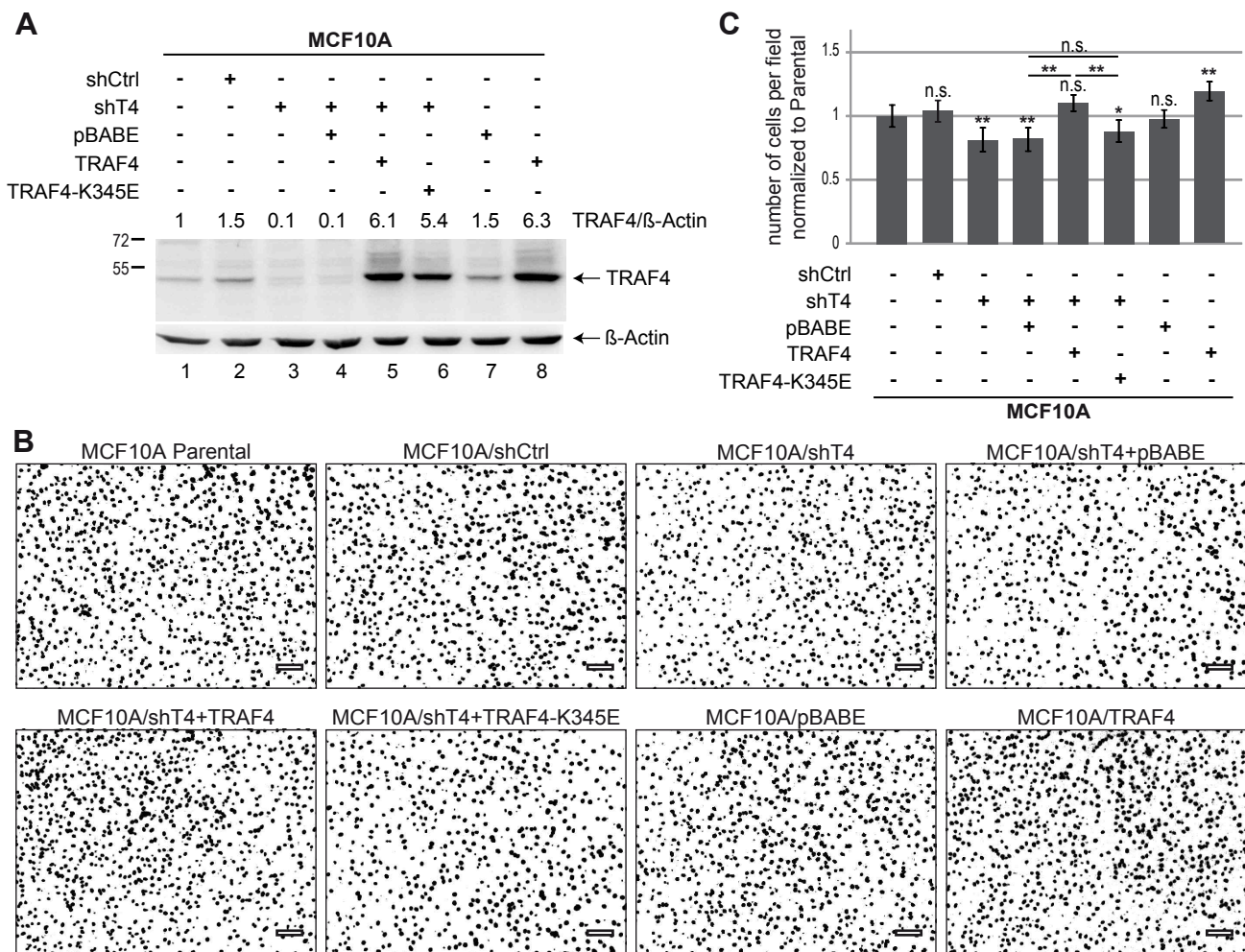


Figure S4: TRAF4 stimulates migration of MCF10A cells

A. Western-blot analysis of TRAF4 expression. In MCF10A cells, TRAF4 expression has been silenced (lanes 2-6), increased (lane 8) and restored in silenced cells using the WT (lane 5) and the K345E mutant (lane 6). Parental (lane 1), control shRNA (lane 2), control expression vector (lane 7) together with a TRAF4 silenced line transduced with the empty vector (lane 4) were used as controls. TRAF4 expression levels were normalized to control parental cells using β-actin as loading control; values are indicated on the top.

B. Representative microscopic field of the bottom side of the transwell. Migrating cell nuclei were stained with Hoechst and images are shown as inverted look-up table.

C. Histogram representing the quantification of cell migration in MCF10A cells. The number of cells that migrated were counted and normalized to control parental cells. 36 microscopic fields from three independent experiments were used for the quantification.

PDB code	3ZJB
Data collection	
Beamline	ID23eh2, ESRF
Space group	P 21
Unit cell dimensions	a = 54.62Å, b = 85.44Å, c = 61.65Å, β = 108.08°
Resolution (Å)	58 – 1.85 (1.88 – 1.85)
Rmerge †	0.085 (1.289)
CC ½ (%)	99.6 (45.7)
I/σ(I)	10.8 (1.04)
Completeness (%)	97.3 (73.9)
No. reflection	162719 (4922)
No. unique reflections	45129 (2114)
Redundancy	3.6 (2.3)
Wilson B	20.8
Refinement	
R _{work} /R _{free}	0.1632 / 0.1995
No. atoms	4932
Protein	4354
Ion	3
Water	575
B factors (Å ²)	
Protein	30.57
Ion	55.24
Water	39.47
R.m.s.d. from ideal geometry	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angles (°)	1.04
Ramachandran plot (%) ‡	
Favoured	97.3
Allowed	2.7
Disallowed	0
† Rmerge = $\frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle }{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity of equivalent reflections. ‡ Ramachandran plot statistics were calculated by RAMPAGE (Lovell <i>et al.</i> , 2003).	

Table S1: Data collection and refinement statistics
Values in parenthesis are for the outermost resolution shell.

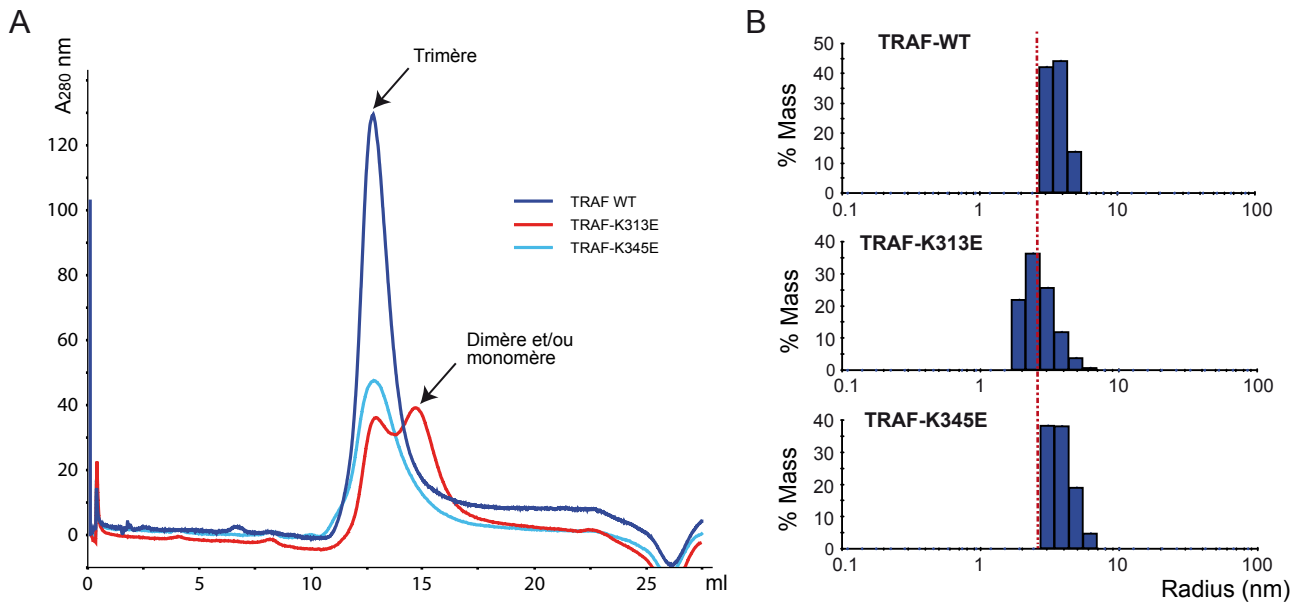


Figure 32 : Les mutants K313E et K345E du domaine TRAF de TRAF4 peuvent toujours se trimériser

A. Analyse des domaines TRAFs recombinants sauvage et mutants par chromatographie d'exclusion stérique. Cinq cent µl de chaque protéine recombinante ont été chargés sur une colonne Superdex 16/60 S200 (TRAF WT : 1 mg/ml; TRAF TRAF-K313E : 0.5 mg/ml; TRAF-K345E : 0.5 mg/ml). A l'instar du domaine TRAF sauvage, le mutant K345E est exclusivement présent sous forme trimérique. Le mutant K313E est, quant à lui, présent sous deux formes différentes : une forme trimérique et une forme plus petite (dimérique et/ou monomérique).

B. Analyse des domaines TRAF recombinants sauvage et mutants par DLS (Dynamic light scattering). Les mesures de DLS ont été réalisées à 25°C avec les domaines TRAF recombinants sauvage et mutant à 20 µM. Le mutant K345E a un rayon moyen similaire à celui du domaine TRAF sauvage. Le mutant K313E a un rayon moyen plus petit suggérant un mélange de trimère et de particules plus petites (dimère et/ou trimère).

1.3. ADDENDA DE L'ARTICLE

1.3.1. Les domaines TRAFs mutants forment toujours du trimère

L'analyse biochimique et structurale du domaine TRAF de TRAF4 recombinant a montré que ce domaine est présent en solution sous forme d'homotrimère. Par ailleurs, le remplacement des lysines 313 et 345 par des résidus acides n'affectait pas sa structure secondaire (Rousseau et al., Figure 3). Afin de vérifier que ces changements n'affectent pas la structure quaternaire du domaine TRAF de TRAF4, nous avons étudié la trimérisation des domaines TRAFs sauvage et mutants par chromatographie d'exclusion stérique et par Dynamic Light Scattering (DLS) (Figure 32).

La chromatographie d'exclusion stérique (Gel Filtration) est une méthode de séparation des molécules en fonction de leur volume hydrodynamique (Hagel, 2011; Striegel and Brewer, 2012). En effet, les molécules de faible masse volumique peuvent pénétrer les pores des particules du gel, tandis que celles de forte masse volumique contournent ces particules. Cela se traduit par un retard dans la colonne des petites molécules tandis que les plus grosses s'écouleront en premier. L'analyse des domaines TRAF par cette méthode a permis de montrer que, à l'instar du domaine TRAF sauvage, le mutant TRAF-K345E est présent uniquement sous forme trimérique (Figure 32A). Le mutant TRAF-K313E est présent sous deux formes : l'une trimérique et l'autre de plus petit volume, probablement dimérique et/ou monomérique (Figure 32A). Ces résultats montrent que la mutation de la lysine 345 n'affecte pas la capacité à former du trimère tandis que la mutation de la lysine 313 engendre une déstabilisation partielle du trimère de TRAF.

Les domaines TRAFs sauvage et mutants ont ensuite été analysés par DLS, une technique d'analyse spectroscopique permettant de mesurer la taille de particules en suspension (Berne and Pecora, 2000). Le domaine TRAF-K345E, avec un rayon moyen de 4.5 nm, est de taille similaire à celle du domaine TRAF sauvage ($R_m = 4.2$ nm) (Figure 32B). En revanche, le mutant TRAF-K313E a un rayon moyen plus petit ($R_m = 3.6$ nm) (Figure 32B). Ces résultats montrent que, à l'instar du domaine TRAF sauvage, le mutant TRAF-K345E est exclusivement présent sous forme trimérique. Le mutant TRAF-K313E a, quant à lui, un rayon moyen plus petit suggérant qu'il est présent à la fois sous forme trimérique et sous forme dimérique et/ou monomérique.

Ensemble, ces données montrent que la mutation de la lysine 345 en acide glutamique n'affecte pas la structure quaternaire du domaine TRAF recombinant, tandis que la même

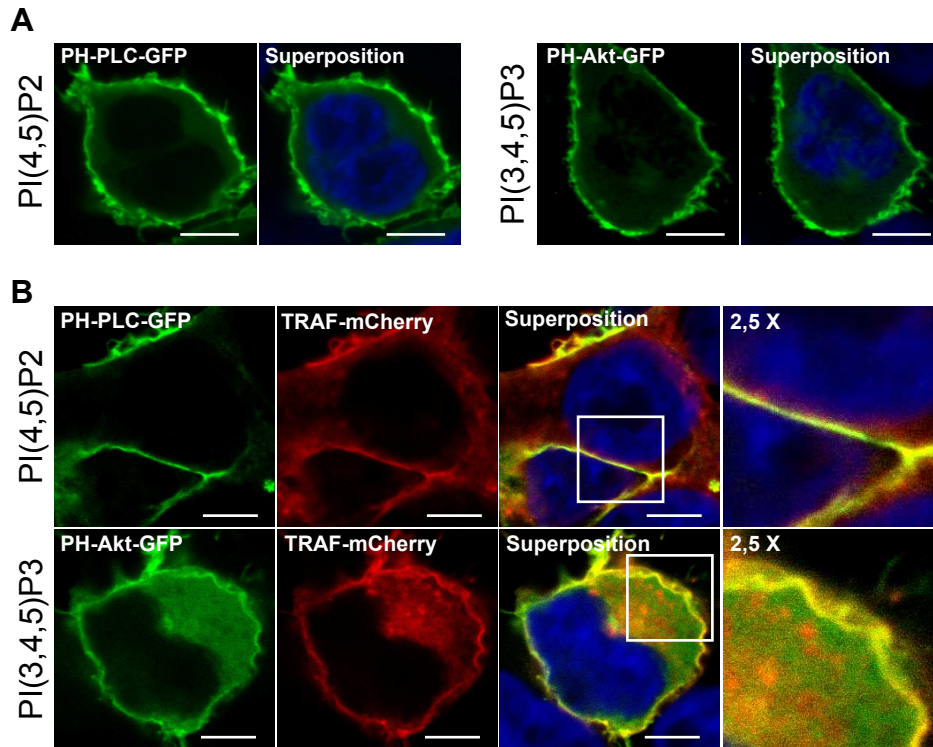


Figure 33: Le domaine TRAF de TRAF4 est recruté dans des domaines membranaires enrichis en PIPs au sein des cellules HEK293T

A. Les cellules humaines de rein embryonnaire tumorales HEK293T ont été transfectées avec les domaines PH (Pleckstrin Homology) de la phospholipase C delta (PH-PLC-GFP, gauche) et de la protéine Akt (PH-Akt-GFP, droite) fusionnés à la GFP (vert). Les domaines PH-PLC-GFP et PH-Akt-GFP sont des marqueurs du PI(4,5)P2 et du PI(3,4,5)P3, respectivement. Les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 5 μ m.

B. Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec le domaine TRAF de TRAF4 fusionné à la protéine mCherry (rouge) et les domaines PH (Pleckstrin Homology) de la phospholipase C (PH-PLC-GFP, haut) et de la protéine Akt (PH-Akt-GFP, bas) fusionnés à la GFP (vert). Les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). L'image de droite correspond à un agrandissement de 2.5x. Barre d'échelle : 5 μ m. TRAF4 colocalise avec les protéines PH-PLC-GFP et PH-Akt-GFP.

mutation sur la lysine 313 engendre déstabilisation partielle. Néanmoins, le domaine TRAF-K313E recombinant est en solution présent à part égale sous forme trimérique et dimérique/monomérique, ce qui suggère que l'atteinte de la structure quaternaire ne peut pas, à elle seule, expliquer la diminution de 5 fois de l'interaction entre le TRAF-K313E et les PIPs. Ces méthodes biochimiques indiquent que la mutation de la lysine 313 ou de la lysine 345 n'affecte pas de manière significative la structure de la protéine recombinante produite et que l'absence de liaison aux PIPs mesurée pour ces mutants reflète bien l'absence d'interaction spécifique et non un mauvais repliement.

1.3.2. Le domaine TRAF de TRAF4 est localisé dans des régions riches en PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3 dans les cellules non polarisées

Des sondes permettant de marquer spécifiquement un sous-type de PIP au sein de la cellule, ont récemment été développées (Balla, 2007; Halet, 2005). Il a notamment été décrit que le domaine PH (Pleckstrin Homology) de la phospholipase C delta fusionné à la GFP (PH-PLC-GFP) permet la détection du PI(4,5)P2 tandis que le domaine PH de la protéine Akt fusionné à la GFP (PH-Akt-GFP) sert à la détection du PI(3,4,5)P3 (Balla, 2007; Balla and Varnai, 2009). Une analyse de la localisation subcellulaire du domaine TRAF de TRAF4 dans des cellules épithéliales mammaires MCF7 a montré qu'il colocalise avec les sondes GFP-PH-PLC-GFP et PH-Akt-GFP (Rousseau et al., Figure 5B). Ce résultat indique que le domaine TRAF de TRAF4 est recruté dans des membranes enrichies en PIPs. Afin de confirmer ce résultat dans un second système cellulaire non polarisé, nous avons réalisé la même expérience au sein des cellules embryonnaires de rein humain HEK293T. Les sondes PH-PLC-GFP et PH-Akt-GFP sont localisées à la membrane plasmique, ce qui est cohérent avec la localisation subcellulaire du PI(4,5)P2 et du PI(3,4,5)P3 (Figure 33A) (Balla and Varnai, 2009). Nous avons observé que le domaine TRAF de TRAF4 colocalise également avec les sondes PH-PLC-GFP et PH-Akt-GFP dans les cellules HEK293T (Figure 33B). Ces données montrent que le domaine TRAF de TRAF4 est recruté au sein des membranes enrichies en PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3, et ce dans différents contextes cellulaires.

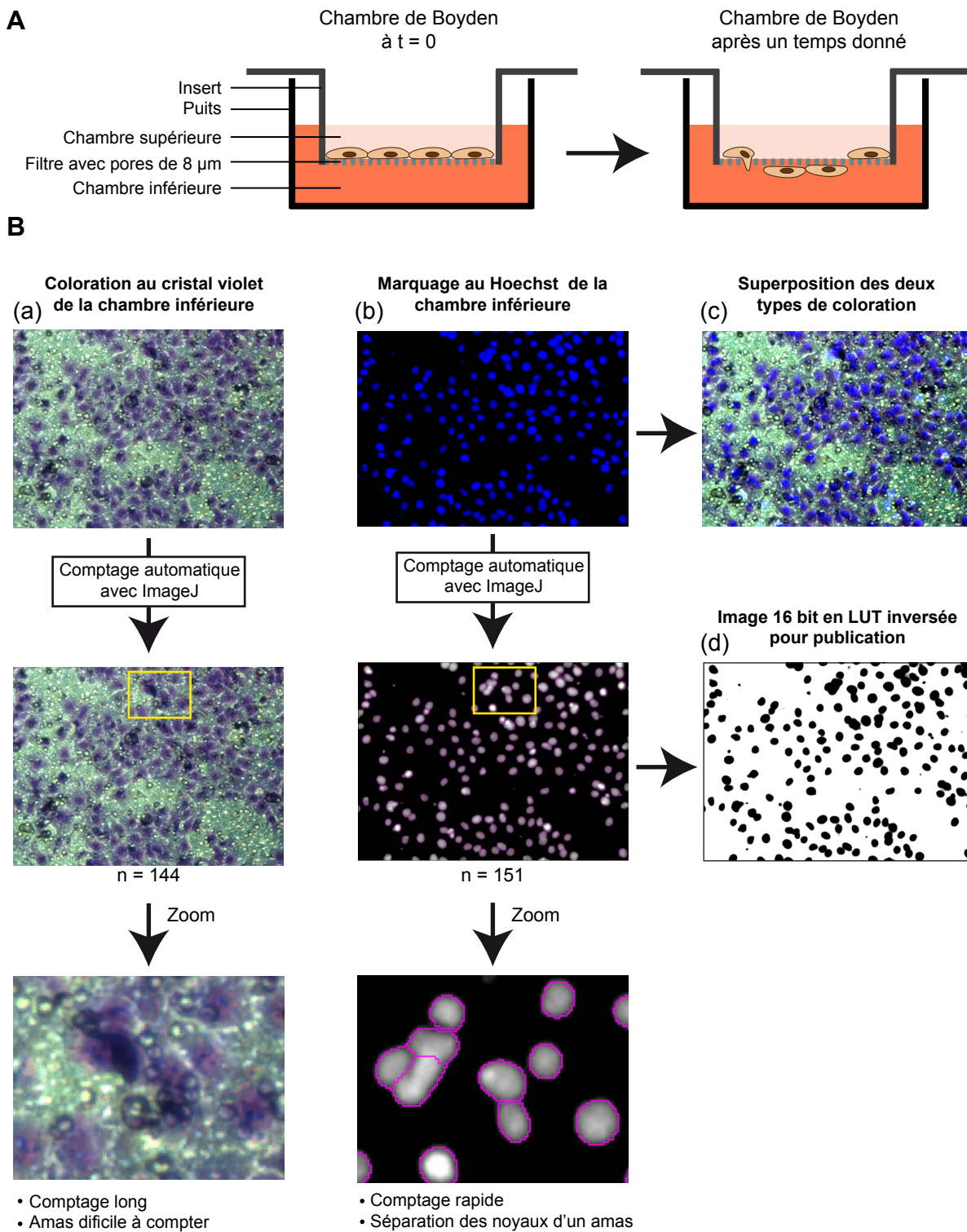


Figure 34: Validation de l'usage d'une coloration au Hoechst pour le test de la chambre de Boyden

A. Représentation schématique des chambres de Boyden. Cette technique utilise des inserts qui sont placés dans les puits des plaques de culture cellulaire. Les deux chambres de culture, supérieure et inférieure, sont séparées par un filtre possédant des pores de 8 μm .

B. Quantification de la migration cellulaire par le test de la chambre de Boyden en utilisant la méthode conventionnelle de coloration au cristal violet et par la méthode alternative au Hoechst. Brièvement, les cellules MCF10A sont déposées dans la chambre supérieure contenant un milieu pauvre en sérum. Les cellules migrent et traversent le filtre pour se retrouver sur le côté inférieur. Pour les cellules MCF10A, la migration est arrêtée au bout de 16h par fixation des cellules à l'éthanol absolu. Les cellules présentes du côté supérieur du filtre sont éliminées, les noyaux des cellules positionnées du côté inférieur du filtre sont marqués au Hoechst puis au cristal violet. Des images couvrant le filtre inférieur sont ensuite acquises en microscopie optique inversée, les noyaux sont comptés à l'aide du logiciel Image J pour la coloration au Hoechst (a) et manuellement (b) pour la coloration au cristal violet. La superposition des images montre que la coloration au Hoechst est complètement corrélée avec celle réalisée au cristal violet (c). Le comptage automatique est plus précis et plus rapide ce qui permet également de prendre un nombre de champs plus élevé ce qui augmente la puissance statistique. La transformation de l'image de fluorescence en mode LUT (Lookup Table) inversé (d) peut être utilisée pour illustrer l'expérience.

1.3.3. Effet pro-migratoire de TRAF4 dans des cellules mammaires non cancéreuses : les cellules MCF10A

1.3.3.1. Mise au point d'une méthode standardisée de quantification de la migration cellulaire

Notre étude fonctionnelle a permis de mettre en évidence que TRAF4, en plus d'être un régulateur négatif des jonctions serrées, stimule la migration des CEMs (Rousseau et al., Figures 7 et S4). Pour cela, une analyse de la migration des cellules MCF7 et MCF10A a été réalisée par la technique des chambres de Boyden (Bindels et al., 2006; Buache et al., 2011). Cette technique utilise des inserts qui sont placés dans les puits des plaques de culture cellulaire. Ainsi, deux chambres de culture, l'une supérieure et l'autre inférieure, sont séparées par le filtre de l'insert possédant des pores de 8 μm (Figure 34A). Les cellules sont placées dans la chambre supérieure contenant un milieu pauvre. La chambre inférieure possède, quant à elle, un milieu riche permettant l'établissement d'un gradient. Les cellules de la chambre supérieure migrent par chimiotactisme à travers les pores du filtre vers le compartiment inférieur contenant le milieu de culture le plus riche (Figure 34A). Après un temps donné, qui dépend du type cellulaire, la migration est arrêtée par fixation des cellules à l'éthanol absolu. Les cellules sont ensuite colorées au cristal violet. Après avoir enlevé les cellules présentes sur le côté supérieur du filtre, les cellules présentes sur la face inférieure sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé. Le nombre de cellule est ensuite compté manuellement sur chacune des images. L'utilisation du cristal violet a néanmoins plusieurs inconvénients. En effet, l'usage de ce colorant laisse très souvent un bruit de fond et les cellules d'un amas ne peuvent être distinguées les unes des autres, rendant la quantification difficile. De ce fait, nous avons mis au point une méthode alternative facile à mettre en œuvre employant une coloration des noyaux cellulaires au Hoechst. En plus de palier aux inconvénients du cristal violet, ce marquage fluorescent permet une quantification automatique des cellules à l'aide du logiciel ImageJ.

Afin de valider l'usage du colorant Hoechst-33258 pour la détection et la quantification des cellules, nous avons étudié la corrélation entre les deux types de marquage. Pour cela, nous avons réalisé deux colorations successives des cellules, la première au Hoechst et la seconde au cristal violet (Figure 34B). Des champs cellulaires représentatifs ont été acquis en microscopie optique inversée après chacune des colorations. La superposition des images montre une corrélation complète entre les deux types de marquage (Figure 34B). Ce résultat démontre que le colorant Hoechst peut être utilisé en remplacement du cristal violet. De plus,

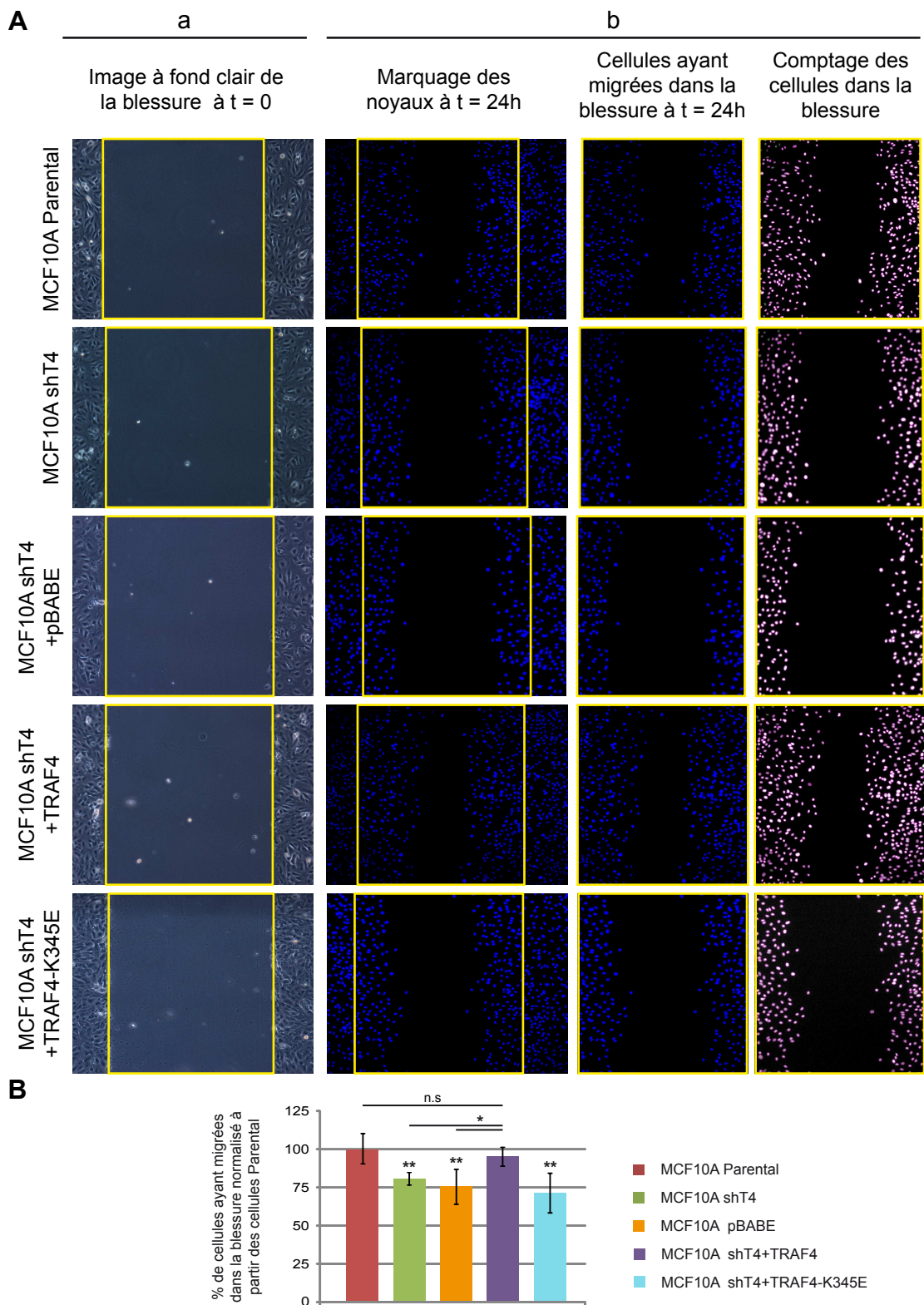


Figure 35 : TRAF4 a un effet pro-migratoire au sein des cellules MCF10A

A. Analyse de la migration cellulaire des différentes lignées cellulaires MCF10A par un test de cicatrisation (Wound-Healing). Une blessure est réalisée à l'aide d'une pointe de micropipette et le recouvrement de la blessure par les cellules est ensuite observé après 24H en microscopie optique inversée (a) et après marquage des noyaux au Hoechst-33258 (b). Une image de la blessure est acquise à t=0 afin d'avoir une mesure précise de la zone sans cellules (cadre jaune). Le nombre de cellules ayant migré dans la blessure à t=24H est compté avec ImageJ.

B. Représentation en histogramme de la migration des différentes lignées cellulaires MCF10A. Le test de cicatrisation est réalisé en triplicata et la significativité est mesurée avec un t-test de Student (* P < 0.5 ; ** P < 0.01).

les noyaux cellulaires peuvent être comptés automatiquement en utilisant le module d'extension « Nucleus counting » du logiciel ImageJ. En définissant les seuils correspondant à la taille maximale et minimale des noyaux pris en compte, ce plugin permet même de séparer les noyaux des cellules d'un même amas. De plus, ce mode de quantification est beaucoup plus rapide que le comptage manuel, ce qui permet d'augmenter le nombre de champs analysés et ainsi de gagner en puissance statistique.

1.3.3.2. TRAF4 a un effet pro-migratoire sur les cellules MCF10A

L'effet pro-migratoire de TRAF4 sur les cellules épithéliales mammaires MCF10A a été mis en évidence par la technique des chambres de Boyden (Rousseau et al., Figure S4). Des tests de cicatrisation ont été réalisés au sein des mêmes lignées cellulaires mais ils n'ont pas été inclus dans l'article. Lors de ces tests, la même quantité de cellules a été déposée dans des plaques six puits. A confluence, une blessure a été réalisée à l'aide d'une pointe de cône de micropipette, des images ont ensuite été acquises à l'aide d'un microscope optique inversé (Figure 35 : t=0). Les cellules ont ensuite été replacées dans un incubateur pendant 24H. Le recouvrement de la blessure par les cellules a été observé en microscopie optique inversée suite au marquage des noyaux au Hoechst (Figure 35 : t=24). Afin de mesurer la migration cellulaire, les cellules ayant migré au niveau de la zone correspondant à la blessure à t=0 (cadre jaune) ont été comptées automatiquement à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 35A). Nous avons observé, comme précédemment, que la sous-expression de TRAF4 (MCF10A shT4) conduit à une diminution de la migration des cellules MCF10A (Figure 35). De manière intéressante, la réexpression de TRAF4 (MCF10A shT4+TRAF4) restaure un niveau de migration similaire aux cellules MCF10A parentales tandis que le contrôle vecteur vide (MCF10A shT4+pBABE) n'a aucun effet. Cette seconde méthode confirme que TRAF4 a un effet pro-migratoire dans les cellules MCF10A.

Nous avons montré que TRAF4 lie les PIPs via son domaine TRAF et que cette interaction est requise pour l'effet pro-migratoire de TRAF4 (Article : Figure 7 et Figure S4). Afin de renforcer ce résultat, nous avons étudié si l'expression du mutant TRAF4-K345E ne liant plus les PIPs au sein des cellules déficientes en TRAF4 (MCF10A shT4+TRAF4-K345E) pouvait restaurer une migration normale des cellules. Tandis que la réexpression de la protéine TRAF4 sauvage restaure une migration cellulaire normale, celle du mutant TRAF-K345E ne liant pas les PIPs n'a aucun effet (Figure 35).

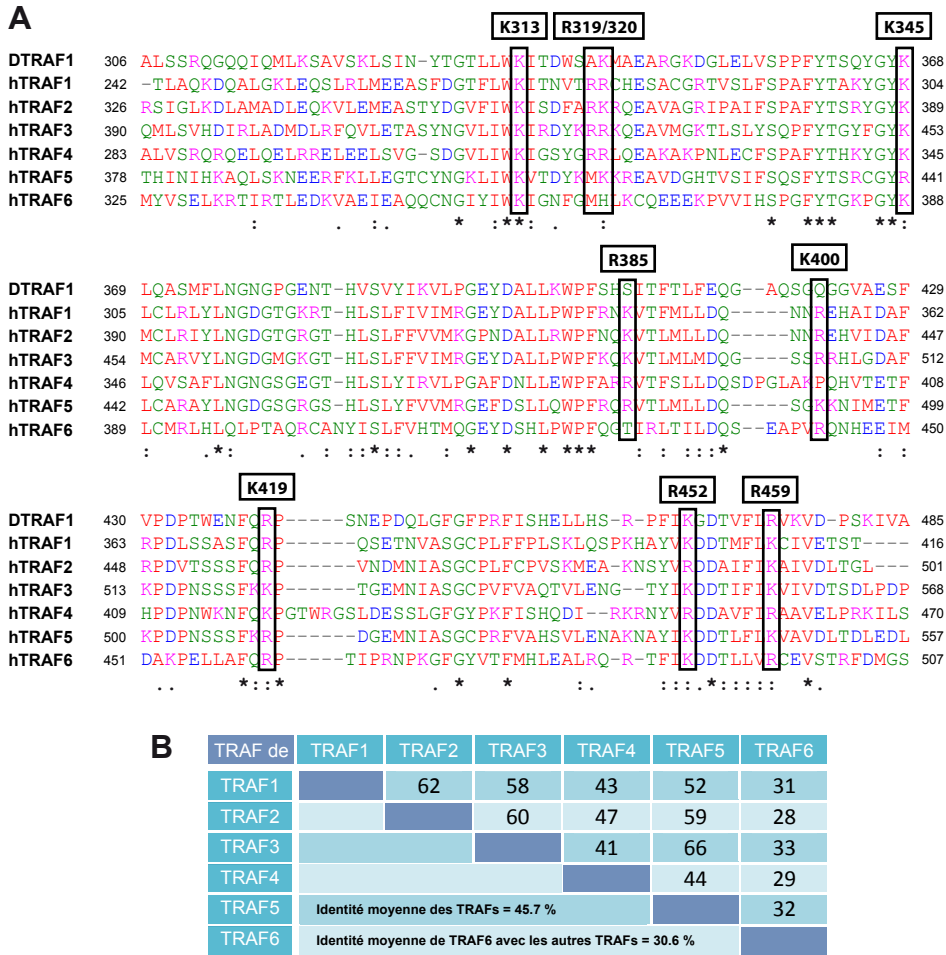


Figure 36: Analyse comparative des TRAFs

A. Alignement des séquences protéiques des domaines TRAF de TRAF1 à TRAF6 et de DTRAF1. Les acides aminés identiques sont marqués par un astérisque. Les changements conservatifs (même propriété physico-chimique) et non-conservatifs (architecture similaire) sont indiqués par un double point et un point unique, respectivement. Les petits acides aminés ainsi que les résidus aromatiques, excepté la tyrosine, sont colorés en rouge. Les acides aminés acides et basiques sont colorés en bleu et en magenta, respectivement. Les résidus hydrophiles et la tyrosine sont colorés en vert.

B. Tableau récapitulatif représentant les pourcentages d'homologie (identité) entre les différents domaines TRAFs de TRAF1 à TRAF6.

Ensemble, ces données confirment que TRAF4 a un effet pro-migratoire au sein des CEMs et que l'interaction entre TRAF4 et les lipides de la famille des PIPs est associée à cette fonction.

1.4. LE DOMAINE TRAF EST UN NOUVEAU DOMAINE DE LIAISON AUX LIPIDES

1.4.1. La liaison aux PIPs est un mécanisme conservé au sein de la famille TRAF

Tous les membres de la famille TRAF, excepté TRAF7, possèdent un domaine TRAF en carboxy-terminal. Ce domaine est le plus conservé au sein de la famille des protéines TRAFs (Wajant et al., 2001). L'alignement des domaines TRAFs de TRAF1 à TRAF6 avec une identité moyenne de 45.7% (Figure 36) indique la conservation de ce domaine. Le domaine TRAF de TRAF6 est le plus divergent avec seulement 30,6% d'identité moyenne avec les autres TRAFs (Figure 36). Cette forte conservation du domaine TRAF suggère que les autres domaines TRAFs puissent également lier les lipides.

Parmi les lipides, les phosphoinositides (PIPs) sont connus pour réguler plusieurs processus fondamentaux au sein de la cellule, comme le trafic membranaire, la prolifération et le remodelage du cytosquelette. Cette fonction régulatrice est généralement attribuée à leur capacité à contrôler la localisation subcellulaire et l'activation de diverses protéines effectrices qui possèdent un domaine de liaison aux PIPs (Vicinanza et al., 2008). Nous avons montré que TRAF4 lie les PIPs via son domaine TRAF (Rousseau et al., Figure 2). Afin de savoir si la liaison aux PIPs est spécifique de TRAF4 ou commune à l'ensemble des protéines TRAFs, des protéines recombinantes correspondant aux domaines TRAFs de TRAF1 à TRAF6 flanqués par l'étiquette 6His (six histidines) et par l'étiquette TAP (Tandem Affinity Purification) (Degot et al., 2004) à leurs extrémités respectives, ont été produits chez la bactérie. L'étiquette TAP est constituée de deux domaines protéiques : le domaine de liaison à la région constante des immunoglobulines de la protéine A qui, ici, sert à la détection des protéines recombinantes et le domaine de liaison à la calmoduline CBP (Calmodulin Binding Peptide) (Puig et al., 2001). En ce qui concerne l'étiquette six histidines, elle est capable d'interagir fortement avec des ions métalliques comme le nickel. Les étiquettes 6His et CBP ont permis la réalisation de deux chromatographies d'affinité consécutives, ce qui permet d'augmenter la pureté des protéines recombinantes obtenues. Afin d'avoir un contrôle négatif des expériences de liaison aux lipides, une protéine constituée de l'étiquette TAP fusionnée au

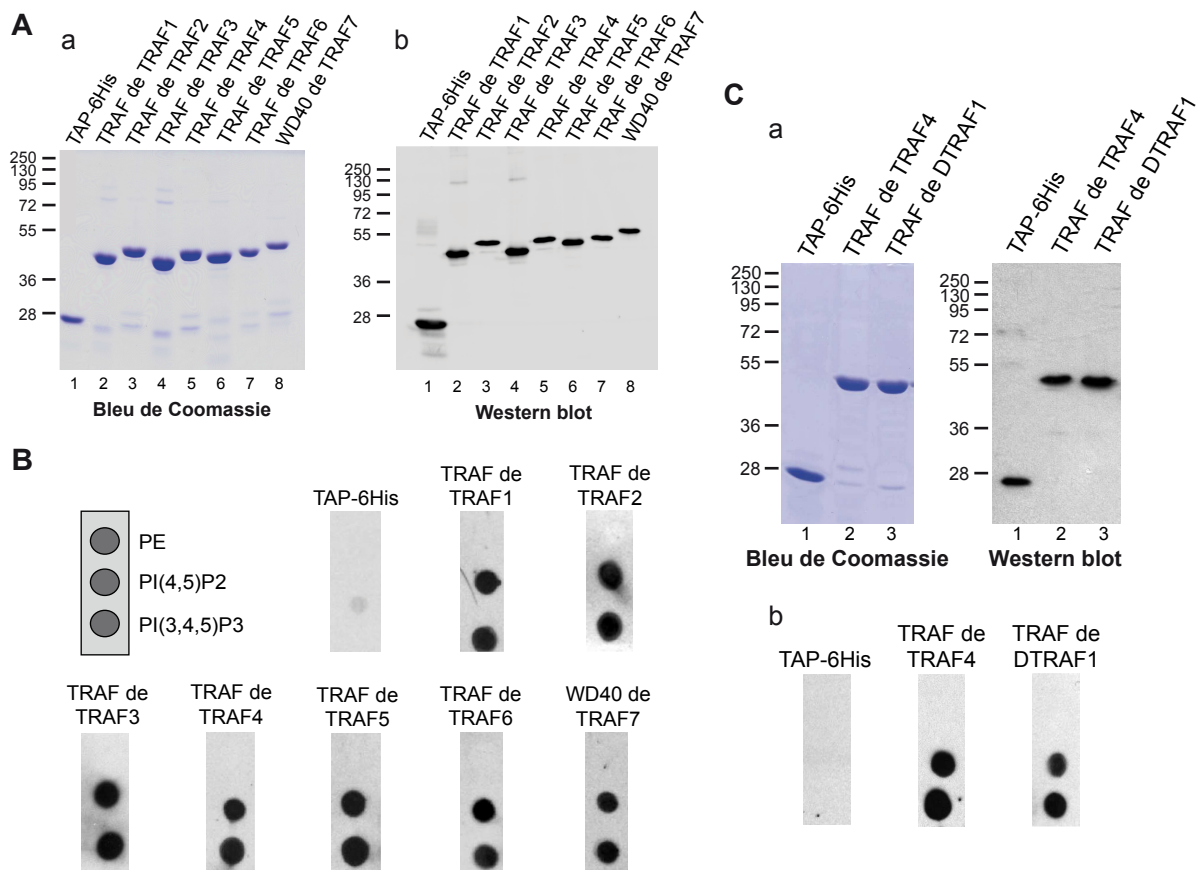


Figure 37: La liaison aux PIPs est un mécanisme conservé chez les TRAFs

A. Analyse des différents domaines TRAFs (1 à 6) et du domaine WD40 de TRAF7 recombinants par marquage au bleu de Coomassie (a) et par Western blot (b). Pour le Western blot, la détection des protéines recombinantes se fait par l'intermédiaire d'un anticorps polyclonal de lapin qui est reconnu par le domaine de liaison à la région constante des immunoglobulines de la protéine A de l'étiquette TAP.

B. Etude de l'interaction entre les différents domaines TRAFs (TRAF1 à TRAF6) et le domaine WD40 de TRAF7 avec les PIPs immobilisés sur une membrane. Une représentation schématique de la membrane sur laquelle des lipides ont été adsorbés est présentée à gauche. PE : Phosphatidylethanolamine; PI(3,5)P2 : Phosphatidylinositol-(3,5,-)bisphosphate; PI(3,4,5)P2 : Phosphatidylinositol-(3,4,5,-)trisphosphate. Les protéines recombinantes correspondant aux deux étiquettes seules (TAP et 6His) et au domaine TRAF de TRAF4 ont servi respectivement de contrôle négatif et positif. Tous les TRAFs interagissent avec les PIPs.

C. (a) Analyse des domaines TRAF recombinants purifiés de TRAF4 et de l'orthologue de drosophile DTRAF1 par marquage au bleu de Coomassie et par Western blot. (b) Etude de l'interaction des domaines TRAF de TRAF4 et DTRAF1 avec les PIPs. Le domaine TRAF de l'orthologue de TRAF4 chez la drosophile, DTRAF1, lie les PIPs.

6His (TAP-6His) a également été produite (Figure 37). La qualité de la purification des protéines recombinantes a été analysée par coloration au Bleu de Coomassie (Figure 37A) et par Western-Blot (Figure 37B). La double purification est très efficace ; les protéines recombinantes obtenues sont très pures (Figure 37A). Comme l'indique le Western-Blot, ces protéines correspondent bien aux fusions TAP-tag, car elles sont détectées par un anticorps polyclonal de lapin non spécifique qui est lié par l'étiquette TAP (domaine de liaison à la protéine A). Ce système de détection permet la mise en évidence de l'ensemble des protéines recombinantes avec l'usage d'un seul et même anticorps, il est donc parfaitement adapté à la méthode du Lipid Overlay (Dowler et al., 2002). De plus, l'intensité du signal sera directement proportionnelle à la quantité de protéine recombinante liée (Figure 37B).

L'interaction entre les protéines recombinantes et les lipides a été étudiée par la technique du Lipid Overlay. Pour cela, les protéines recombinantes ont été incubées avec des membranes de nitrocellulose sur lesquelles des lipides ont été préalablement adsorbés. Après lavage, les protéines liées sont détectées avec un anticorps polyclonal de lapin (cf plus haut). Comme le montre la figure 37, le contrôle négatif (TAP-6His) ne lie aucun lipide tandis que le domaine TRAF de TRAF4 interagit spécifiquement avec les PIPs (Figure 37B). De manière intéressante, l'ensemble des domaines TRAFs des paralogues de TRAF4 lie les PIPs (Figure 37B). Ces résultats montrent que la liaison aux PIPs est un mécanisme conservé au sein de la famille TRAF.

Le septième membre de la famille TRAF possède un domaine de type « WD40 repeat » à la place du domaine TRAF. Ce domaine est caractérisé par la répétition de 4 à 16 motifs WD d'environ 40 acides aminés qui se terminent souvent par le dipeptide W-D (Tryptophane-Aspartate). Le domaine WD40 repeat est majoritairement impliqué dans la formation des complexes protéiques en servant de plateforme rigide pour l'ancrage d'autres protéines. L'étude de l'interaction entre le domaine WD40 repeat de TRAF7 et les lipides a montré que ce domaine, à l'instar du domaine TRAF, lie les PIPs (Figure 37B). Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature qui ont montré que d'autres protéines comme WIPI-1 (WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides-1) lie les PIPs via son domaine WD40 repeat (Jeffries et al., 2004). Ensemble, ces résultats montrent que tous les membres de la famille TRAF interagissent avec les PIPs via un domaine positionné en C-terminal TRAF ou WD40.

Les TRAFs sont des protéines fortement conservées au cours de l'évolution (Zapata et al., 2007). Chez la drosophile, trois TRAFs différents ont été décrits dont l'orthologue de TRAF4, DTRAF1 (Grech et al., 2000). Afin de savoir si la liaison aux PIPs de TRAF4 est

A

		K313		Y338		K345		
hyTRAF1	257	FIWPIKRFRQ	QFELARNSDEE	I	AVFSQPFY	TSQYGYKLR	IK	297
ceTRAF	267	LIWKIDKLQ	QRTNEAK-SG	ADTTIF	SVPFMSHR	FGYKMMAC		304
ciTRAF4	310	LLWKIPGYS	QLQAAQ-KD	QAIEMR	SPPFYTHR	YGYKLQLS		349
ciTRAF6	425	YYWKIKDYA	QLRRAAC-L	GEMPVL	HSPGFY	TSPQGYRMC	IR	464
DTRAF1	324	LLWKITDWS	AKMAEAR-G	KDGL	ELVSPPFY	TSQYGYKLQ	AS	363
DTRAF2	332	IVWRIEQL	GALVARLR-	ANANNQ	VYSHECY	TSPHGYKFC	AR	371
xtTRAF4	310	LIWKISDYS	SRKVQEAK-	VRGNF	ESFSPPFY	THKYGYKLQ	VS	349
xlTRAF4a	310	LIWKISDYS	SRKVQEAK-	VRGNF	ESFSPPFY	THKYGYKLQ	VS	349
xlTRAF4b	310	LIWKISDYS	SRKVQEAK-	VRGNF	ESFSPPFY	THKYGYRLQ	VS	349
xtTRAF6	389	FIWRINNF	NLLKNQE-E	ERPVI	IHSQGFY	TGKPGYKLC	LR	428
xlTRAF6a	387	FIWRIKGFS	GLQKSQE-E	EKPVI	IHSQGFY	TGDPGYKLC	LR	426
xlTRAF6b	387	FIWKIKGFS	GLQKTQE-E	EKPVI	IHSQGFY	TGKPGYKLC	LR	426
hsTRAF1	269	FLWKITNV	TRRCHESA-	CGRTV	SLFSPA	FYTAKYGYKLC	LR	308
hsTRAF2	354	FIWKISDF	FARKQEAV-	AGRIPA	IFSPA	FYTSRYGYKM	CLR	393
hsTRAF3	418	LIWKIRDY	KRRQEAV-	MGKTL	SLYSQ	FYTGDFGYKMC	AR	457
hsTRAF4	310	LIWKIGSY	GRRLQEAK-	AKPNL	ECFSPA	FYTHKYGYKLQ	VS	349
hsTRAF5	406	LIWKVTDY	KMKREAV-	DGHTV	SIFSQ	FYTSRCGYRLC	AR	445
hsTRAF6	353	YIWKIGNF	GMHLKQE-E	EKPVI	IHSQGFY	TGKPGYKLC	MR	392

* : * : **::

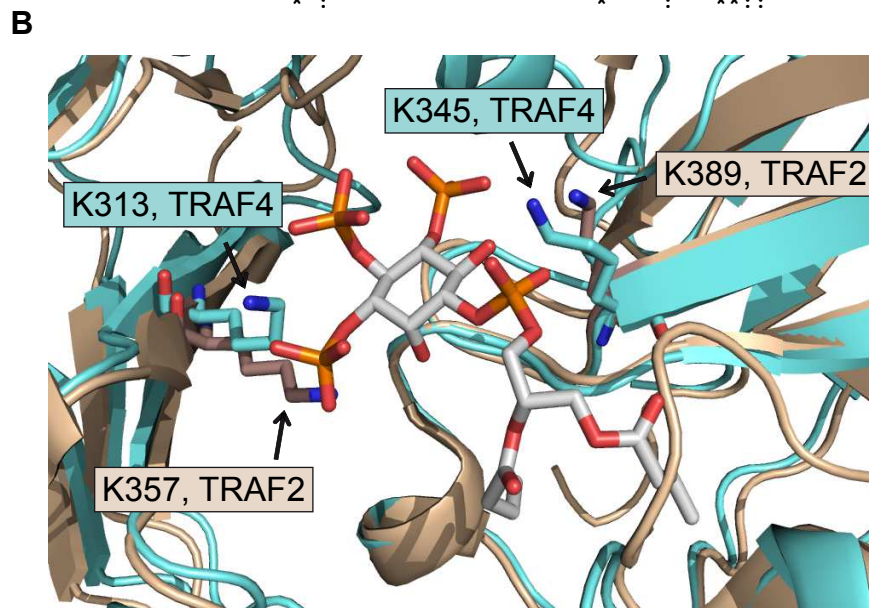


Figure 38: La position des lysines 313 et 345 de TRAF4 est conservée chez les TRAFs

A. Comparaison des régions incluant les lysines 313 et 345 des domaines TRAF des différents orthologues et paralogues de TRAF4. Les positions 313 et 345 de TRAF4 sont encadrées en rouge. Les résidus basiques correspondant à la position 313 et 345 du TRAF de TRAF4 sont surlignés en jaune. La tyrosine 338, identifiée dans le modèle d'interaction TRAF-PIP comme liant le lipide, est encadrée en bleu. Les acides aminés identiques sont marqués par un astérisque. Les remplacements conservatifs et non-conservatifs sont indiqués respectivement par un double point et un point unique. Les lysines 313 et 345 sont conservées dans tous les domaines TRAFs. DTRAF1 (dmTRAF4); DTRAF2 (dmTRAF6); hs : Homo sapiens; xl : *Xenopus laevis*; xt : *Xenopus tropicalis*; dm: *Drosophila melanogaster*; ci : *Ciona intestinalis*; ce : *Caenorhabditis elegans*; Hy : *hydractinia echinata*.

B. Superposition des structures 3D correspondant aux sites de liaison aux PIPs des domaines TRAFs de TRAF2 (1CA4) et TRAF4. Les atomes de phosphate, d'azote et d'oxygène sont colorés respectivement en orange, bleu et rouge. La position relative ainsi que l'orientation des lysines 313 et 345 de TRAF4 sont conservées au sein de la protéine TRAF2.

conservée chez la mouche, le domaine TRAF de DTRAF1 a été produit puis purifié selon la même méthodologie (Figure 37C). L'analyse par Lipid Overlay a montré que, à l'instar de l'orthologue humain, le domaine TRAF de DTRAF1 lie les PIPs (Figure 37C). Ce résultat suggère que la liaison aux PIPs du domaine TRAF est également un mécanisme conservé au cours de l'évolution.

1.4.2. Les lysines 313 et 345 sont conservées chez les TRAFs

L'analyse biochimique, structurale et biophysique de l'interaction entre le domaine TRAF de TRAF4 et les PIPs a révélé l'importance des lysines 313 et 345. Leur remplacement par un résidu acide, respectivement diminue et abolit la liaison aux PIPs (Rousseau et al., Figure 3). J'ai étudié la conservation de ces résidus au sein de la famille TRAF, considérant les paralogues humains de TRAF4 ainsi que les orthologues de diverses espèces telles que l'hydre, le ver, le tunicier, la mouche et les amphibiens. Les positions 313 et 345 sont occupées par des lysines ou arginines dans tous les TRAFs à l'exception de hyTRAF1, l'orthologue de TRAF4 chez l'hydre *hydractinia echinata*. Dans cet organisme marin, le plus distant du point de vue évolutif, la lysine 345 est conservée tandis que sa lysine 313 est remplacée par une proline. Néanmoins, cette orthologue possède deux résidus basiques (KR) à proximité de la position 313 (Figure 38A). Ces données structurales étayent la notion selon laquelle la liaison aux PIPs est un mécanisme de recrutement membranaire, conservé au cours de l'évolution de la famille TRAF.

Le domaine TRAF a une structure tertiaire, hautement conservée au sein de la famille TRAF, en forme de champignon (Wu, 2004). Cette conservation structurale, associée à la caractéristique commune de liaison aux PIPs de tous les membres TRAFs, suggère que la position relative des lysines 313 et 345 devrait être conservée spatialement. Pour tester cette hypothèse, les structures cristallines des domaines TRAFs de TRAF4 et TRAF2 ont été superposées. La position relative ainsi que l'orientation des lysines 313 et 345 de TRAF4 sont fortement similaires à celles des lysines 357 et 389 de TRAF2 (Figure 38B). Les mêmes résultats ont été observés en superposant le domaine TRAF de TRAF4 avec les domaines TRAFs de TRAF3 et TRAF6 (non montré). Pris dans leur ensemble, ces résultats supportent le concept que les protéines adaptatrices de la famille des TRAFs partagent toutes la capacité de lier les lipides de la famille des PIPs. Dans quelle mesure cette propriété participe à leurs fonctions respectives demande à être testé. Pour cela, il serait intéressant de développer des mutants ne liant pas les PIPs au sein de paralogues de TRAF4 dont la fonction est bien caractérisée, comme par exemple la protéine TRAF2. Après avoir validé que le remplacement

de la lysine 389 de TRAF2 en acide glutamique (équivalent de la lysine 345 chez TRAF4) conduit à une perte de la liaison aux PIPs, nous pourrions en tester l'impact fonctionnel sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B). En effet, il est connu que la surexpression de TRAF2 au sein des cellules HEK293 conduit à une activation de NF- κ B (Song et al., 1996). De ce fait, il serait possible de comparer l'activation du facteur de transcription dans des cellules HEK293 transfectées par TRAF2 sauvage et par le mutant TRAF2 K389E. D'autres fonctions de TRAF2 pourraient également être testées comme l'activation de la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases après traitement au TNF α (Devin et al., 2003).

De manière intéressante, dans la même région du domaine TRAF, se situent une serine (S334) et une tyrosine (T344), deux résidus pouvant être phosphorylés. Ces résidus sont également conservés dans l'ensemble des protéines TRAFs ce qui suggère qu'ils puissent avoir une fonction importante (Figure 38A). En effet, la proximité de ces résidus phosphorylables avec le site de liaison aux PIPs implique qu'ils puissent être un moyen de réguler la liaison du domaine TRAF aux PIPs. En effet, il est possible que l'ajout de charges négatives par phosphorylation à proximité du site de liaison empêche la fixation des PIPs qui sont eux-mêmes chargés négativement. La production de mutants du domaine TRAF recombinant avec des résidus phosphomimétiques à la place de ces acides aminés (S334D et/ou Y334D) permettrait de tester par Lipid Overlay la capacité de liaison aux PIPs de ces mutants et de démontrer leur rôle régulateur potentiel dans la liaison aux PIPs.

1.4.3. Analyse du modèle d'interaction entre le domaine TRAF et les PIPs

La cristallisation du domaine TRAF de TRAF4, associée à l'identification par mutagenèse de résidus impliqués dans la liaison aux PIPs, nous a permis de proposer un modèle d'interaction entre le domaine TRAF et les PIPs. Dans ce modèle, le lipide est lié à l'interface entre deux protomères voisins ; la lysine 313 d'un protomère lie à la fois le 3^{ème} et le 4^{ème} phosphate du PI(3,4,5)P3 tandis que la lysine 345 du protomère adjacent interagit avec le 5^{ème} phosphate du lipide (Rousseau et al., Figure 4). Ce modèle nous a permis d'identifier deux autres résidus potentiellement impliqués dans la liaison aux PIPs, l'arginine 297 et la tyrosine 338. Une étude structurale a montré tous les domaines connus d'interaction avec les PIPs possèdent au moins deux résidus basiques (Lys ou Arg) et un résidu aromatique (Tyr et His ; plus rarement Phe et Trp) qui sont en contact direct avec le lipide (Rosenhouse-Dantsker and Logothetis, 2007). L'identification de la tyrosine 338, comme interagissant potentiellement avec le PIP, renforce la pertinence de notre modèle. De plus, l'alignement des

domaines TRAFs montre une conservation totale de cette tyrosine dans tous les orthologues et paralogues, excepté pour le paralogue de *C. elegans* (ceTRAF1). Néanmoins, ceTRAF1 possède une phénylalanine et une histidine à proximité qui pourraient remplacer fonctionnellement la tyrosine 338 (Figure 38A). Afin d'infirmer ou de confirmer l'implication de ces résidus dans la liaison aux PIPs, la mutation de ces résidus en acide aspartique et l'analyse de ces mutants par Lipid Overlay est nécessaire.

1.5. CONCLUSION

TRAF4 est surexprimé dans environ 40% des carcinomes; dans de nombreux cas, c'est l'amplification de son gène qui est responsable de la surexpression (Bièche et al., 1996; Camilleri-Broët et al., 2007; Régnier et al., 1995). Néanmoins, son rôle dans le développement de la maladie reste toujours incompris. Le carcinome est une tumeur développée à partir des cellules épithéliales. Ces cellules sont polarisées et jointives et ont pour particularité de former des jonctions intercellulaires (jonctions adhérentes : JA et jonctions serrées : JS). Il est clairement établi que la perte de ces structures jonctionnelles est un processus clé régulant l'initiation et la progression des carcinomes (Brennan et al., 2010; Forster, 2008). La localisation subcellulaire de TRAF4 au sein des jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées suggère qu'elle participe à leur fonction. Nous avons émis l'hypothèse que la surexpression de TRAF4 pouvait déstabiliser les JSs et ainsi contribuer à la transformation cancéreuse. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié le mécanisme moléculaire responsable du recrutement de TRAF4 aux JSs ainsi que son rôle dans ces structures jonctionnelles. Cette étude nous a permis de montrer que le domaine TRAF de TRAF4 est un nouveau domaine liant les PIPs. De plus, cette liaison aux PIPs s'étend à tous les paralogues humains de TRAF4 ainsi qu'à son orthologue chez la mouche, DTRAF1. Ces résultats originaux permettent de postuler que la liaison aux PIPs est une propriété ancestrale commune aux protéines de la famille TRAF. Des expériences fonctionnelles portant sur la signalisation des récepteurs du TNF induite par leur ligand permettraient d'étayer cette hypothèse. La voie du TNF est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires, cette interaction fonctionnelle avec des lipides pourrait constituer une nouvelle piste pour le développement de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires. Une étude structurale et biophysique nous a permis de montrer que le domaine TRAF de TRAF4 est présent sous forme de trimère et lie jusqu'à trois molécules de lipide. D'autres études structurales menées sur TRAF2, TRAF3 et TRAF6 ont montré que la queue cytoplasmique des récepteurs TNFRs est en contact avec le versant latéral du domaine TRAF et n'interagit pas avec les protomères

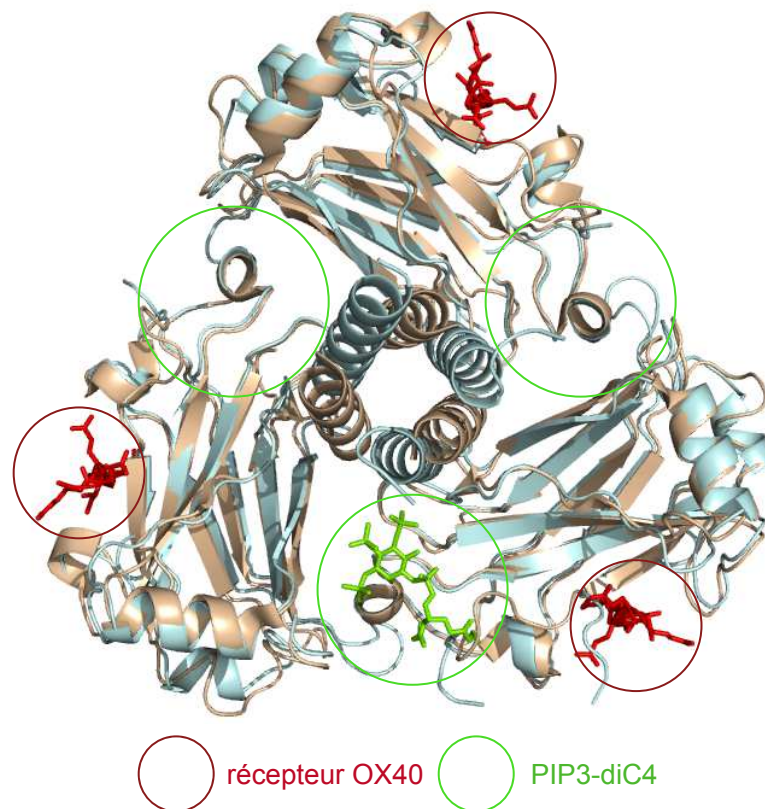


Figure 39: Les sites de liaison aux récepteurs et aux PIPs ne se chevauchent pas

Superposition de deux structures 3D correspondant d'une part au complexe TRAF4-PIP3-diC4 et d'autre part au complexe TRAF2-OX40 (1D0A). Les domaines TRAFs de TRAF4 et TRAF2 sont colorés en bleu et brun, respectivement. Le PIP3-diC4 et les peptides correspondant à la queue cytoplasmique du récepteur OX40 sont colorés en vert et rouge respectivement. Ce modèle structural indique que les sites de liaison aux PIPs et aux récepteurs de la famille du TNF ne se chevauchent pas.

adjacents (Figure 39). Ce mode de liaison est très différent de celui de la liaison aux PIPs qui se fait à l'interface entre deux protomères voisins (Figure 39). De manière intéressante, les deux sites de liaison sont non-chevauchants, suggérant la possibilité d'une liaison simultanée aux récepteurs et aux PIPs. Plusieurs études ont montré que l'affinité des protéines TRAFs pour leurs récepteurs est assez faible (40-60 μm), elle ne permet pas d'expliquer leur recrutement à la membrane ; il a donc été proposé que le recrutement membranaire des TRAFs est potentialisé par le mécanisme d'avidité (Li et al., 2002; Ye and Wu, 2000; Ye et al., 2002). En effet, les mesures d'affinité réalisées *in vitro* correspondent à l'affinité entre un récepteur et un protomère de TRAF, tandis que dans le contexte cellulaire, le récepteur TNFR est trimérique et s'associe à un trimère de TRAFs. Nos résultats suggèrent que la liaison aux PIPs participe au mécanisme moléculaire de recrutement membranaire des TRAFs. En effet, les motifs de liaison impliqués dans l'interaction avec les récepteurs et les PIPs ne sont pas chevauchant, il est probable que la liaison aux PIPs va fortement augmenter l'affinité des TRAFs pour la membrane plasmique et ainsi favoriser leur interaction avec les récepteurs membranaires.

D'un point de vue fonctionnel, nous avons observé que TRAF4 est un régulateur négatif des JSs et que cette fonction dépend de son interaction avec les PIPs. Les JSs sont des structures clés régulant différents processus tel que la différenciation et la migration cellulaire. Pour relier TRAF4 à ces processus, nous avons étudié l'impact de la sous- et sur-expression de TRAF4 sur la migration des CEMs. Nous avons observé que l'expression de TRAF4 est corrélée aux capacités migratoires des cellules MCF10A et MCF7. De plus, la liaison aux PIPs est nécessaire à l'effet pro-migratoire de TRAF4. D'autres études ont incriminé TRAF4 dans la migration cellulaire. En effet, il a été décrit que les cellules dendritiques provenant de souris déficiente pour TRAF4 avaient des propriétés migratoires moindres (Cherfils-Vicini et al., 2008). Par ailleurs, les souris TRAF4^{-/-} ont un défaut de fermeture du tube neural conduisant à une *spina bifida*. Ce phénotype est principalement caractérisé par un défaut de convergence-extension, un processus impliquant une forte migration cellulaire (Régnier et al., 2002). Une autre étude réalisée chez le xénope a également montré que la déficience de TRAF4 conduit à un défaut du développement et de la migration des cellules des crêtes neurales (Kalkan et al., 2009).

Ensemble, ces données supportent l'hypothèse selon laquelle la surexpression de TRAF4 pourrait contribuer à la transformation cancéreuse en déstabilisant les JSs et en favorisant la migration cellulaire. Afin de tester cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier l'impact de la surexpression de TRAF4 dans des modèles de tumorigenèse *in vivo*.

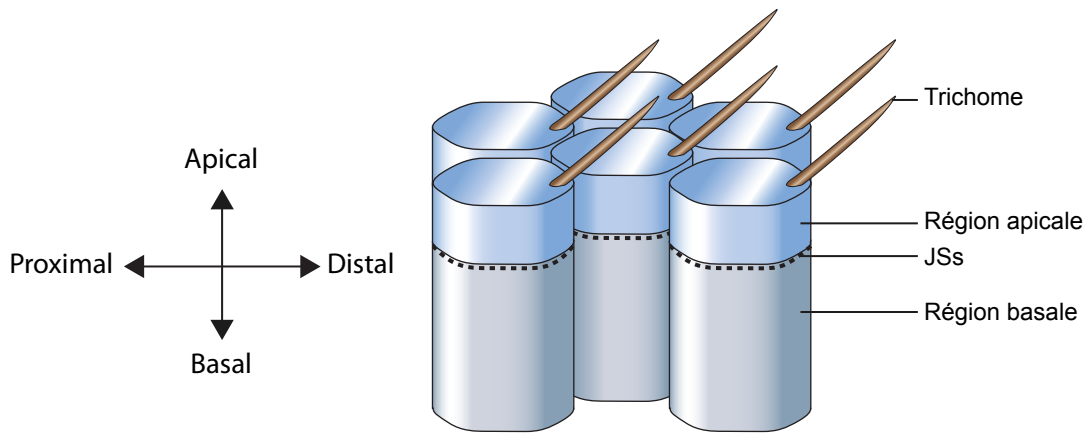
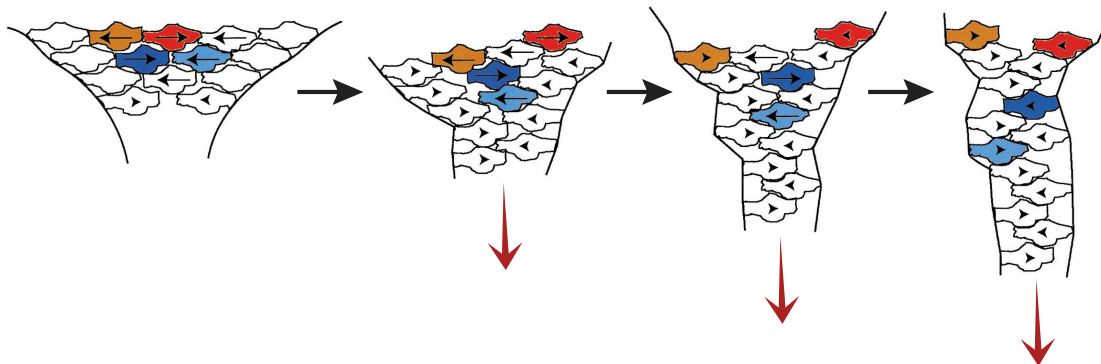


Figure 40 : La polarité planaire des cellules (PCP)

La PCP a un axe qui est perpendiculaire à celui de la polarité apico-basale, ce qui permet la mise en place d'une asymétrie proximo-distale et/ou droite-gauche. C'est le cas des cellules de l'aile de la mouche qui, en plus de présenter une polarité apico-basale, ont une polarité planaire. Cette PCP est caractérisée par la présence d'une excroissance dans la région distale, le trichome (adapté de Axelrod, 2002).



Allongement du tissu par intercalation des cellules

Figure 41 : Le mécanisme de convergence-extension

La convergence-extension est un mécanisme qui permet l'allongement d'un tissu par intercalation des cellules adjacentes. Le sens de migration des cellules est indiqué par des flèches (adapté de Wallingford, 2002).

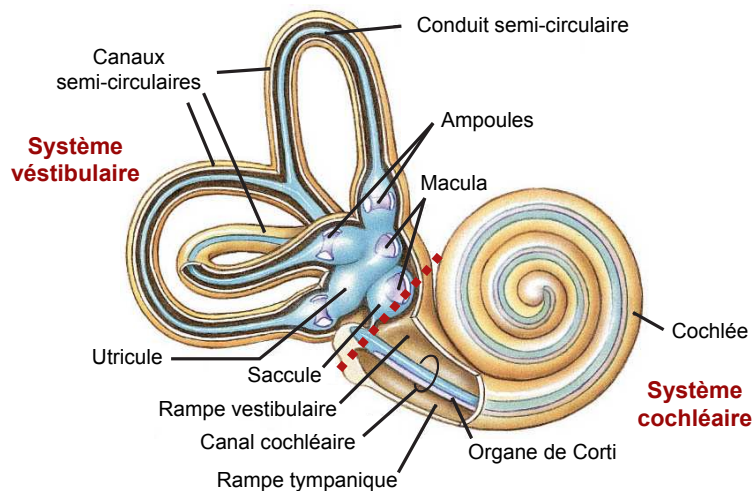


Figure 42 : L'oreille interne chez l'homme

Schéma représentatif de l'oreille interne qui est divisée en deux organes sensoriels distincts : le système vestibulaire et le système cochléaire. Le système vestibulaire est formé de trois canaux semi-circulaires qui s'élargissent à leur base pour former une ampoule. Les ampoules s'ouvrent dans deux cavités appelées saccule et utricule. Ces deux cavités contiennent une région nommée Macula qui correspond à un ensemble de cellules ciliées impliquées notamment dans la détection de la gravité. La cochlée est séparée en trois parties distinctes : la rampe vestibulaire, le canal cochléaire et la rampe tympanique. L'organe de Corti (responsable de l'audition) est présent dans le canal cochléaire (adapté de Principle of physiology, 2008).

CHAPITRE 2 : LE ROLE DE TRAF4 DANS LA POLARITE PLANAIRE

2.1. INTRODUCTION

Certaines cellules épithéliales présentent une polarité dont l'axe est schématiquement orienté perpendiculairement à l'axe apico-basal, la polarité planaire (PCP : Planar Cell Polarity) (Figure 40). Cette polarité permet la mise en place d'une asymétrie droite-gauche ou proximo-distale au sein d'une cellule ou d'un tissu (Figure 40). Chez les mammifères, l'architecture et le fonctionnement de nombreux organes tels que l'oreille interne, le rein et le poumon sont tributaires de la PCP (Ezan and Montcouquiol, 2013; McNeill, 2009; Yates et al., 2010). La PCP est également impliquée dans le développement embryonnaire notamment en régulant le mécanisme de convergence-extension (Yin et al., 2009).

2.1.1. Le mécanisme de convergence-extension

La convergence-extension consiste en l'allongement d'un tissu par intercalation médio-latérale des cellules provenant de couches cellulaires adjacentes (Figure 41). Ce mécanisme intervient à différentes étapes du développement embryonnaire telles que la gastrulation, la neurogenèse et l'élongation de l'axe de l'embryon (Tada and Heisenberg, 2012; Wallingford et al., 2002). Au niveau moléculaire, plusieurs voies de signalisation sont impliquées, elles incluent la voie non-canonique Wingless (Wnt/PCP) (Skoglund and Keller, 2010; Yin et al., 2009). La première indication de l'implication de la voie Wnt/PCP dans le mécanisme de convergence-extension vient d'expériences utilisant les glycoprotéines sécrétées Wnt4 et Wnt5a. En effet, la surexpression de l'une de ces deux protéines suffit à abolir les mécanismes de convergence-extension chez la grenouille et le poisson (Moon et al., 1993; Ungar et al., 1995). Beaucoup d'autres composants de la voie Wnt/PCP ont également été impliqués dans la convergence-extension comme le récepteur Frizzled-7 et la protéine cytoplasmique Dishevelled (Djiane et al., 2000; Medina et al., 2000; Sokol, 1996). Chez les mammifères, il a été décrit que la déficience en protéines de la voie Wnt/PCP comme Vangl2 (Van Gogh-like protein-2) conduit à une altération du mécanisme de convergence-extension, caractérisé par un défaut de fermeture du tube neural et d'élongation de l'axe de l'embryon (Ybot-Gonzalez et al., 2007).

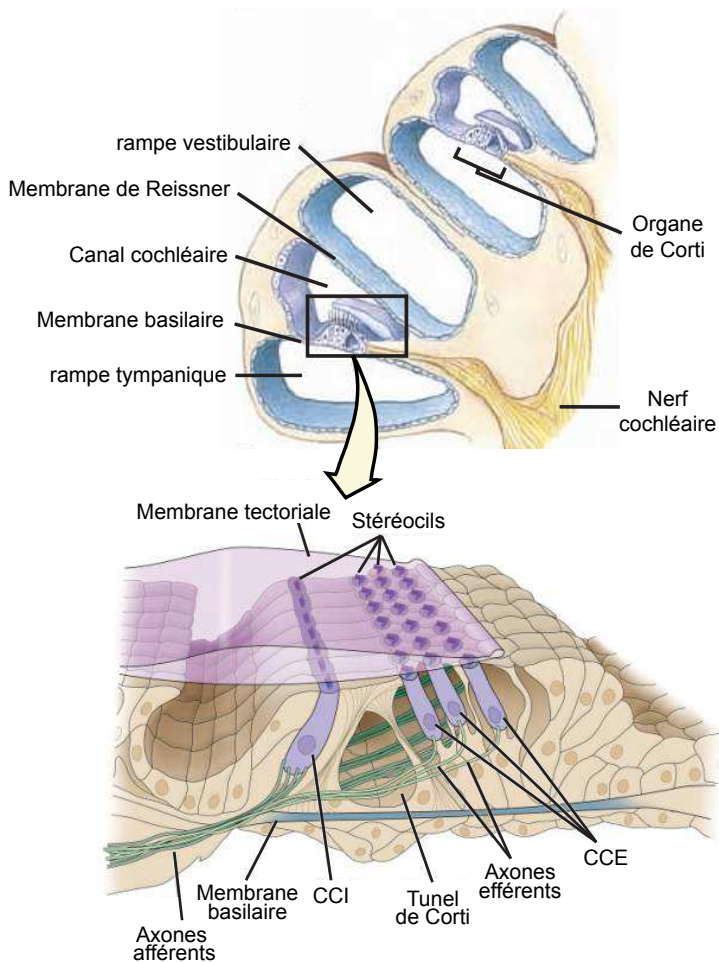


Figure 43 : Le système de l'audition

Schéma représentant une coupe transverse de la cochlée (haut) et de l'organe de Corti (bas). La cochlée est un organe creux en forme d'escargot, rempli d'un liquide appelé lymphe. Elle est séparée en trois régions : la rampe vestibulaire, le canal cochléaire et la rampe tympanique. L'organe de Corti repose sur la membrane basilaire qui sépare le canal cochléaire de la rampe tympanique. L'organe de Corti est composé de cellules de soutien qui supportent une rangée de cellules ciliées internes (CCI) et trois rangées de cellules ciliées externes (CCE). Les cellules ciliées exposent à leur surface apicale des stéréocils et un kinéto cil qui sont en contact avec la membrane tectoria (adapté de Principle of physiology, 2008).

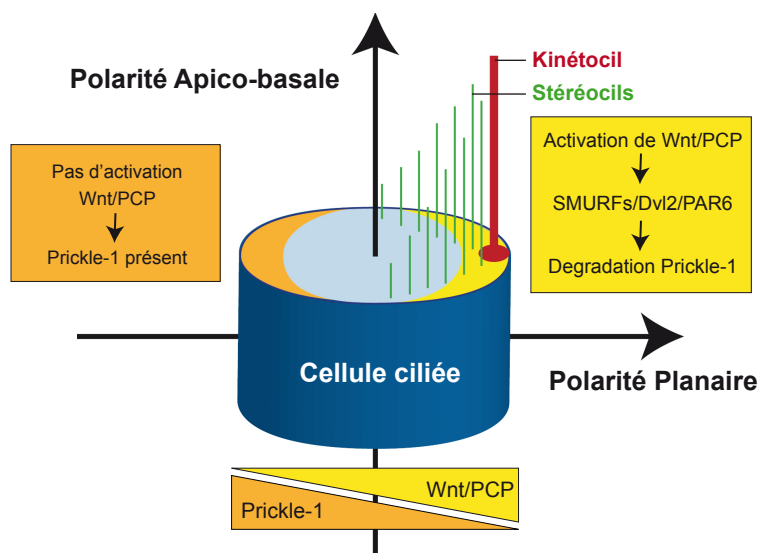


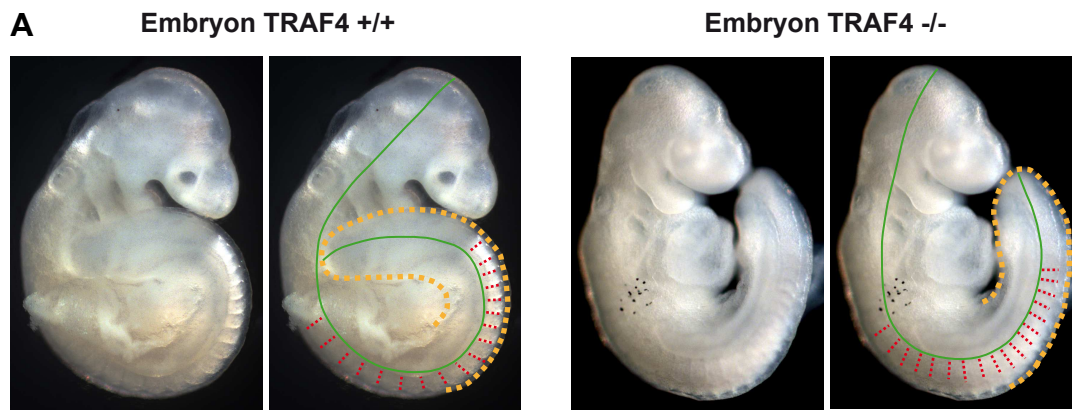
Figure 44 : Asymétrie gauche-droite médiée par la PCP

Schéma illustrant les deux types de polarité observés au sein des cellules ciliées. La polarité planaire a un axe orienté perpendiculairement à l'axe apico-basal. L'activation localisée de la voie Wnt/PCP, au niveau de la région possédant le kinéto cil et les stéréocils, permet la formation du complexe SMURFs/Dvl2/PAR6. Ce complexe, en induisant la dégradation de Prickle-1, met en place un gradient de cette protéine important pour le maintien de la PCP.

2.1.2. L'oreille interne

L'oreille interne est composée de deux organes sensoriels, le système vestibulaire et la cochlée (Figure 42). Tandis que le système vestibulaire est l'organe de l'équilibre et de la perception du mouvement, la cochlée est spécialisée dans l'audition. Le système vestibulaire est composé de trois canaux semi-circulaires contenant de l'endolymphe, disposé selon les trois plans de l'espace (Figure 42). Lors d'un mouvement, l'inertie engendre un mouvement du liquide qui est détecté par les cellules ciliées vestibulaires présentes sur la surface interne des canaux. L'orientation orthogonale des trois canaux semi-circulaires permet la détection des mouvements quel qu'en soit le plan. La cochlée est un organe creux en forme d'escargot qui est divisée en trois parties : la rampe vestibulaire, la rampe tympanique et le canal cochléaire (Figure 43). Le canal cochléaire rempli d'endolymphe est séparé des rampes vestibulaire et tympanique respectivement par la membrane de Reissner et la membrane basilaire (Figure 43). Les vibrations sonores conduisent à la formation d'ondes hydrauliques qui se propagent le long de la rampe vestibulaire puis tympanique. Ces ondes, en déplaçant la périlymphe de ces rampes, font bouger la membrane de Reissner qui modifie la pression de l'endolymphe contenue dans le canal cochléaire. Le déplacement de la membrane tectoriale induite par la modification de la pression est reconnu par les cellules ciliées de l'organe de Corti qui transmettent l'information au cerveau sous forme d'un signal électrique (axones efférents) (Figure 43) (Eluredge and Miller, 1971; Richardson et al., 2011). L'organe de Corti est constitué de cellules de soutien qui supportent une rangée de cellules ciliées internes (CCI) et trois rangées de cellules ciliées externes (CCE) (Figure 43). Les cellules ciliées internes et externes, en exposant à leur surface apicale un faisceau de cils en forme de V, arborent une polarité planaire (Figure 43). Ce faisceau de cils est composé d'un kinéto cil et de 20 à 300 stéréocils (Chacon-Heszele et al.; Ezan and Montcouquiol, 2013; Wang et al., 2005).

Lors de cette dernière décennie, de nombreuses protéines ont été impliquées dans la polarité planaire et la majorité font partie de la voie Wnt/PCP. Récemment, une étude a montré que les protéines SMURFs (*Smad* ubiquitin regulatory factor), des ubiquitines ligases E3, étaient impliquées dans la polarité planaire (Narimatsu et al., 2009). En effet, la déficience en SMURF1 ou SMURF2 chez la souris, conduit à un mécanisme de convergence-extension anormal qui se traduit par un défaut de fermeture du tube neural ainsi qu'à une altération de l'organisation et de l'orientation des cellules ciliées de l'oreille interne. Au niveau moléculaire, suite à l'activation de la voie Wnt/PCP dans la région possédant le kinéto cil et les stéréocils, les protéines SMURFs forment un complexe avec Dvl2 (Dishevelled 2) et PAR6 (Partitioning-defective 6) (Figure 44). Une fois ce complexe formé, SMURF2



B

Phénotype \ Incidence	Embryon TRAF4 +/+	Embryon TRAF4 +/-	Embryon TRAF4 -/-
Défaut de fermeture du tube neural	2/30 (6.7 %)	9/51 (17.6 %)	9/19 (47,4 %)
Embryon plus court et plus large	0/30 (0 %)	4/51 (7.8 %)	8/19 (42.1 %)

Figure 45 : Les embryons TRAF4 -/- présentent des défauts de convergence-extension

A. Images représentatives d'embryons à 9.5 jours de gestation, issus de croisements entre souris hétérozygotes pour la délétion de TRAF4. Les embryons TRAF4 +/+ et TRAF4 -/- de la même portée ont été comparés. La queue de l'embryon et les somites sont délimitées respectivement en pointillés jaunes et rouge. L'axe du corps est représenté par une ligne verte. La délétion de TRAF4 chez la souris conduit à une réduction de la taille de l'axe du corps et de la queue ainsi qu'à un resserrement des somites. Ces phénotypes évoquent un défaut d'élongation de l'embryon qui est caractéristique d'un problème de convergence-extension.

B. Analyse des phénotypes dus à un défaut de convergence-extension au sein de 100 embryons issus de croisements entre souris hétérozygotes. La délétion homozygote de TRAF4 conduit à une létalité embryonnaire d'environ 25 %; plus de 40% des embryons TRAF4 -/- survivants ont un phénotype associé à un défaut de convergence-extension (9.5 jours après gestation).

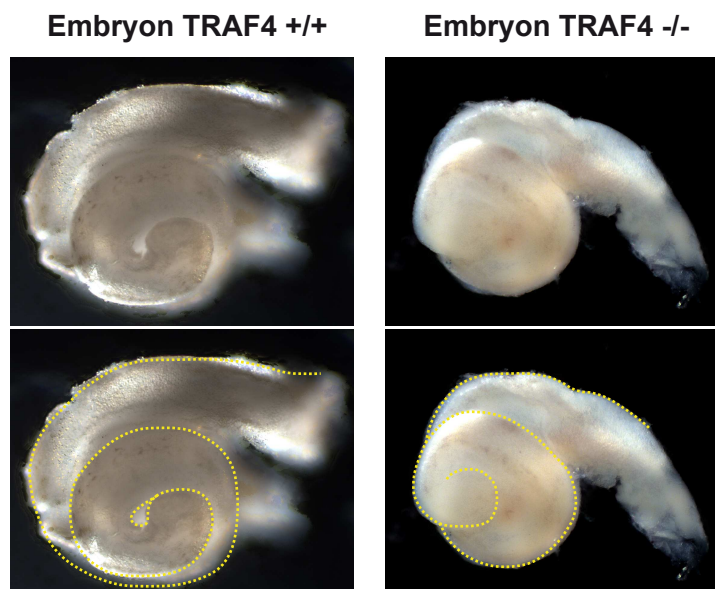


Figure 46 : TRAF4 est impliqué dans l'élongation de la cochlée

Les cochlées d'embryons sauvages (gauche) ou d'embryons déficients pour TRAF4 (droite), ont été prélevées à 18,5 jours de gestation puis acquises au microscope. Le contour de la cochlée est délimité par des pointillés jaunes. Le canal cochléaire des embryons déficients pour TRAF4 est plus court et plus large, un phénotype typique d'un problème de convergence-extension.

polyubiquitinye Prickle-1, ce qui entraîne sa dégradation via le protéasome 26S (Narimatsu et al., 2009). Cette dégradation localisée conduit à la mise en place d'une asymétrie gauche-droite de la protéine Prickle-1, un mécanisme primordial dans le maintien de la PCP (Figure 44).

De manière intéressante, il a été décrit que TRAF4 interagit avec les protéines SMURFs et que SMURF1 polyubiquitinye TRAF4, ce qui conduit à sa dégradation via le protéasome 26S (Li et al., 2010). De plus, à l'instar des souris déficientes pour les SMURFs, les souris déficientes pour *TRAF4* présentent un défaut de fermeture du tube neural (Régner et al., 2002). Dans leur ensemble, ces données suggèrent que TRAF4 soit impliquée dans les mêmes voies de signalisation que les protéines SMURFs. Nous avons donc entrepris d'étudier la polarité planaire au sein des souris déficiente pour TRAF4.

2.2. ETUDE DE LA PCP CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES POUR TRAF4

2.2.1. Etude des phénotypes liés à un défaut de convergence-extension

La convergence-extension dépend directement de la PCP et l'altération des composants de la voie Wnt/PCP perturbe ce mécanisme conduisant majoritairement à un défaut d'élongation de l'axe du corps de l'embryon et a un défaut de fermeture du tube neural (Ybot-Gonzalez et al., 2007). Nous avons émis l'hypothèse que, certains des phénotypes rapportés chez les souris TRAF4 *-/-*, comme l'altération de fermeture du tube neural reflétaient son implication dans la polarité planaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé la morphologie d'embryons à 9.5 jours de gestation déficients pour TRAF4 à celle d'embryons contrôles. Ces expériences ont été réalisées à partir de croisements hétérozygotes. La comparaison morphologique d'embryons issus de la même portée indique que l'axe du corps des embryons déficients pour TRAF4 est plus court que celui des embryons sauvages (figure 45). De plus, leurs somites sont moins larges et plus hautes (Figure 45A). Ce phénotype est caractéristique d'un défaut d'élongation de l'embryon.

En collaboration avec Muriel Rhinn (Equipe « Rôle de l'acide rétinoïque dans le développement de la souris », dirigée par Pascal Dollé, IGBMC), nous avons prélevé et analysé cent embryons issus de croisements entre souris hétérozygotes pour la délétion de TRAF4 afin de calculer la fréquence d'apparition des phénotypes liés à un défaut de polarité planaire. En plus de confirmer que la déficience de TRAF4 conduit à un défaut de fermeture du tube neural dans plus de 45% des embryons (Régner et al., 2002), cette étude montre un défaut d'élongation, caractérisé par un embryon plus court et plus large, dans environ 40%

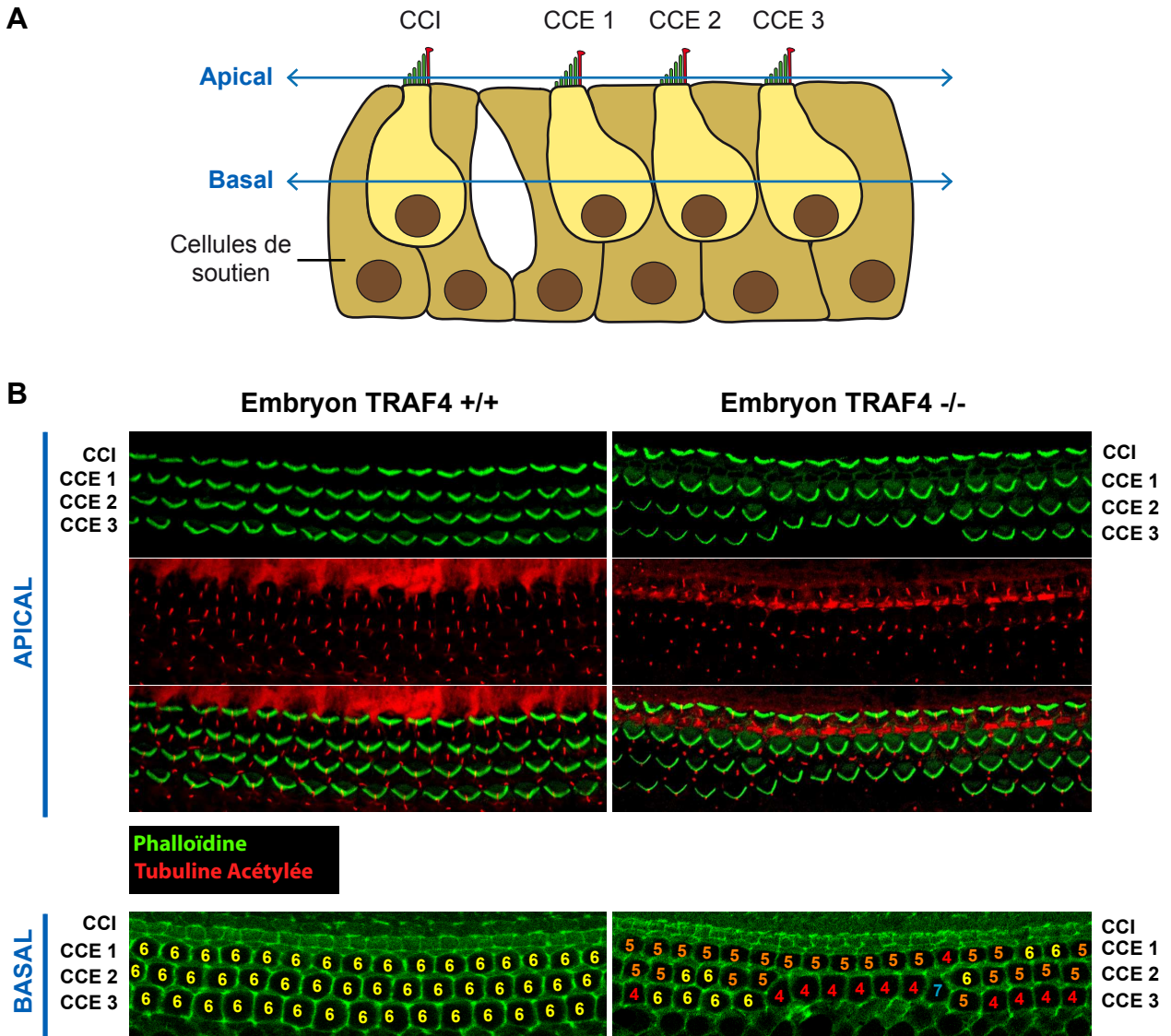


Figure 47 : La délétion de TRAF4 chez la souris perturbe la polarité planaire des cellules de l'oreille interne
A. Schéma représentant une coupe transverse de l'organe de Corti, un organe sensoriel faisant partie intégrante de la cochlée. Cet organe est constitué de cellules de soutien qui supportent une rangée de cellules ciliées internes (CCI) et trois rangées de cellules ciliées externes (CCE).

B. Après dissection des oreilles internes d'embryons à 18,5 jours de gestation, la cochlée a été isolée puis l'actine et la tubuline acétylée ont été marquées avec respectivement de la phalloïdine et un anticorps anti-tubuline acétylée. Les images ont été acquises au microscope confocal. Sur le côté basal le nombre de contacts avec les cellules adjacentes a été compté, les CCE avec un nombre normal de contact (6) sont indiquées en jaune, les CCE avec un nombre altéré de contacts sont indiquées en rouge (4), orange (5) et bleu (7).

des embryons TRAF4 $-/-$ (Figure 45B). Ces résultats suggèrent l'implication de TRAF4 dans la PCP puisque sa perte de fonction chez la souris est associée à un défaut du mécanisme de convergence-extension.

Il a récemment été décrit que la convergence-extension est primordiale pour l'élongation de la cochlée au cours du développement embryonnaire. Afin de savoir si la délétion de TRAF4 perturbe l'élongation de la cochlée, les oreilles internes d'embryons ont été prélevées à 18.5 jours de gestation et les cochlées ont été observées au microscope. De manière intéressante, 100% des cochlées des embryons déficients pour TRAF4 sont plus courtes et plus larges que celles des embryons sauvages (Figure 46). Ce phénotype ressemble à celui des souris déficientes pour Vangl2 et Dvl-2, deux acteurs majeurs de la PCP (Chacon-Heszele et al.; Wang et al., 2006). Ce résultat illustre également le défaut du mécanisme de convergence-extension au sein des embryons TRAF4 $-/-$.

Dans leur ensemble, ces données montrent que TRAF4 est impliqué dans le mécanisme de convergence-extension et que la délétion de TRAF4 conduit à un défaut de fermeture du tube neural ainsi qu'à une altération de l'élongation de l'axe de l'embryon et de la cochlée. Ces résultats renforcent donc l'idée que TRAF4 soit impliqué dans la voie Wnt/PCP.

2.2.2. Etude de la PCP au sein de la cochlée

La cochlée est l'organe de référence pour étudier la PCP. En effet, dans cet organe, deux phénotypes sont directement associés à un défaut de PCP : la présence d'un nombre anormal de rangées de cellules ciliées externes et une mauvaise orientation du faisceau de cils des cellules ciliées (Ezan and Montcouquiol, 2013; May-Simera and Kelley, 2012). Ce faisceau de cils est composé d'un kinétocil et de 20 à 300 stéréocils. Le kinétocil peut être marqué spécifiquement avec un anticorps anti-tubuline acétylée tandis que les stéréocils, riches en actine, peuvent être marqués à la phalloïdine (Figure 47) (Chacon-Heszele et al.; Ezan and Montcouquiol, 2013; Wang et al., 2005).

Afin de savoir si les souris déficientes pour TRAF4 ont un défaut de polarité planaire, les oreilles internes de sept embryons sauvages et sept embryons déficients pour TRAF4 ont été prélevées à 18,5 jours de gestation. Après avoir isolé la cochlée, la membrane basilaire et l'organe de Corti ont été prélevés et fixés. La morphologie des cellules ciliées a été observée grâce à un immunomarquage de la tubuline acétylée et un marquage à la phalloïdine (Montcouquiol et al., 2003). Les pièces ont été montées entre lame et lamelle et observées au microscope confocal. Les souris déficientes pour TRAF4 présentent une altération de la morphologie de l'organe de Corti caractérisée par une fusion entre les rangées CCE 2 et CCE

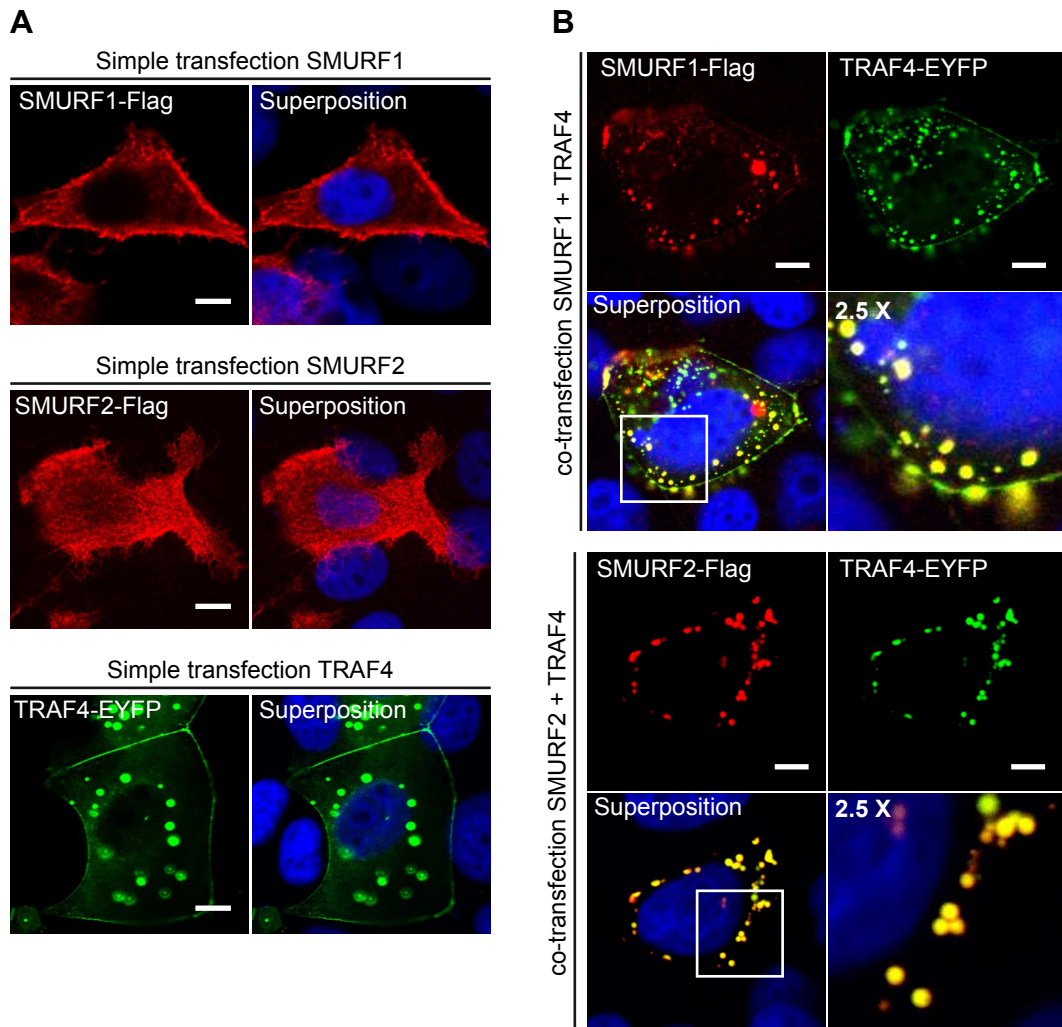


Figure 48 : En co-expression TRAF4 colocalise avec les protéines SMURFs

A. Des cellules MCF7 ont été transfectées avec un vecteur d'expression pour TRAF4-EYFP, SMURF1-Flag ou SMURF2-Flag. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-Flag (rouge).

B. Des cellules MCF7 ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression pour TRAF4-EYFP et un vecteur d'expression pour SMURF1-Flag ou SMURF2-Flag. Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-Flag (rouge). Barre d'échelle : 5 μ m.

3 (Figure 47). Ce phénotype est complètement pénétrant car toutes les souris déficientes présentaient au moins trois régions exhibant cette altération morphologique. Au niveau basal, dans les souris sauvages chaque cellule ciliée externe est en contact avec six cellules voisines et ont une forme hexagonale (Figure 47); les CCEs des souris déficiente en TRAF4 ont une forme altérée et présentent un nombre anormal de contacts intercellulaires (Figure 47). Ce phénotype est remarquablement similaire à celui des souris déficiente pour SMURF2 (Narimatsu et al., 2009).

Dans leur ensemble, ces données génétiques montrent que TRAF4, à l'instar des protéines SMURFs, est impliqué dans la polarité planaire. De plus, le fait que TRAF4 interagisse avec les protéines SMURFs (Li et al., 2010) suggère que TRAF4 pourrait appartenir au complexe SMURFs/PAR6/Dvl2.

2.3. ETUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TRAF4 ET DES PROTEINES SMURFS

La localisation subcellulaire de la protéine TRAF4 est multiple. En effet, TRAF4 a été détectée dans le noyau, le cytoplasme ainsi qu'à la membrane plasmique (Glauner et al., 2002; Kédinger et al., 2008; Régnier et al., 1995). Les cellules épithéliales confluentes présentent un marquage TRAF4 membranaire au niveau des jonctions serrées. Ces données ont été confirmées *in vivo* par l'analyse de tissu mammaire par immunohistochimie (Kedinger et al., 2008). L'étude du recrutement membranaire de la protéine TRAF4, nous a également permis de montrer qu'elle est recrutée à la membrane plasmique en interagissant avec les PIPs via son domaine TRAF (Rousseau et al., Figure 2). La localisation subcellulaire des protéines SMURFs est également multiple. En effet, à l'instar de TRAF4, les protéines SMURFs ont été détectées dans le noyau, le cytoplasme ainsi qu'à la membrane plasmique. De plus, il a été montré que le domaine C2 de SMURF2, un domaine liant les PIPs, est responsable de sa localisation membranaire (Wiesner et al., 2007). Ensemble, ces données suggèrent que les protéines TRAF4 et SMURFs pourraient avoir une localisation subcellulaire commune. Afin de tester cette possibilité, nous avons étudié la localisation de ces protéines au sein des cellules épithéliales mammaires MCF7.

Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules MCF7 exprimant TRAF4-EYFP, SMURF1 et SMURF2 seuls (Figure 48A). Les protéines SMURFs ont été immunomarquées en utilisant un anticorps anti-Flag. Nous avons observé qu'exprimés seuls, SMURF1 est majoritairement localisée à la membrane plasmique, tandis que SMURF2 est présente de manière diffuse dans le cytoplasme ; TRAF4 est localisée à la

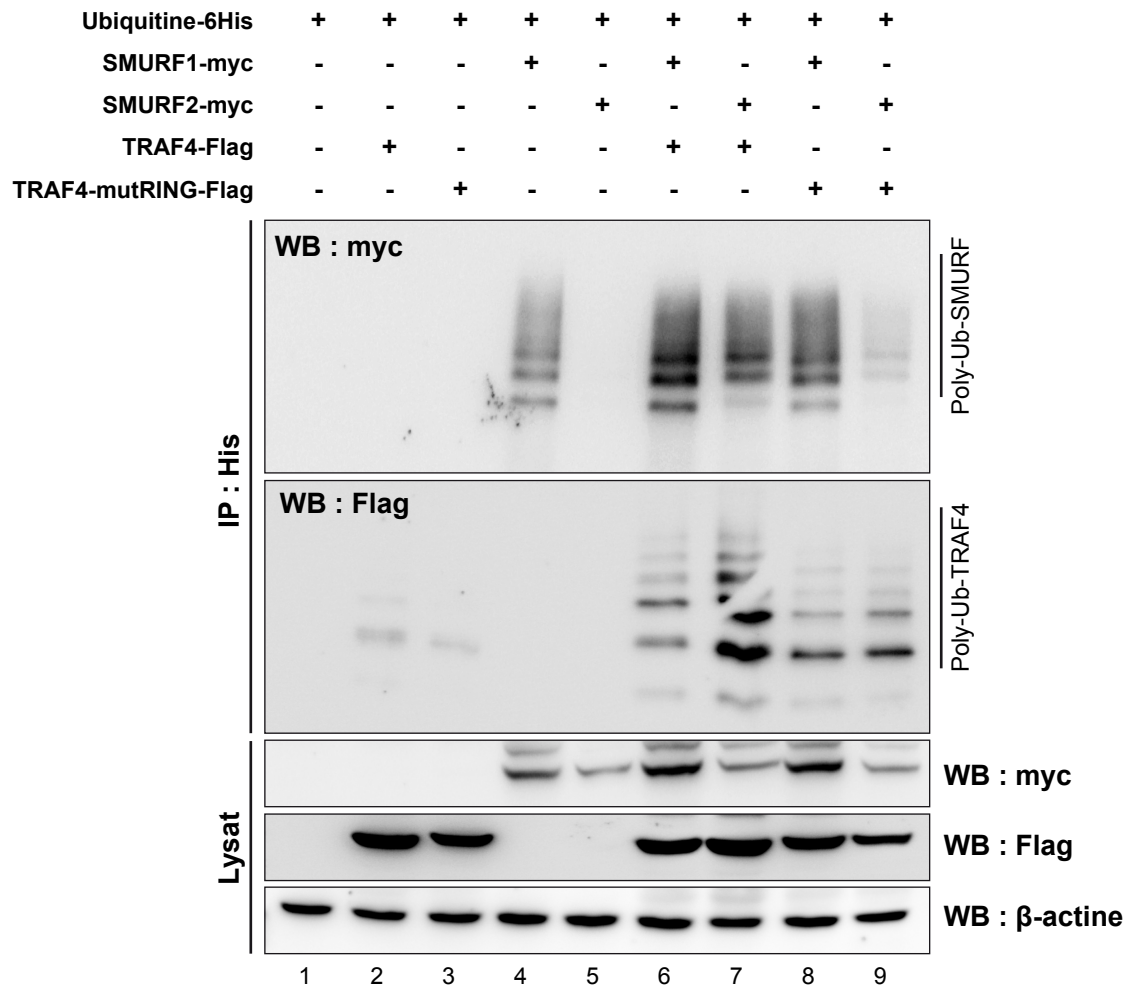
membrane aux JSs et dans des structures ponctiformes cytoplasmiques (Figure 48). Ces résultats montrent que la localisation subcellulaire de ces trois protéines n'est pas totalement chevauchante. Nous avons co-transfecté un vecteur codant pour la protéine TRAF4-EYFP avec un vecteur d'expression pour SMURF1-Flag et SMURF2-Flag (Figure 48B). La co-expression avec TRAF4 modifie les localisations des protéines SMURFs. En effet, TRAF4 colocalise avec SMURF1 et SMURF2 dans des structures ponctiformes cytoplasmiques (100% des cellules co-transfectées) (Figure 48B).

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que la co-expression de TRAF4 avec les protéines SMURFs modifie leur localisation subcellulaire. Les deux protéines sont accumulées dans des vésicules cytoplasmiques positives pour TRAF4. Ces modifications renforcent l'idée d'une interconnexion entre ces trois protéines et suggèrent que TRAF4 guide ces protéines vers des structures intracytoplasmiques. En dépit de nombreux efforts, la nature exacte de ces structures ponctiformes reste inconnue à ce jour. Elles ne colocalisent pas avec des marqueurs des granules de stress, des P bodies, et des endosomes précoces et tardifs. Ces vésicules sont partiellement positives pour la présence d'ubiquitine. Comme TRAF4 et les protéines SMURFs sont des ubiquitine ligase E3, il est possible que la concentration de ces trois protéines dans ces structures reflète leur activité d'ubiquitination. Prise dans leur ensemble, ces données renforcent également l'idée que TRAF4 pourrait appartenir au complexe SMURFs/PAR6/Dvl2. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire d'étudier l'interaction entre ces protéines en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation.

2.4. ETUDE FONCTIONNELLE DU COMPLEXE TRAF4/SMURFS

Les protéines TRAF4 et SMURFs colocalisent dans des structures vésiculaires positives pour l'ubiquitine. Ces données suggèrent que ces trois protéines pourraient former un complexe protéique ayant pour fonction l'ubiquitinylation. Bien que la polyubiquitinylation de TRAF4 par SMURF1 ait déjà été décrite (Kalkan et al., 2009; Li et al., 2010), l'impact de TRAF4 sur SMURF1 ainsi que l'interconnexion entre TRAF4 et SMURF2 restent inconnus. De ce fait, des expériences d'ubiquitinylation ont été réalisées au sein de cellules HEK293T. Pour cela, un vecteur codant pour l'ubiquitine couplée à une étiquette 6His a été co-transfecté avec différents vecteurs d'expression codant pour la forme sauvage ou mutée de TRAF4 (TRAF4-mutRING) fusionnées à l'épitope Flag en présence des protéines SMURFs taguées par l'épitope myc. Le mutant TRAF4-mutRING correspond au remplacement des résidus impliqués dans la chélation du zinc du domaine RING par des Alanines (C18A, C34A, H36A, C39A et C42A). Une purification des protéines modifiées par l'Ubiquitine a été réalisée par

A



B

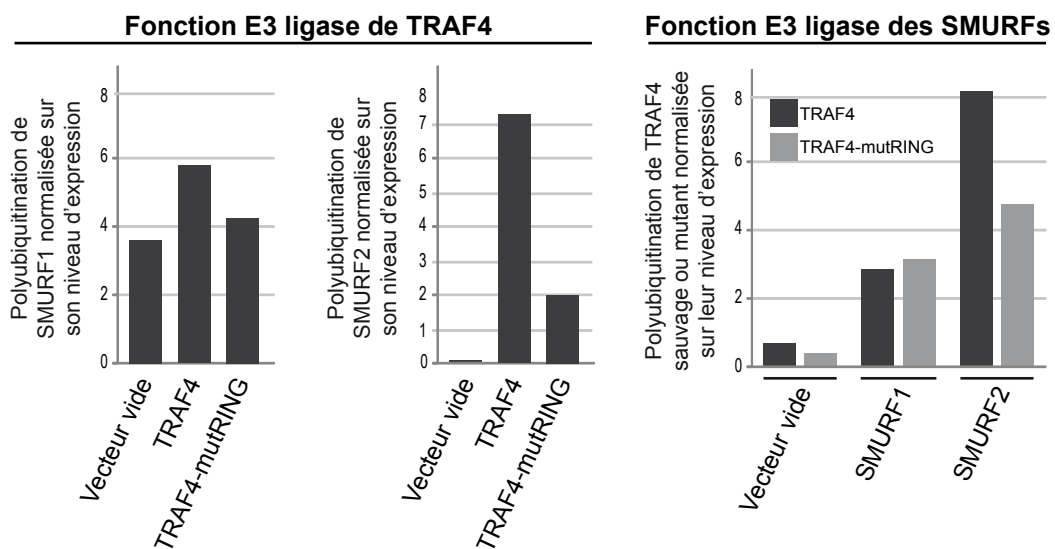


Figure 49 : Polyubiquitinylation de TRAF4 en présence des protéines SMURFS et réciproquement.

A. Test d'ubiquitinylation. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression pour l'Ubiquitine-6His et différentes associations des vecteurs codant pour TRAF4-Flag, TRAF4-mutRING-Flag, SMURF1-myc et SMURF2-myc. TRAF4-mutRING-Flag correspond à un mutant de TRAF4 où le domaine RING est non fonctionnel. Après lyse des cellules, les protéines ubiquitinylées (ubiquitine-6His) de l'extrait cellulaire sont précipitées avec des billes recouvertes de nickel. Le lysat et la fraction précipitée (IP : 6His) ont ensuite été analysés par Western-blot.

B. Quantification du Western-blot présenté en (A) à l'aide du logiciel ImageJ.

chromatographie d'affinité sur bille de Nickel. Des conditions stringentes de purification ont été employées. Brièvement, les lysats cellulaires ont été incubés avec la résine (His-select Nickel Affinity Gel, Sigma) et seules les protéines couplées de manière covalente à l'ubiquitine-6His restent accrochées aux billes. Après plusieurs lavages à l'urée 8M, les protéines liées aux billes ont été éluées par addition de bleu de dépôt contenant du β -mercaptoéthanol et du SDS. Les fractions correspondant au lysat et aux protéines précipitées, ont été analysées par Western blot (Figure 49). Un anticorps anti-Flag a été utilisé pour la détection de TRAF4 et TRAF4-mutRING. Pour détecter la présence de SMURF1 et SMURF2, nous avons utilisé un anticorps anti-myc. La détection de l'actine sert de contrôle de charge dans les lysats.

L'analyse du lysat cellulaire montre que toutes les protéines, après transfection, sont bien exprimées au sein des cellules HEK293T (Figure 49). La transfection de SMURF1 est suffisante pour induire sa polyubiquitinylation (Figure 49, ligne 4). Ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont montré que SMURF1 peut s'auto-ubiquitinyler (David et al., 2013; Lu et al., 2011). En ce qui concerne l'impact de TRAF4 sur les protéines SMURFs, nous avons observé que la présence de TRAF4 n'augmente que faiblement l'ubiquitinylation de SMURF1 (Figure 49A, lignes 4, 6 et 8 ; 49B). A l'inverse, la présence de la protéine TRAF4 sauvage est associée à une forte polyubiquitinylation de SMURF2, alors que le mutant TRAF4-mutRING n'a pas cet effet (Figure 49A, lignes 5, 7 et 9 ; 49B). Ces résultats montrent que la co-expression de TRAF4 avec SMURF2 conduit à une forte polyubiquitinylation de SMURF2, et ce de manière dépendante de l'activité ubiquitine ligase E3 de TRAF4. Afin de tester si TRAF4 polyubiquitinylerait SMURF1 et SMURF2 directement, il serait nécessaire de réaliser un test d'ubiquitinylation *in vitro* avec les protéines SMURF1, SMURF2 et TRAF4 recombinantes. Comme nous ne disposons pas des protéines SMURFS purifiées nous n'avons pas réalisé cette expérience.

Concernant l'impact des protéines SMURFs sur TRAF4, nous avons observé que la présence de SMURF1 et surtout celle de SMURF2 était associée à la polyubiquitinylation de TRAF4 (Figure 49, lignes 6 et 7 ; 49B). Les deux protéines SMURFs ne sont pas équivalentes, SMURF1 polyubiquitinylerait TRAF4 et TRAF4-mutRING de manière similaire, suggérant que l'activité ubiquitine ligase de TRAF4 n'est pas requise pour son ubiquitinylation par SMURF1 (Figure 49, lignes 6 et 8 ; 49B). A l'inverse, SMURF2 polyubiquitinylerait fortement la protéine TRAF4 sauvage mais moins fortement TRAF4-mutRING (Figure 49, lignes 7 et 9 ; 49B). Ce résultat suggère que l'activité ubiquitine ligase E3 de TRAF4 contribue à son ubiquitinylation par SMURF2.

Ainsi, ces résultats confirment que TRAF4 est une cible de SMURF1 et montrent pour la première fois que SMURF2 polyubiquitinylerait TRAF4, et que l'activité E3 ligase de TRAF4 favorise l'ubiquitinylation complète de TRAF4 par SMURF2. Pour expliquer cette donnée, nous pouvons émettre deux hypothèses : soit TRAF4 active SMURF2 par ubiquitinylation, qui en conséquence ubiquitinylerait plus fortement TRAF4 ; soit la polyubiquitinylation de TRAF4 par SMURF2 active TRAF4 qui s'auto-polyubiquitinylerait en retour. Il serait nécessaire de réaliser un test d'ubiquitinylation *in vitro* pour savoir si les protéines SMURFs polyubiquitinyleraient TRAF4 directement.

Dans leur ensemble, ces données suggèrent qu'il existe des activités E3-ligases réciproques entre TRAF4 et les protéines SMURFs, plus particulièrement entre TRAF4 et SMURF2. Néanmoins, les conséquences fonctionnelles de ces polyubiquitinylations réciproques nécessitent d'être élucidées. Pour cela, il serait possible d'identifier les lysines de TRAF4 et des SMURFs qui servent de support à la polyubiquitinylation pour les muter en arginine, ce qui les rendrait non-ubiquitinylables (Garcia-Higuera et al., 2001). La comparaison fonctionnelle de ces mutants avec leur équivalent sauvage permettrait d'avoir une meilleure compréhension quant au rôle de la polyubiquitinylation sur la stabilité, la localisation et la fonction de ces trois protéines.

2.5. ETUDE DU TYPE DE POLYUBIQUITINYLATION

La polyubiquitinylation est une modification post-traductionnelle qui peut avoir différents effets sur le substrat comme induire sa dégradation ou moduler sa fonction (Deshaies and Joazeiro, 2009; Iwai and Tokunaga, 2009). Par exemple, l'assemblage d'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines liées par leur lysine 48 (K48) sur une protéine constitue une marque conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S (Deshaies and Joazeiro, 2009). A l'inverse, la polyubiquitinylation associant au substrat une chaîne d'ubiquitines liées par leur lysine 63 (K63) ne conduit généralement pas à sa dégradation mais modifie sa fonction et/ou sa localisation (Iwai and Tokunaga, 2009). La majorité des protéines TRAFs sont des E3-ligases connues pour réaliser de la polyubiquitinylation de type K63 (Karin and Gallagher, 2009). Nous avons donc voulu déterminer quel type d'ubiquitinylation sur SMURF2 était associée à la présence de TRAF4 et réciproquement. Sur l'ubiquitine, sept lysines sont accessibles et potentiellement impliquées dans la formation de chaînes de poly-ubiquitine (Figure 5). Nous avons utilisé l'ubiquitine-6His sauvage (Ub-6His-WT) et des formes mutantes de cette construction pouvant réaliser de la polyubiquitinylation uniquement de type K48 (Ub-6His-K48) ou de type K63 (Ub-6His-K63) (Tseng et al., 2010). En effet, les mutants

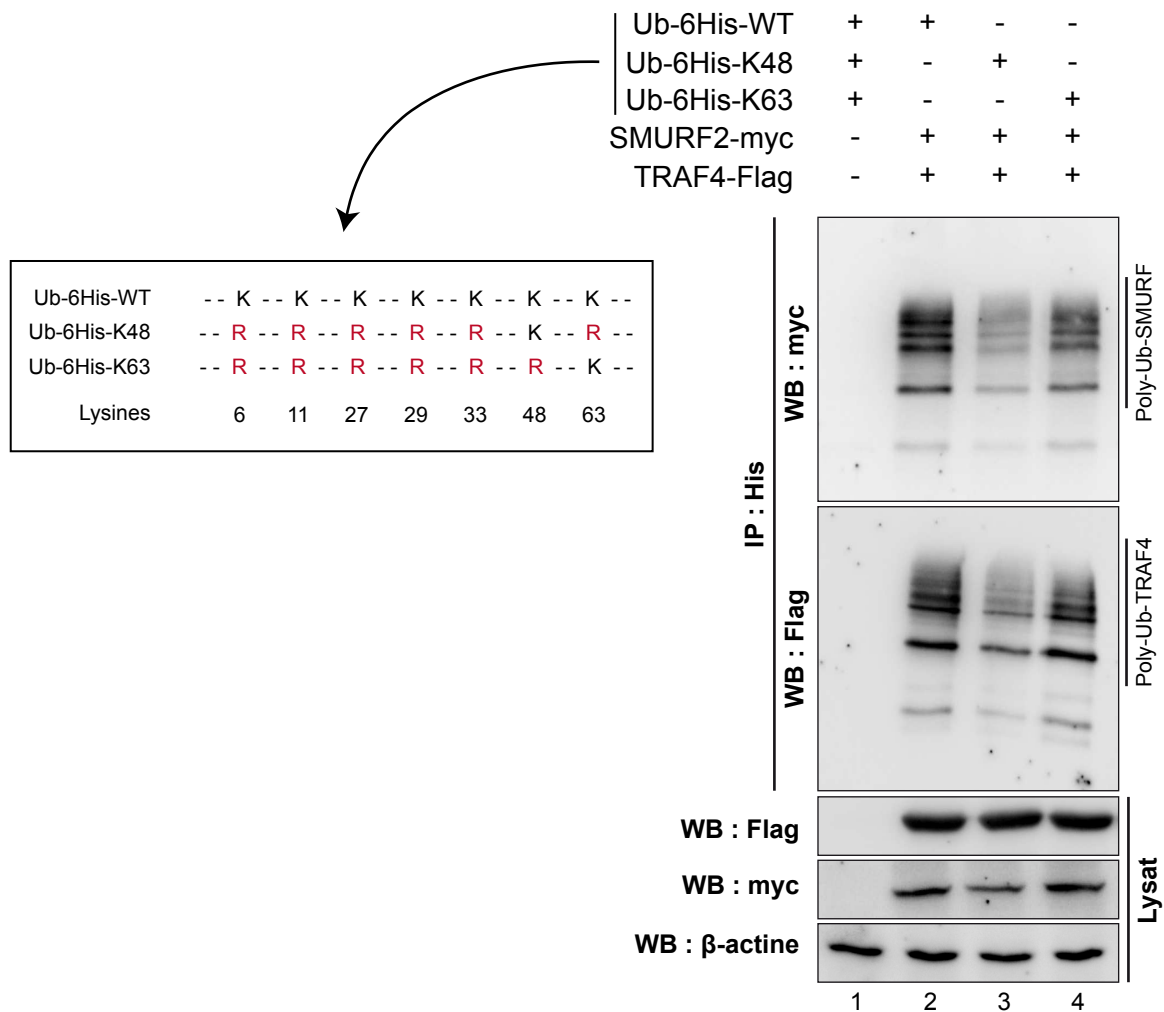


Figure 50 : Les protéines TRAF4 et SMURF2 sont principalement associées à de la polyubiquitinylation de type K63

Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec des vecteurs d'expression pour TRAF4-Flag et SMURF2-myc et un vecteur codant pour l'Ubiquitine-WT-6His, l'Ubiquitine-K48-6His ou l'Ubiquitine-K63-6His. Les ubiquitines mutantes K48 et K63 ne peuvent respectivement faire que de la polyubiquitinylation de type K48 et K63. Après lyse des cellules, les protéines ubiquitinylées (ubiquitines-6His) de l'extrait cellulaire sont précipitées avec des billes recouvertes de nickel. Le lysat et la fraction précipitée (IP : 6His) ont ensuite été analysés par western-blot.

Ub-6His-K48 et Ub-6His-K63 ont leurs lysines de surface mutées en arginine à l'exception respective des lysines 48 et 63 (Figure 50). La purification des protéines polyubiquitinylées en présence de SMURF2 et TRAF4 a été étudiée comme précédemment (Figure 50). Nous avons observé que la présence de TRAF4 promeut majoritairement de la polyubiquitinylation de type K63 sur SMURF2 (~ 65%) et réciproquement (Figure 50). Ces résultats suggèrent une activation mutuelle entre TRAF4 et SMURF2. Néanmoins, ces données devront être confirmées en étudiant l'impact du gain et de la perte de fonction de TRAF4 sur la localisation et la fonction de SMURF2 et vice-versa.

2.6. CONCLUSION

Les cellules épithéliales possèdent deux types de polarité, l'une dite apico-basale et l'autre planaire. Tandis que la polarité apico-basale permet la séparation de la cellule en deux compartiments, apical et basolatéral, la polarité planaire (PCP) est responsable d'une asymétrie gauche-droite. La PCP est connue pour être impliquée dans divers processus développementaux comme la convergence-extension et la tubulogenèse (Wang and Nathans, 2007). Plusieurs études suggèrent que TRAF4 pourrait être un régulateur de la PCP. En effet, les souris déficientes pour TRAF4 ont un défaut de fermeture du tube neural (Régnier et al., 2002), un phénotype lié à une altération du mécanisme de convergence-extension, et il a récemment été décrit que TRAF4 interagit avec les protéines SMURFs, des ligases E3 impliquées dans la voie Wnt/PCP (Narimatsu et al., 2009;). Nous avons donc émis l'hypothèse que TRAF4, en interagissant avec les protéines SMURFs, soit impliquée dans la PCP. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord recherché la présence des défauts liés à l'altération de la PCP dans des souris déficientes pour TRAF4. Puis nous avons étudié, au niveau moléculaire, la relation entre TRAF4 et les protéines SMURFs.

Nous avons observé que les souris déficientes pour TRAF4 outre le défaut de fermeture du tube neural, présentaient une altération de l'élongation de la cochlée et un défaut d'élongation de l'axe du corps de l'embryon. Ces trois phénotypes sont directement liés à une convergence-extension anormale, un mécanisme dépendant de la polarité planaire (Tada and Heisenberg, 2012; Ybot-Gonzalez et al., 2007). La PCP permet également l'orientation des structures apicales telles que les cils dans le plan de l'épithélium. Il a été décrit que la déficience des protéines impliquées dans la voie Wnt/PCP comme Vangl2, conduit à une altération de l'organisation et de l'orientation des cellules ciliées de l'organe de Corti (Montcouquiol et al., 2003). Nous avons comparé les oreilles internes de souris déficientes pour TRAF4 avec celles de souris sauvages et observé que l'absence de TRAF4 est associée à

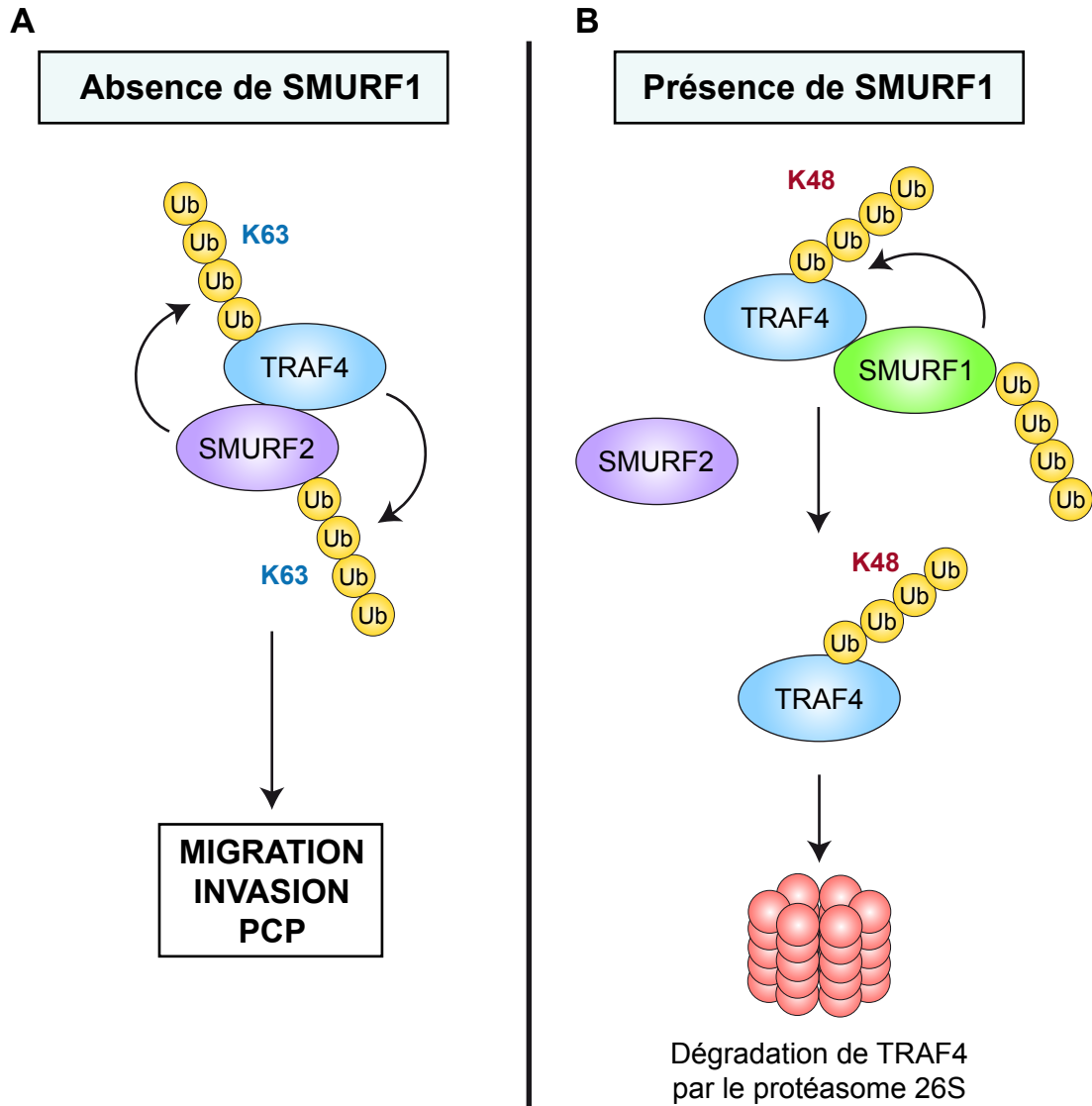


Figure 51 : Modèle de la relation entre TRAF4 et les protéines SMURFs

A. Basé sur mes résultats, l'interaction de TRAF4 avec SMURF2 conduit à leur polyubiquitinylation mutuelle. Des chaînes de polyubiquitine K63 étant liées, cette modification post-traductionnelle pourrait être requise pour l'activation des protéines TRAF4 et SMURF2.

B. Il a été décrit dans la littérature que SMURF1 est un régulateur négatif de TRAF4 en marquant TRAF4 avec des chaînes de polyubiquitine de type K48, un signal conduisant TRAF4 à la dégradation via le protéasome 26S.

une altération de l'organisation des cellules ciliées externes, un phénotype analogue à celui des souris SMURF2 $-/-$.

Prises ensemble, ces données *in vivo* montrent que la déficience de TRAF4 chez la souris conduit à une altération de la polarité planaire et renforcent notre hypothèse selon laquelle TRAF4 serait impliqué dans la voie Wnt/PCP.

L'étude de la relation entre TRAF4 et les protéines SMURFs, nous a permis de montrer que TRAF4 recrute SMURF1 et SMURF2 dans des structures cytoplasmiques partiellement positives pour l'ubiquitine. Ce résultat suggère que TRAF4 forme un complexe avec SMURF1 et/ou SMURF2 qui serait impliqué dans des processus d'ubiquitination (Li et al., 2010; Wang et al., 2013). Des expériences d'ubiquitinylation réalisées au sein des cellules HEK293T suggèrent que TRAF4 polyubiquitinylerait majoritairement SMURF2, et ce de manière dépendante de son domaine RING. En retour, les protéines SMURFs peuvent également polyubiquitinyler TRAF4. Tandis que SMURF1 est décrit comme un régulateur négatif de TRAF4, nous avons observé que SMURF2, en liant majoritairement des chaînes de poly-ubiquitines de type K63 sur TRAF4, pourrait avoir un rôle activateur. En retour, TRAF4 réalise également de la polyubiquitinylation de type K63 sur SMURF2, et ce de manière dépendante de son domaine RING (Figure 51). De manière intéressante, d'autres études renforcent cette hypothèse. En effet, il a été décrit que SMURF2, à l'instar de TRAF4, est impliquée dans la migration et l'invasion des cellules épithéliales mammaires (CEM) cancéreuses (Jin et al., 2009). De plus, l'inhibition de SMURF1, un répresseur de TRAF4, augmente la migration et l'invasion des CEM cancéreuses dans des modèles de migration 3D (Sahai et al., 2007). Ces données permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle TRAF4 et SMURF2 pourraient s'activer mutuellement tandis que SMURF1 agirait comme un régulateur négatif en induisant la dégradation de TRAF4 (Figure 51). Il serait intéressant de tester cette hypothèse de régulation réciproque dans le cancer du sein par des études cliniques rétrospectives et par des modèles précliniques chez la souris.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Le gène *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4* a initialement été isolé dans le contexte du cancer, à partir d'une biopsie de ganglions lymphatiques métastasés dérivés d'un cancer du sein. Depuis, il a été montré que la surexpression de TRAF4 est retrouvée dans plus de 40% des carcinomes ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Néanmoins, une meilleure compréhension de son rôle physiopathologique est nécessaire pour valider son intérêt thérapeutique. Afin de progresser dans ce sens, pendant ma thèse, j'ai étudié le rôle de TRAF4 dans la formation des JSs et dans la PCP, deux processus altérés dans les carcinomes.

1. IMPLICATION DE TRAF4 DANS LA VOIE DU TGF-B

Lors de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe de Peter Ten-Dijke (Leiden University Medical Center, Hollande), cette équipe s'intéresse depuis de nombreuses années au rôle de la voie du TGF- β dans les cancers. Un de ses axes de recherche concerne l'identification de nouveaux acteurs de cette voie et ils ont identifié TRAF4 comme un régulateur intracellulaire potentiel des récepteurs TGF- β s. Cette collaboration m'a permis d'être co-auteur d'un article scientifique intitulé « TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis » (Zhang et al., 2013 : Annexe-2). Je vais énoncer ci-dessous les résultats originaux qui sont rapportés dans ce travail. De plus, une analyse critique de ces résultats associés à mes résultats sera développée.

1.1. Annexe-2 : TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis

Dans cet article, les auteurs montrent que TRAF4 contribue à l'induction de la voie de signalisation médiée par le TGF- β . Après traitement au TGF- β , TRAF4 interagit avec les récepteurs T β RI et T β RII, et empêche la polyubiquitinylation du récepteur T β RI. Cela se traduit par une stabilité accrue des récepteurs aux TGF- β et une augmentation de la signalisation par la voie canonique (médiée par les SMADs). Au niveau moléculaire, TRAF4 prévient la polyubiquitinylation du récepteur T β RI de deux façons : TRAF4 polyubiquitinylyle (K48) SMURF2, ce qui induit sa dégradation via le protéasome 26S et TRAF4 recrute la déubiquitinase USP15 qui enlève les chaînes d'ubiquitines des récepteurs T β RI. De plus, le recrutement de TRAF4 au niveau des récepteurs conduit à sa polyubiquitinylation de type K63 ce qui active la voie de signalisation TGF- β non-canonique dépendante de TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1). Au niveau fonctionnel, cet article établit que TRAF4 contribue à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) médiée par le TGF- β . En corolaire, la sous-expression de TRAF4 diminue fortement la formation de métastase dans des

modèles de xénogreffes chez la souris. Une étude clinique complète ce travail et associe la surexpression de TRAF4 dans les cancers du sein au niveau de phosphorylation des protéines SMAD2 et TAK1 et à un mauvais pronostic. Dans les paragraphes suivants, je vais discuter la cohérence de ces résultats avec mes données personnelles et celles de la littérature.

1.2. TRAF4, activateur ou répresseur de SMURF2 ?

Nous avons montré que la co-expression de TRAF4 avec SMURF1 et SMURF2 délocalise ces protéines SMURFs dans des structures ponctiformes cytoplasmiques positives pour TRAF4 (Figure 48). Cet effet suggère que TRAF4 et les protéines SMURFs interagissent directement dans des complexes qui adoptent une nouvelle localisation subcellulaire. Au niveau moléculaire, TRAF4 polyubiquitinye majoritairement SMURF2, et ce de manière dépendante de son domaine RING. En retour, les protéines SMURFs peuvent également polyubiquitinyler TRAF4 (Figure 49). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Zhang et ses collaborateurs qui montrent que les protéines SMURFs (surtout SMURF2) ubiquitinylent TRAF4 et que TRAF4 polyubiquitinye les protéines SMURFs (surtout SMURF2) (Annexe-2 : Figure-2). Ces polyubiquitinylations réciproques peuvent être directes car elles sont observées *in vitro* en utilisant des protéines SMURF1, SMURF2 et TRAF4 recombinantes (Annexe-2 : Figure-2H). Cette expérience a permis de montrer que TRAF4 polyubiquitinye directement par son domaine RING, les protéines SMURFs et surtout SMURF2.

Nous avons observé que TRAF4 réalise de la polyubiquitinylation de type K63 (~ 65%) et de type K48 (~ 35%) sur SMURF2. Réciproquement, SMURF2 réalise également de la polyubiquitinylation de type K63 (~ 72%) et de type K48 (~ 28%) sur TRAF4 (Figure 50). L'assemblage d'une chaîne de polyubiquitine K48 sur une protéine est une marque conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S tandis que l'assemblage d'une chaîne de polyubiquitine K63 ne conduit généralement pas à la dégradation du substrat mais modifie sa fonction et/ou sa localisation subcellulaire. Ces résultats suggèrent que TRAF4 et SMURF2 pourraient s'activer mutuellement. De manière surprenante, Zhang et ses collaborateurs montrent que TRAF4 greffe des chaînes de polyubiquitine K48 sur SMURF2 suite à un traitement au TGF- β , ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome 26S (Annexe-2 : Figure-2K et -3). Néanmoins, dans tous les tests d'ubiquitinylation que j'ai réalisé, je n'ai jamais observé que la co-expression de TRAF4 avec SMURF2 conduisait à une diminution du taux de protéines SMURF2 dans le lysat. Nous avons utilisé la même lignée cellulaire HEK293T pour les expériences d'ubiquitinylation ; la plus grande différence concerne le

temps de transfection. Il est concevable que la cinétique de polyubiquitinylation réciproque entre SMURF2 et TRAF4 explique ces différences. Comme le décrivent Zhang et al., 18h après transfection la polyubiquitinylation de SMURF2 par TRAF4 conduit à sa dégradation, alors que plus tardivement (36h), comme je l'observe, l'accumulation de SMURF2 dans les structures ponctiformes cytoplasmiques positives pour TRAF4, empêche sa dégradation. Cette hypothèse devra être vérifiée en mesurant la stabilité de la protéine SMURF2 en présence de TRAF4 lors d'une cinétique allant de 18 à 36h. De plus l'utilisation des mutants d'ubiquitine qui ne font que de la polyubiquitinylation de type K48 (Ub-6His-K48) ou K63 (Ub-6His-K63), permettra de connaître le spectre de polyubiquitinylation au cours du temps.

Après traitement au TGF- β , TRAF4 est recruté au niveau des récepteurs T β RI et T β RII, où il est polyubiquitinylé (K63) de manière dépendante de son domaine RING (Annexe-2 : Figure-4). Ce résultat suggère que TRAF4, une fois recruté au niveau des récepteurs aux TGF- β s, pourrait s'auto-ubiquitinyler (K63). Les chaînes de polyubiquitine seraient ensuite reconnues par TAK1 qui induirait l'activation de la voie non-canonique du TGF- β . Pour notre part, nous avons observé que SMURF2 polyubiquitinylerait fortement la protéine TRAF4 sauvage mais moins fortement TRAF4-mutRING (Figure 49). Ce résultat suggère que l'activité ubiquitine ligase E3 de TRAF4 contribue à son ubiquitinylation par SMURF2. Nous avons émis deux hypothèses : soit TRAF4 active SMURF2 par polyubiquitinylation, qui en conséquence polyubiquitinylerait plus fortement TRAF4 ; soit la polyubiquitinylation de TRAF4 par SMURF2 active TRAF4 qui s'auto-polyubiquitinylerait en retour. Nos résultats associés à ceux de Zhang confortent la seconde hypothèse. TRAF4 serait plus un régulateur négatif de SMURF2 qu'un activateur. Nous pourrions imaginer un modèle selon lequel TRAF4 est polyubiquitinylé par SMURF2, ce qui induit son activation. En retour, TRAF4 pourrait exercer un rétrocontrôle négatif en polyubiquitinylant SMURF2 et également s'auto-ubiquitinyler pour activer la voie non-canonique du TGF- β . Cette hypothèse ne satisfait pas toutes les observations rapportées dans la littérature. La régulation de SMURF2 par TRAF4 pourrait être positive ou négative selon le contexte cellulaire. Par exemple, après traitement au TGF- β , TRAF4 est un répresseur de SMURF2 (Zhang et al., 2013). D'autres données suggèrent que TRAF4 agirait de concert avec SMURF2 dans certaines voies de signalisation suggérant plutôt une activation mutuelle de ces deux protéines. Premièrement, TRAF4 et SMURF2 peuvent conduire à la dégradation de p53 dans les cellules MCF7 (Nie et al., 2010; Yi et al., 2013). Deuxièmement, la perte de TRAF4 et celle de SMURF2 chez la souris engendrent un phénotype très similaire caractérisé par un défaut de fermeture du tube neural, une altération du mécanisme de convergence-extension, une altération de la PCP et la

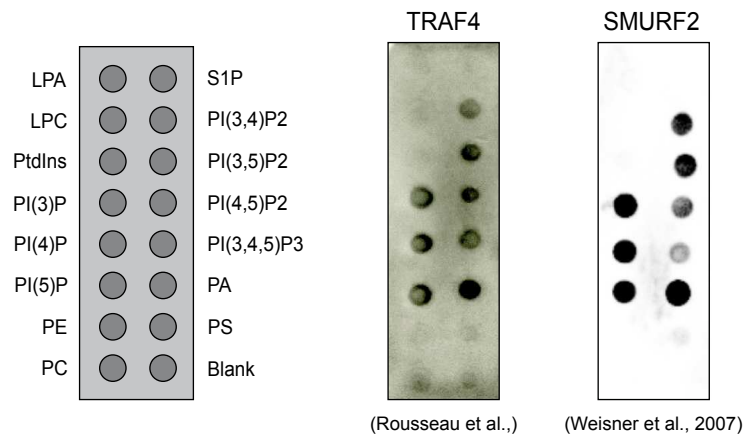


Figure 52 : TRAF4 et SMURF2 lient les PIPs et l'acide phosphatidique

Etude de l'interaction de TRAF4 et SMURF2 avec les PIPs par «Lipid Overlay». A l'instar de TRAF4, SMURF2 lie l'ensemble des PIPs et l'acide phosphatidique. Cette interaction est médiée par le domaine C2 de SMURF2 (adapté de Weisner et al., 2007).

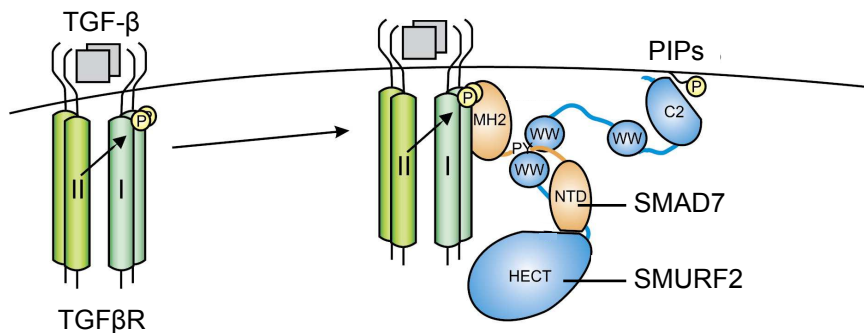


Figure 53 : Mécanisme du recrutement de SMURF2 au niveau des récepteurs au TGF- β

Les tétramères de TGF β R liés à leurs ligands vont initier la voie de signalisation du TGF- β . Un rétrocontrôle négatif est médié par les protéines SMAD7 et SMURF2. Le recrutement membranaire de SMURF2 au niveau des récepteurs TGF β Rs est dépendante de la liaison de ses domaines C2 et WW respectivement avec les PIPs et le motif PxxY de SMAD7. Une fois recruté SMURF2 polyubiquitine les récepteurs TGF β R conduisant à leur dégradation par le protéasome 26S (adapté de Weisner et al., 2007).

présence d'animaux ayant la queue tordue (Narimatsu et al., 2009; Régnier et al., 2002). Troisièmement, SMURF2 et TRAF4 sont tous les deux impliqués dans la migration cellulaire (Jin et al., 2009; Yang et al., 2009; résultats § 3.2). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour appréhender de manière exhaustive la relation entre TRAF4 et SMURF2.

1.3. Implication potentielle de la liaison aux PIPs dans l'activation de la voie TGF- β

Nous avons montré que TRAF4 interagit avec l'ensemble des PIPs via son domaine TRAF et que la liaison aux PIPs est nécessaire à son recrutement à la membrane plasmique (résultats § 3.2). De manière intéressante, il a été montré que SMURF2 lie les PIPs via son domaine C2, et que ce mécanisme est nécessaire à son recrutement membranaire (Lu et al., 2011; Wiesner et al., 2007). De plus, le profil de liaison aux lipides de SMURF2 observé en « Lipid Overlay » est très similaire à celui de TRAF4 (Figure 52). Par ailleurs, Zhang et al., ont montré que les domaines WW et C2 de SMURF2 sont essentiels pour l'interaction entre TRAF4 et SMURF2 (Annexe-2 : Figure-S1A). Ces données montrent que TRAF4 et SMURF2 empruntent une stratégie commune de recrutement membranaire et que ce recrutement avec les PIPs représenterait une étape essentielle pour leur interaction.

Nous avons observés que toutes les protéines TRAFs peuvent lier les PIPs via leur domaine TRAF ou WD40 (Figure 37). Les motifs de liaison impliqués dans l'interaction avec les récepteurs membranaires et les PIPs ne sont pas chevauchant, nous avons donc proposé que la liaison aux PIPs puisse fortement augmenter l'affinité des TRAFs pour la membrane plasmique et ainsi favoriser leur interaction avec les récepteurs membranaires. De manière intéressante, un mécanisme analogue a été proposé pour expliquer l'interaction entre SMURF2 et les récepteurs T β RI et T β RII. SMURF2 interagit directement avec le complexe formé par les récepteurs et la protéine SMAD7 via ses domaines WW et avec les PIPs de la membrane plasmique via son domaine C2 (Figure 53).

Il serait vraiment intéressant de savoir si l'activation des voies TGF- β canonique et non-canonique (TAK1) médiée par TRAF4 suite à un traitement au TGF- β est dépendante de son interaction avec les PIPs. Nos résultats structure-fonction alliés à ceux de Zhang et al., permettraient de répondre à cette question. TRAF4 interagit avec les récepteurs T β RI et T β RII suite à un traitement au TGF- β (Zhang et al., 2013). En conséquence, nous pourrions tester la capacité du mutant TRAF4-K345E à interagir avec les récepteurs T β RI et T β RII suite à un traitement au TGF- β . De plus, les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) établis à partir d'embryons déficients pour TRAF4 sont beaucoup moins sensibles au TGF- β que ceux établis

à partir d'embryons sauvages (Annexe-2 : Figure-1). De ce fait, il serait intéressant de réaliser une restauration de fonction au sein des MEFs TRAF4 $-/-$, en ré-exprimant de manière stable la protéine TRAF4 sauvage ou mutante ne liant pas les PIPs (TRAF4-K345E), afin de voir si on restaure la sensibilité au TGF- β .

1.4. Les rôles de TRAF4 dans les JSs et la migration sont-ils dépendants des TGF- β s ?

1.4.1. Rôle de TRAF4 dans la transition épithélio-mésenchymateuse

Nous avons observé que TRAF4 est un régulateur négatif des JSs au sein des cellules épithéliales mammaires, une fonction dépendante de sa liaison aux PIPs (résultats § 3.2). TRAF4 apparaît comme un régulateur de la plasticité des JSs, un processus clé impliqué dans divers mécanismes notamment dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est un mécanisme dynamique au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales pour développer des propriétés mésenchymateuses. Ce processus requiert la perte des jonctions intercellulaires (surtout JSs et JAs), il est caractérisé majoritairement par une diminution de l'E-cadhérine et par une augmentation de l'expression de marqueurs de type mésenchymateux comme l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), la vimentine et des métalloprotéinases matricielles (Polette et al., 2007; Savagner, 2010). Le rôle de TRAF4 dans la plasticité des complexes jonctionnels est en accord avec la littérature. Chez le Xénope, la sous-expression de TRAF4 diminue l'expansion des cellules des crêtes neurales (CCNs) tandis que sa surexpression l'augmente (Kalkan et al., 2009). Lors du développement embryonnaire, la migration des CCNs est initiée par le mécanisme de TEM. La sous-expression de TRAF4 stabilise les JSs, ce qui limite et/ou retarde la TEM des CCNs et ainsi leur expansion. A l'inverse, la surexpression de TRAF4 augmente la plasticité des JSs et facilite la TEM ce qui conduit à une expansion accrue des CCNs.

De manière intéressante, ce rôle de TRAF4 comme modulateur des complexes jonctionnels fait écho au travail de Zhang et al., qui montre que la sous-expression de TRAF4 dans les cellules MCF10A freine l'EMT induite par un traitement au TGF- β (Annexe-2 : Figure-5). En corolaire, la surexpression de TRAF4 promeut la TEM induite au TGF- β par un mécanisme dépendant de son activité E3 ubiquitine ligase. En régulant la plasticité des JSs et la sensibilité au TGF- β , TRAF4 peut être considéré comme un modulateur de l'EMT. Actuellement nous ne savons pas si la régulation des JSs médiée par TRAF4 est exclusivement dépendante de la voie TGF- β . En effet, les tests de formation de JSs réalisés dans mon étude sur les cellules MCF10A et MCF7 ont été effectués en présence de 10% de

sérum de veau fœtal (résultats § 3.2). Ces sérums contiennent une grande quantité de facteurs de croissance incluant du TGF- β . Afin de répondre à cette question, il est donc nécessaire de répéter ces expériences en utilisant un milieu de culture déplété en facteurs de croissance ou en présence d'anticorps bloquants l'ensemble des TGF- β s (Arteaga et al., 1993; Biswas et al., 2007).

1.4.2. Le rôle de TRAF4 dans la migration

Nous avons montré que la sous-expression de TRAF4 diminue la migration des cellules épithéliales mammaires (CEMs) ; la réexpression de TRAF4 sauvage restaure le défaut de migration tandis que le mutant ne liant pas les PIPs (TRAF4-K345E) ne le fait pas. L'expérience complémentaire visant à surexprimer TRAF4 a montré que l'augmentation du niveau d'expression de TRAF4 promeut la migration des CEMs (§ 3.2). Nos expériences ne permettent pas d'associer directement et complètement le rôle de TRAF4 sur les JSs à son rôle sur la migration cellulaire. Dans nos conditions expérimentales, les deux lignées testées ont une migration accrue en présence de TRAF4 et diminuée en son absence (résultats § 3.2). Or, la migration des cellules MCF10A est observée avant qu'elles puissent former des JSs, et la migration des cellules MCF7 est observée alors que ces cellules forment des JSs. De manière cohérente avec ces données, Zhang et al., ont montré que les MEFs, dépourvues de JSs et de JAs, établis à partir d'embryons déficients pour TRAF4 migrent significativement moins que ceux établis à partir d'embryons sauvages (Annexe-2 : Figure-5D). Ce phénotype est exacerbé suite à l'ajout de TGF- β . Par ailleurs, les cellules dendritiques provenant de souris déficientes pour TRAF4 ont également un défaut de migration, ce qui confirme que TRAF4 a un effet pro-migratoire qui n'est pas restreint aux cellules épithéliales (Cherfils-Vicini et al., 2008).

Prises dans leur ensemble, ces données démontrent que TRAF4 promeut la migration cellulaire et suggèrent qu'il aurait deux modes d'action : l'un lié à la déstabilisation des JSs et l'autre dépendant de la voie TGF- β .

L'équipe de Peter Ten-Dijke a également montré que la sous-expression de TRAF4 au sein des cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-231 diminue la formation des métastases dans des modèles de xénogreffes chez la souris (Annexe-2 : Figure-6). Enfin par une étude clinique, ils montrent que le niveau d'expression de TRAF4 est corrélé au développement des métastases dans les cancers du sein, ce qui en fait un marqueur de mauvais pronostic (Annexe-2 : Figure-7). Cette donnée s'accordant à une autre étude publiée récemment (Yi et al., 2013).

En termes de traitement, TRAF4 semble être une cible thérapeutique intéressante dans le cancer du sein. Sa fonction E3 ubiquitine ligase pourrait être inhibée, des drogues ciblant les domaines E3 ubiquitine ligase ont été développées (Cohen and Tcherpakov, 2010). Néanmoins, il existe plus de 600 E3 ubiquitine ligases chez l'homme suggérant une difficulté à cibler de manière spécifique le domaine RING ou HECT d'une protéine ; ce qui peut se traduire par des effets secondaires importants. Notre travail qui montre l'importance de la liaison aux lipides dans la fonction de TRAF4, permet de proposer une alternative pharmacologique au ciblage de TRAF4 dans les cancers. Si, en plus de prévenir le rôle inhibiteur de TRAF4 dans les JSs et dans la migration cellulaire, la perte de liaison aux PIPs de TRAF4 abolit son interaction avec les récepteurs aux TGF- β s, il serait intéressant de développer des drogues qui en ciblant le site de liaison aux PIPs empêcheraient l'interaction TRAF-PIP. En effet, le domaine TRAF est peu représenté au sein des protéines humaines ce qui en fait un cible potentiellement plus spécifique.

2. ETUDE DE LA FONCTION E3 UBIQUITINE LIGASE DE TRAF4

TRAF4 est une E3 ubiquitine ligase appartenant à la famille des protéines TRAFs. Tandis que la fonctionnalité du domaine RING des autres membres de la famille a déjà été montrée depuis plusieurs années (Oeckinghaus et al., 2011; Tseng et al., 2010; Zotti et al., 2012), celle de TRAF4 a été mise en évidence récemment par l'équipe de Peter Ten-Dijke (Zhang et al., 2013). L'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF4 est nécessaire à l'induction de la TEM médiée par le TGF- β . Il serait intéressant d'explorer cette fonction E3 ligase du domaine RING de TRAF4 dans les contextes de formation des JSs et migration cellulaire. Pour cela, nous pourrions exploiter le mutant TRAF4-mutRING. Ce mutant au sein duquel cinq résidus impliqués dans la chélation du zinc sont remplacés par des Alanines (C18A, C34A, H36A, C39A et C42A) n'a plus d'activité E3 ubiquitine ligase (Figure 49). A l'instar des expériences de restauration d'expression avec le mutant ne liant plus les PIP (Rousseau et al., Figure 6), nous pourrions introduire ce mutant dans la lignée MCF10A/shT4 et mesurer la formation des JSs. Le résultat obtenu devra être confirmé en ré-exprimant la forme mutante ou sauvage de TRAF4 au sein des cellules MCF7/shT4, qui seront ensuite analysées par la technique du « Calcium switch ». Cela permettra de savoir si l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF4 est nécessaire à la restauration d'une cinétique normale de formation des JSs.

La même stratégie sera utilisée pour montrer l'implication potentielle du domaine RING de TRAF4 dans la migration cellulaire. En effet, la migration des lignées cellulaires MCF10/shT4 et MCF7/shT4 ré-exprimant la protéine TRAF4 sauvage ou mutante (TRAF4-

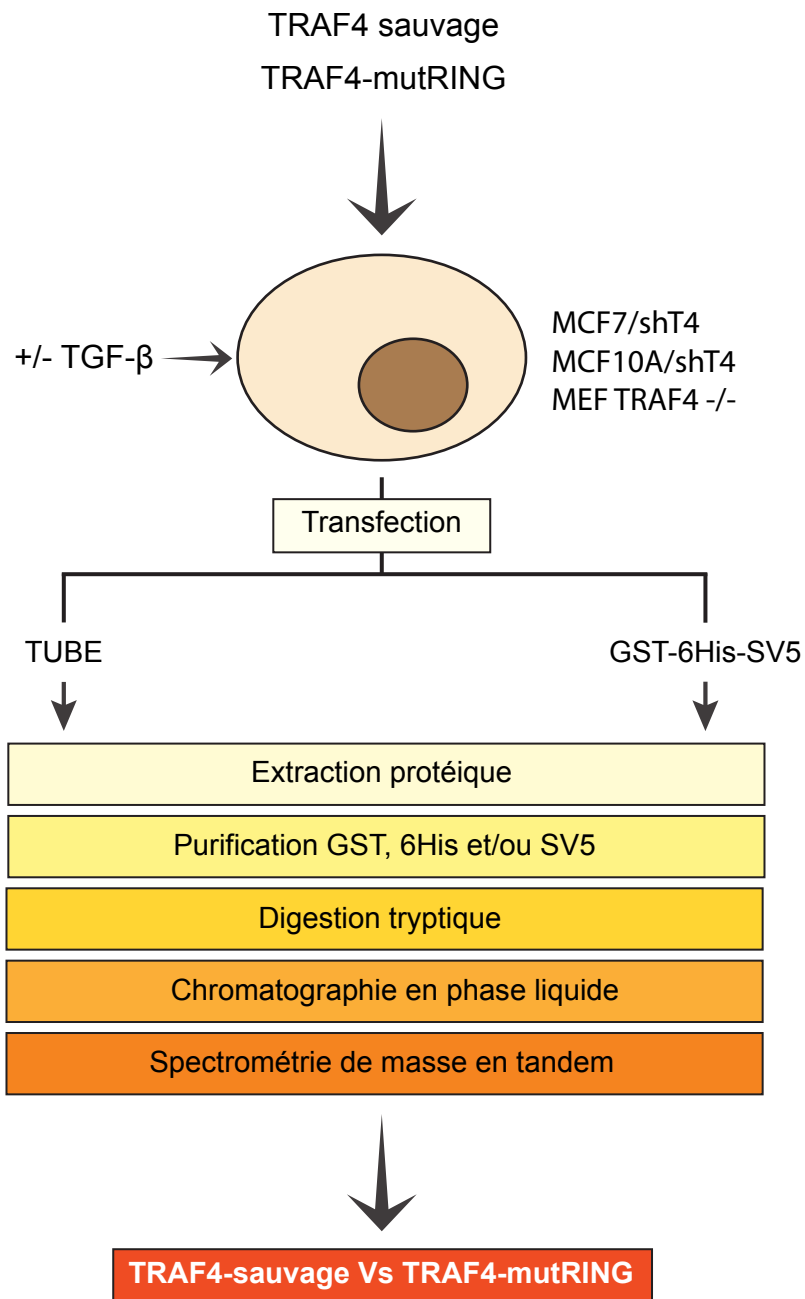


Figure 54 : Stratégie permettant l'identification des substrats de TRAF4

Les cellules déficientes pour TRAF4 (MCF10A/shT4; MCF7/shT4 et MEF TRAF4 -/-) sont transduites avec des vecteurs rétroviraux codant pour TRAF4 sauvage ou muté sur son domaine RING (TRAF4-mutRING) insensible aux ARN interférents shT4. La construction TUBE et le vecteur contrôle GST-6His-SV5 sont ensuite transfectés dans les lignées cellulaires préalablement établies. Après extraction des protéines, elles sont purifiées puis digérées à la trypsine. Les fragments peptidiques sont séparés sur chromatographie en phase liquide pour ensuite être analysés par spectrométrie de masse en tandem. Les substrats de TRAF4 correspondent aux protéines identifiées dans les cellules réexprimant TRAF4 sauvage qui ne sont pas purifiées dans les cellules réexprimant le mutant du domaine RING. TUBE : Tandem Ubiquitin Binding Entities; GST : Glutathion-S-Transferase; 6His : 6 Histidines et SV5 : épitope du paramyxovirus.

mutRING) sera étudiée par deux méthodes complémentaires : le test de cicatrisation et la technique des chambres de Boyden.

Ensembles, ces expériences permettront de savoir si TRAF4 déstabilise les JSs de manière dépendante de son domaine RING. Il est effectivement possible que TRAF4 déstabilise les JSs en polyubiquitinylant et induisant la dégradation de composants de ces structures jonctionnelles. Un tel mécanisme de régulation a déjà été décrit pour ITCH, une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT, qui polyubiquitinylye l'Occludine et induit sa dégradation par le protéasome 26S (Traweger et al., 2002). De manière similaire, la demi-vie de la claudine-5 est également directement dépendante du système d'ubiquitinylation (Mandel et al., 2012).

3. IDENTIFICATION DE SUBSTRAT DU DOMAINE RING DE TRAF4

TRAF4 apparait de plus en plus comme une protéine aux multiples fonctions. Elle est impliquée dans différents processus comme l'apoptose (médiée par p53), l'immunité innée, la migration cellulaire, la TEM, la convergence-extension et la PCP (Marinis et al., 2011; Yi et al., 2013; Zhang et al., 2013; Résultats et discussion : §1 et §2). Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent mal compris. De ce fait, il serait nécessaire d'identifier les substrats du domaine RING de TRAF4 afin de décoder les mécanismes moléculaires médiés par TRAF4. Pour cela, l'utilisation d'une méthodologie sensible et non biaisée serait idéale. Dans ce contexte, la technique TUBE (Tandem ubiquitin-binding entities) (Hjerpe et al., 2009) associée à une chromatographie en phase liquide (HPLC : High-Performance Liquid Chromatography) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) semble une stratégie prometteuse (Figure 54) (Haynes et al., 1998).

3.1. La technique TUBE

La technique TUBE a été développée par l'équipe de Manuel S. Rodriguez en 2009, dans le but de purifier les protéines polyubiquitinyllées au sein des cellules. D'autres techniques de purification existaient mais plusieurs problèmes récurrents étaient observés :

- Les protéines polyubiquitinyllées par des chaînes K48 sont rapidement dégradées par le protéasome 26S et l'usage d'inhibiteur du protéasome modifie fortement la physiologie de la cellule.
- Certaines protéines ubiquitinyllées sont très rapidement déubiquitinyllées par des protéases à cystéine, les DUBs (Deubiquitinating enzymes). L'usage d'inhibiteurs des DUBs comme le NEM (N-ethylmaleimide) et l'IAA (Iodoacetamide) ne sont pas

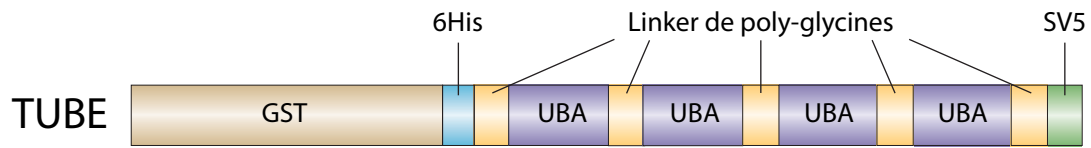


Figure 55 : Représentation schématique de la construction TUBE (Tandem-Ubiquitin Binding Entities)

La construction TUBE sert à la purification des protéines ubiquitinylées. TUBE est constitué de quatre domaines UBAs (Ubiquitin-Associated) de l'Ubiquiline-1 en tandem séparés par des linkers de poly-glycines qui servent à la liaison aux protéines ubiquitinylées. Elle contient également trois domaines servant à la purification : GST (Glutathion-S-Transferase), 6His (6 Histidines) et SV5 (épitope du paramyxovirus) qui sont respectivement liés par des billes recouvertes de glutathion, de Nickel et d'anticorps anti-SV5.

spécifiques aux DUBs mais inhibent l'ensemble des protéases à cystéines ce qui modifie également la physiologie de la cellule.

- L'usage d'un domaine de liaison à l'ubiquitine UBA (Ubiquitin-Associated) pour purifier les protéines ubiquitinylées est efficace essentiellement pour les protéines mono-ubiquitinylées.

L'équipe de Manuel S. Rodriguez a eu l'idée d'utiliser une protéine de fusion très affine pour les protéines ubiquitinylées comportant quatre domaines UBA en tandem provenant de l'Ubiquiline-1 associés à plusieurs étiquettes servant à la purification (GST : Glutathion-S-Transfère ; 6His : 6 Histidines successives et l'épitope V5 du paramyxovirus) (Figure 55). Cette construction nommée TUBE lie fortement les protéines polyubiquitinylées, ce qui permet leur purification de manière efficace. Ils ont montré que la liaison de cette protéine de fusion TUBE aux protéines polyubiquitinylées par des chaînes K48 prévient leurs reconnaissances par le protéasome 26S et ainsi leurs dégradations. De plus, la liaison de TUBE aux protéines polyubiquitinylées prévient leurs reconnaissances par les DUBs, ce qui augmente la stabilité des chaînes de polyubiquitines et ce même en absence des inhibiteurs NEM et IAA (Aillet et al., 2012; Hjerpe et al., 2009). La construction TUBE permet donc une purification très efficace des protéines polyubiquitinylées qui pourront ensuite être analysées par différentes méthodes incluant la spectrométrie de masse.

3.2. Analyse des protéines ubiquitinylées par spectrométrie de masse

Les différentes protéines ubiquitinylées purifiées sont digérées à la trypsine et les peptides qui en découlent sont soumis à une séparation par chromatographie en phase liquide suivie d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (Figure 54) (Lopitz-Otsoa et al., 2012). L'usage de la spectrométrie de masse en tandem permet une meilleure caractérisation des peptides et ainsi une meilleure identification des protéines ubiquitinylées (Tsybin et al., 2011).

3.3. Identification des cibles de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF4

Afin d'identifier les cibles du domaine RING de TRAF4 la méthode TUBE associée à une identification des protéines ubiquitinylées par HPLC-MS/MS pourrait être réalisée sur des cellules épithéliales mammaires MCF10A/shT4 et MCF7/shT4 où la protéine TRAF4 sauvage ou le mutant du domaine RING (TRAF4-mutRING) seraient réexprimés de manière stable (Figure 54). Les protéines identifiées exclusivement au sein des extraits protéiques provenant

des cellules où la protéine TRAF4 sauvage est réexprimée seront les substrats directs ou indirects de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF4. Cette stratégie pourrait également être appliquée aux cellules MEFs provenant d'embryons déficients pour TRAF4 où la protéine TRAF4 sauvage ou le mutant TRAF4-mutRING seront réexprimés (Figure 54). L'usage des cellules déficientes en TRAF4 pour l'expression de TRAF4 sauvage ou mutant permet de s'affranchir de la protéine endogène sauvage qui pourrait compenser la perte de fonction du mutant TRAF4-mutRING. Ces expériences pourraient être réalisées en présence de TGF beta afin d'isoler les cibles de TRAF4 constitutives et celles dépendante de la voie du TGF beta. Cette approche permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de la fonction de TRAF4 à l'échelle moléculaire.

4. TRAF4 DANS LA CARCINOGENESE.

TRAF4 a initialement été identifié comme étant surexprimé dans les cancers du sein (Régnier et al., 1995; Tomasetto et al., 1995). Actuellement, TRAF4 apparait comme une protéine communément surproduite dans plus de 40% des carcinomes tous confondus, en partie à cause de son amplification génique (Bièche et al., 1996; Camilleri-Broët et al., 2007; Rhodes et al., 2004). Bien que sa découverte remonte presque à 20 ans, la caractérisation de son rôle pro-tumoral est très récente. En effet, cette année, l'équipe de Bert O'Malley a montré que la surexpression de TRAF4 prévient la déubiquitinylation de p53 médiée par HAUSP, ce qui déstabilise p53 et prévient ainsi l'apoptose induite suite à un stress oxydatif (Yi et al., 2013). Dans un travail en cours de publication, l'équipe de Peter Ten-Dijke a montré que TRAF4 polyubiquitinye et induit la dégradation de SMURF2 et participe à l'activation de la voie TGF- β canonique (SMADs) et non-canonique (TAK1). Au niveau fonctionnel, TRAF4 participe à l'établissement de la TEM induite par le TGF- β et est essentiel pour la migration des cellules non polarisée. De plus, la perte de TRAF4 diminue fortement la formation des métastases dans des modèles de xénogreffes chez la souris (Annexe-2 : Zhang et al., 2013). Ces deux équipes rapportent des études cliniques rétrospectives indiquant que l'expression de TRAF4 dans les cancers du Sein est associée à un mauvais pronostic (Yi et al., 2013; Zhang et al., 2013). Pour notre part, nous avons montré que TRAF4 lie les PIPs via son domaine TRAF, un mécanisme conservé au sein de la famille TRAFs. Le recrutement de TRAF4 aux JSs est dépendant de son interaction avec les PIPs. Au niveau fonctionnel, TRAF4 diminue la formation et/ou la stabilité des JSs et promeut la migration des cellules épithéliales mammaires. Ces deux fonctions sont également dépendantes de sa liaison aux PIPs (Rousseau et al., en révision).

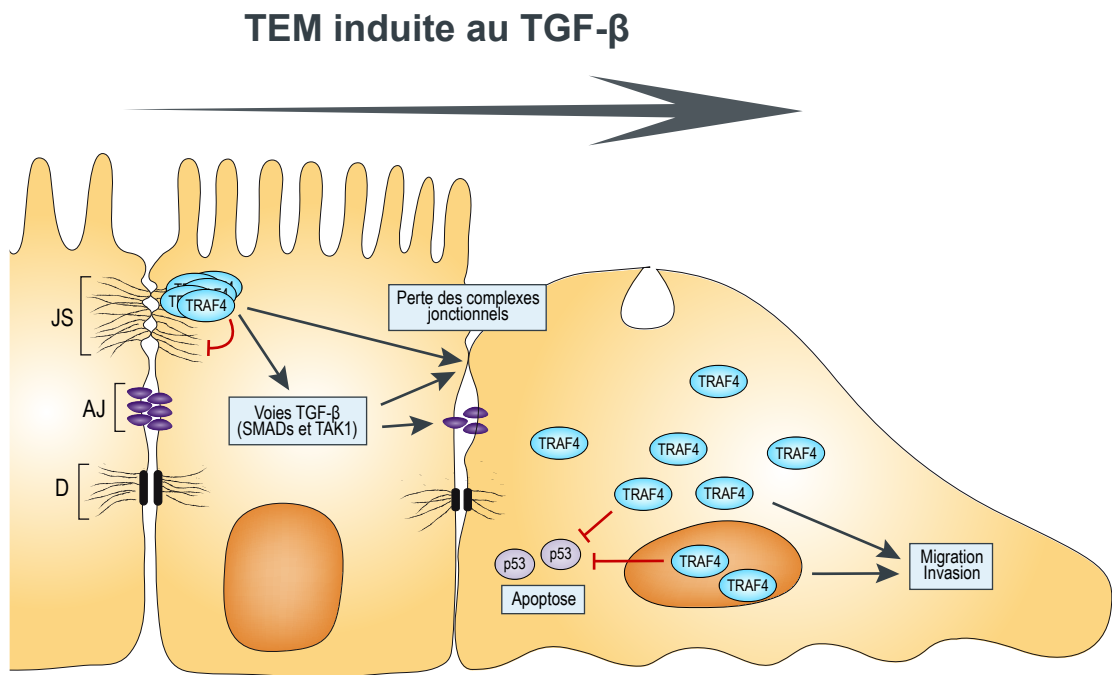


Figure 56 : Modèle du rôle de TRAF4 dans la carcinogénèse

La présence de JSs conduit au recrutement de TRAF4, un mécanisme dépendant de la liaison aux PIPs. TRAF4 déstabilise les JSs et promeut l'activation de la voie TGF- β canonique (SMADs) et non-canonique (TAK1), ce qui favorise *in fine* l'établissement de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La perte de complexes jonctionnels conduit à la localisation cytoplasmique et nucléaire de TRAF4, lieu où elle promeut la migration et l'invasion cellulaire tout en inhibant l'apoptose induite par p53 (adapté de Mosesson et al., 2008).

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que TRAF4 a un rôle pléiotropique dans la carcinogenèse. Nous pouvons proposer le modèle suivant (Figure 56):

TRAF4, en régulant négativement les JSs, promeut la progression des carcinomes. Néanmoins, il a été décrit que les JSs inhibent aussi bien la migration que la prolifération cellulaire, or la surexpression de TRAF4 promeut uniquement la migration. Cela peut-être expliqué par l'implication de TRAF4 dans la voie TGF- β . En effet, il a été décrit que la voie TGF- β a deux effets opposés : un rôle anti-tumoral en inhibant la prolifération cellulaire et un rôle pro-tumoral en stimulant la migration et la formation de métastases. Nous pouvons imaginer la séquence suivante : TRAF4 déstabilise les JSs, cette déstabilisation induit la migration et la prolifération cellulaire, mais l'effet sur la prolifération est contrebalancé par l'activation concomitante de la voie TGF- β . Concernant la progression tumorale, plusieurs rôles peuvent être évoqués : premièrement, en augmentant la plasticité des JSs, TRAF4 favorise leur dissolution ; deuxièmement, TRAF4 en tant qu'effecteur de la voie du TGF- β , favorise la TEM ; troisièmement, les complexes jonctionnels détruits, la localisation cytoplasmique et nucléaire de TRAF4 préviennent l'apoptose médiée par p53 et promeuvent la migration et l'invasion cellulaire favorisant la formation de métastases.

Tous ces éléments, font de TRAF4 une cible thérapeutique intéressante. Pour cela, il est envisageable de développer des drogues inhibant l'interaction TRAF-PIPs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2009). Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2372–2389.
- Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 231–240.
- Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Hjerpe, R., Torres-Ramos, M., Lang, V., and Rodríguez, M.S. (2012). Isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 832, 173–183.
- Akhtar, A. (2001). The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep.* 2, 113–118.
- Aktorics, K., and Barbieri, J.T. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 397–410.
- Angst, B.D., Marcozzi, C., and Magee, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114, 629–641.
- Arch, R.H., Gedrich, R.W., and Thompson, C.B. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 12, 2821–2830.
- Arteaga, C.L., Hurd, S.D., Winnier, A.R., Johnson, M.D., Fendly, B.M., and Forbes, J.T. (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 92, 2569–2576.
- Assémat, E., Bazellères, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 614–630.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., Gespach, C., 1997. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 1429–1432.
- Axelrod, J.D. (2002). Strabismus comes into focus. *Nat. Cell Biol.* 4, E6–E8.

-B-

- Baeuerle, P.A., and Henkel, T. (1994). Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141–179.
- Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., González, S., Cereijido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031–1049.
- Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160, 423–432.
- Balla, T. (2007). Imaging and manipulating phosphoinositides in living cells. *J. Physiol.* 582, 927–937.
- Balla, T., and Varnai, P. (2009). visualization of cellular phosphoinositide pools with gfp-fused protein-domains. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan S Bonifacino *CHAPTER*, Unit–24.4.

- Bamforth, S.D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B., and Risau, W. (1999). A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J. Cell Sci.* *112*, 1879–1888.
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* *307*, 1621–1625.
- Baud, V., Liu, Z.-G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M. (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* *13*, 1297–1308.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H.C. (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 402593.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* *192*, 907–917.
- Bellam, N., and Pasche, B. (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat. Res.* *155*, 85–103.
- Benson, J.R., and Jatoi, I. (2012). The global breast cancer burden. *Future Oncol. Lond. Engl.* *8*, 697–702.
- Berne, B.J., and Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* (Courier Dover Publications).
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* *430*, 257–263.
- Bièche, I., Tomasetto, C., Régnier, C.H., Moog-Lutz, C., Rio, M.C., and Lidereau, R. (1996). Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* *56*, 3886–3890.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006a). TGF- β and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 29–40.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006b). Tumour microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 506–520.
- Bindels, S., Mestdagt, M., Vandewalle, C., Jacobs, N., Volders, L., Noël, A., Roy, F. van, Berx, G., Foidart, J.-M., and Gilles, C. (2006). Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* *25*, 4975–4985.
- Biswas, S., Guix, M., Rinehart, C., Dugger, T.C., Chytil, A., Moses, H.L., Freeman, M.L., and Arteaga, C.L. (2007). Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J. Clin. Invest.* *117*, 1305–1313.
- Blaise, S., Kneib, M., Rousseau, A., Gambino, F., Chenard, M.-P., Messadeq, N., Muckenstrum, M., Alpy, F., Tomasetto, C., Humeau, Y., et al. (2012). In vivo evidence that TRAF4 is required for central nervous system myelin homeostasis. *PloS One* *7*, e30917.
- Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R.W., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y.C., and Ng, D.C.H. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 463–475.
- Boraschi, D., and Tagliabue, A. (2006). The interleukin-1 receptor family. *Vitam. Horm.* *74*, 229–254.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.-O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., et al. (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.* *6*, 97–105.

- Bradley, J.R., and Pober, J.S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482–6491.
- Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51–59.
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E.A., and Hopkins, A.M. (2010). Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 460607.
- Brysse, A., Mestdagt, M., Polette, M., Luczka, E., Hunziker, W., Noël, A., Birembaut, P., Foidart, J.-M., and Gilles, C. (2012). Regulation of CXCL8/IL-8 expression by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 121–132.
- Buache, E., Etique, N., Alpy, F., Stoll, I., Muckensturm, M., Reina-San-Martin, B., Chenard, M.P., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2011). Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* 30, 3261–3273.
- Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., and Ramsay, R.G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis — A view from the periphery. *Exp. Cell Res.* 317, 2748–2758.

-C-

- Camilleri-Broët, S., Cremer, I., Marmey, B., Comperat, E., Viguié, F., Audouin, J., Rio, M.-C., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Régnier, C.H. (2007). TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* 26, 142–147.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443–446.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3666–3670.
- Cha, G.-H., Cho, K.S., Lee, J.H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S.B., and Chung, J. (2003). Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7982–7991.
- Chacon-Heszele, M.F., Ren, D., Reynolds, A.B., Chi, F., and Chen, P. Regulation of cochlear convergent extension by the vertebrate planar cell polarity pathway is dependent on p120-catenin.
- Chasapis, C., and Spyroulias, G. (2009). RING Finger E3 Ubiquitin Ligases: Structure and Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3716–3731.
- Chen, J., and Zhang, M. (2013). The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp. Cell Res.* 319, 1357–1364.
- Chen, Y.T., Stewart, D.B., and Nelson, W.J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 144, 687–699.
- Cheng, G., Cleary, A.M., Ye, Z.S., Hong, D.I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995). Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* 267, 1494–1498.
- Cherfils-Vicini, J., Vingert, B., Varin, A., Tartour, E., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Régnier, C.H., and Cremer, I. (2008). Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice. *Immunology* 124, 562–574.
- Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., et al. (1998). The FERM domain: a unique module

involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* 23, 281–282.

Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., and Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* 115, 679–688.

Cohen, P., and Tcherpakov, M. (2010). Will the Ubiquitin System Furnish as Many Drug Targets as Protein Kinases? *Cell* 143, 686–693.

Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L., and Bodmer, W.F. (1992). Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340, 626–630.

Croft, M., Benedict, C.A., and Ware, C.F. (2013). Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 147–168.

Cummins, P.M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol. Cell. Biol.* 32, 242–250.

-D-

Dadgostar, H., and Cheng, G. (2000). Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation. *J. Biol. Chem.* 275, 2539–2544.

Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X.-Y., Xi, J., and Cheung, P.C.F. (2012). TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life* 64, 825–834.

David, D., Nair, S.A., and Pillai, M.R. (2013). Smurf E3 ubiquitin ligases at the cross roads of oncogenesis and tumor suppression. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 119–128.

Degot, S., Hir, H.L., Alpy, F., Kedinger, V., Stoll, I., Wendling, C., Seraphin, B., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2004). Association of the Breast Cancer Protein MLN51 with the Exon Junction Complex via Its Speckle Localizer and RNA Binding Module. *J. Biol. Chem.* 279, 33702–33715.

Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002543.

Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193–209.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425, 577–584.

Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399–434.

Devin, A., Lin, Y., and Liu, Z. (2003). The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep.* 4, 623–627.

Djiane, A., Riou, J., Umbhauer, M., Boucaut, J., and Shi, D. (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3091–3100.

Dobrosotskaya, I., Guy, R.K., and James, G.L. (1997). MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272, 31589–31597.

Dowler, S., Kular, G., and Alessi, D.R. (2002). Protein Lipid Overlay Assay. *Sci. Signal.* 2002, pl6.

-E-

- Elsum, I., Yates, L., Humbert, P.O., and Richardson, H.E. (2012). The Scribble-Dlg-Lgl polarity module in development and cancer: from flies to man. *Essays Biochem.* 53, 141–168.
- Eluredge, D.H., and Miller, J.D. (1971). Physiology of Hearing. *Annu. Rev. Physiol.* 33, 281–308.
- Ersoy-Evans, S., Erkin, G., Fassihi, H., Chan, I., Paller, A.S., Sürücü, S., and McGrath, J.A. (2006). Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 157–161.
- Ezan, J., and Montcouquiol, M. (2013). Revisiting planar cell polarity in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.*

-F-

- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional Complexes in Various Epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412.
- Feldman, G.J., Mullin, J.M., and Ryan, M.P. (2005). Occludin: Structure, function and regulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 883–917.
- Fogg, V.C., Liu, C.-J., and Margolis, B. (2005). Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J. Cell Sci.* 118, 2859–2869.
- Forster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* 130, 55–70.
- Franke, W.W. (2009). Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003061.
- Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M., and Sporn, M.B. (1983). Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3676–3680.
- Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002907.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143, 391–401.

-G-

- Gao, L., and Macara, I.G. (2004). Isoforms of the polarity protein par6 have distinct functions. *J. Biol. Chem.* 279, 41557–41562.
- Gao, L., Joberty, G., and Macara, I.G. (2002). Assembly of Epithelial Tight Junctions Is Negatively Regulated by Par6. *Curr. Biol.* 12, 221–225.
- Garabedian, M.J., and Logan, S.K. (2008). Atypical regulation of SRC-3. *Trends Biochem. Sci.* 33, 301–304.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Mol. Cell* 7, 249–262.
- Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 572–587.

- Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., and Mostov, K. (2006). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* *8*, 963–970.
- Gatza, C.E., Oh, S.Y., and Blobel, G.C. (2010). Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell. Signal.* *22*, 1163–1174.
- Gibson, S.B., Oyer, R., Spalding, A.C., Anderson, S.M., and Johnson, G.L. (2000). Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 205–212.
- Giepmans, B.N.G. (2006). Role of Connexin43-Interacting Proteins at Gap Junctions. In *Advances in Cardiology*, S. Dhein, ed. (Basel: KARGER), pp. 41–56.
- Glauner, H., Siegmund, D., Motejaded, H., Scheurich, P., Henkler, F., Janssen, O., and Wajant, H. (2002). Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4). *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 4819–4829.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* *11*, 315–324.
- Grech, A., Quinn, R., Srinivasan, D., Badoux, X., and Brink, R. (2000). Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol. Immunol.* *37*, 721–734.
- Grewal, I.S. (2009). Overview of TNF superfamily: a chest full of potential therapeutic targets. *Adv. Exp. Med. Biol.* *647*, 1–7.
- Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., and Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 601–613.
- Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol. Rev.* *93*, 525–569.

-H-

- Ha, H., Han, D., and Choi, Y. (2009). TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan *Chapter 11*, Unit 11.9D.
- Habelhah, H., Takahashi, S., Cho, S.-G., Kadoya, T., Watanabe, T., and Ronai, Z. (2004). Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J.* *23*, 322–332.
- Hagel, L. (2011). Gel filtration: size exclusion chromatography. *Methods Biochem. Anal.* *54*, 51–91.
- Halet, G. (2005). Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *97*, 501–518.
- Harris, T.J.C., and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* *170*, 813–823.
- Harris, T.J.C., and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 502–514.
- Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* *12*, 186–197.
- Haynes, P.A., Fripp, N., and Aebersold, R. (1998). Identification of gel-separated proteins by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: comparison of methods and their limitations. *Electrophoresis* *19*, 939–945.

He, L., Grammer, A.C., Wu, X., and Lipsky, P.E. (2004). TRAF3 forms heterotrimers with TRAF2 and modulates its ability to mediate NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 279, 55855–55865.

Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett.* 586, 1860–1870.

Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P., and Rodriguez, M.S. (2009). Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep.* 10, 1250–1258.

Hocevar, B.A., Brown, T.L., Howe, P.H., 1999. TGF- β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.* 18, 1345–1356.

Hoover, K.B., Liao, S.Y., and Bryant, P.J. (1998). Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am. J. Pathol.* 153, 1767–1773.

Horbelt, D., Denkis, A., and Knaus, P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 469–474.

Hu, H.M., O'Rourke, K., Boguski, M.S., and Dixit, V.M. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* 269, 30069–30072.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638–641.

Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.

Hunter, A.W., Barker, R.J., Zhu, C., and Gourdie, R.G. (2005). Zonula Occludens-1 Alters Connexin43 Gap Junction Size and Organization by Influencing Channel Accretion. *Mol. Biol. Cell* 16, 5686–5698.

-I-

Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 846–859.

Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* 116, 1959–1967.

Imamura, T., Hikita, A., and Inoue, Y. (2012). The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 19, 118–124.

Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 837–845.

Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000). Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) Family: Adapter Proteins That Mediate Cytokine Signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 14–24.

Inoue, J., Gohda, J., and Akiyama, T. (2007). Characteristics and biological functions of TRAF6. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 72–79.

Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., et al. (1996a). Identification of TRAF6, a Novel Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Protein That Mediates Signaling from an Amino-terminal Domain of the CD40 Cytoplasmic Region. *J. Biol. Chem.* 271, 28745–28748.

Ishida, T.K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996b). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 9437–9442.

Itoh, S., and ten Dijke, P. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 176–184.

Iuchi, S. (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *58*, 625–635.

Iwai, K., and Tokunaga, F. (2009). Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.* *10*, 706–713.

-J-

Jaramillo, B.E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* *297*, 247–258.

Jeffries, T.R., Dove, S.K., Michell, R.H., and Parker, P.J. (2004). PtdIns-specific MPR Pathway Association of a Novel WD40 Repeat Protein, WIPI49. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2652–2663.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 69–90.

Jiang, X., and Chen, Z.J. (2012). The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 35–48.

Jin, C., Yang, Y., Anver, M.R., Morris, N., Wang, X., and Zhang, Y.E. (2009). Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. *Cancer Res.* *69*, 735–740.

-K-

Kalkan, T., Iwasaki, Y., Park, C.Y., and Thomsen, G.H. (2009a). Tumor Necrosis Factor-Receptor-associated Factor-4 Is a Positive Regulator of Transforming Growth Factor- β Signaling That Affects Neural Crest Formation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3436–3450.

Kalkan, T., Iwasaki, Y., Park, C.Y., and Thomsen, G.H. (2009b). Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor-beta signaling that affects neural crest formation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3436–3450.

Kallay, L.M., McNickle, A., Brennwald, P.J., Hubbard, A.L., and Braiterman, L.T. (2006). Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *J. Cell. Biochem.* *99*, 647–664.

Karin, M., 1995. The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* *270*, 16483–16486.

Karin, M., and Gallagher, E. (2009). TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol. Rev.* *228*, 225–240.

Kawai, T., and Akira, S. (2004). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res. Ther.* *7*, 12.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.

Kedinger, V., Alpy, F., Tomasetto, C., Thisse, C., Thisse, B., and Rio, M.-C. (2005). Spatial and temporal distribution of the *traf4* genes during zebrafish development. *Gene Expr. Patterns* *GEP* *5*, 545–552.

- Kédinger, V., Alpy, F., Baguet, A., Polette, M., Stoll, I., Chenard, M.-P., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2008). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *PloS One* *3*, e3518.
- Kemphues, K. (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell* *101*, 345–348.
- Kim, W., Kim, M., and Jho, E. (2013). Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* *450*, 9–21.
- Kimura, Y., and Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J. Biochem. (Tokyo)* *147*, 793–798.
- Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. (2001). Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* *20*, 1271–1280.
- Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 614–625.
- Kolb, W.P., and Granger, G.A. (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *61*, 1250–1255.
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2012). TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* *10*, 183.
- Kutateladze, T.G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 507–513.

-L

- Lamothe, B., Campos, A.D., Webster, W.K., Gopinathan, A., Hur, L., and Darnay, B.G. (2008). The RING domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, lipopolysaccharide, and RANKL. *J. Biol. Chem.* *283*, 24871–24880.
- Landström, M. (2010). The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 585–589.
- Latorre, I.J., Frese, K.K., and Javier, R.T. (2006). Tight Junction Proteins and Cancer. In *Tight Junctions*, (Springer US), pp. 116–134.
- Lee, S.Y., and Choi, Y. (2007). TRAF1 and its biological functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* *597*, 25–31.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 99–111.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2006). Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 41–58.
- Li, C., Ni, C.-Z., Havert, M.L., Cabezas, E., He, J., Kaiser, D., Reed, J.C., Satterthwait, A.C., Cheng, G., and Ely, K.R. (2002). Downstream Regulator TANK Binds to the CD40 Recognition Site on TRAF3. *Structure* *10*, 403–411.
- Li, S., Lu, K., Wang, J., An, L., Yang, G., Chen, H., Cui, Y., Yin, X., Xie, P., Xing, G., et al. (2010). Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biochem.* *338*, 11–17.
- Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D.V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3792–3797.
- Liu, H., Su, Y.C., Becker, E., Treisman, J., and Skolnik, E.Y. (1999). A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr. Biol. CB* *9*, 101–104.

- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- Lopitz-Otsoa, F., Rodriguez-Suarez, E., Aillet, F., Casado-Vela, J., Lang, V., Matthiesen, R., Elortza, F., and Rodriguez, M.S. (2012). Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). *J. Proteomics* 75, 2998–3014.
- Lu, K., Li, P., Zhang, M., Xing, G., Li, X., Zhou, W., Bartlam, M., Zhang, L., Rao, Z., and He, F. (2011). Pivotal Role of the C2 Domain of the Smurf1 Ubiquitin Ligase in Substrate Selection. *J. Biol. Chem.* 286, 16861–16870.

-M-

- Macara, I.G. (2004). Parsing the Polarity Code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 220–231.
- Makarova, O., Roh, M.H., Liu, C.-J., Laurinec, S., and Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302, 21–29.
- Mali, B., and Frank, U. (2004). Hydroid TNF-receptor-associated factor (TRAF) and its splice variant: a role in development. *Mol. Immunol.* 41, 377–384.
- Mandel, I., Paperna, T., Volkowich, A., Merhav, M., Glass-Marmor, L., and Miller, A. (2012). The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. *J. Cell. Biochem.* 113, 2415–2423.
- Margolis, B., and Borg, J.-P. (2005). Apicobasal polarity complexes. *J. Cell Sci.* 118, 5157–5159.
- Marinis, J.M., Homer, C.R., McDonald, C., and Abbott, D.W. (2011). A novel motif in the Crohn's disease susceptibility protein, NOD2, allows TRAF4 to down-regulate innate immune responses. *J. Biol. Chem.* 286, 1938–1950.
- Marinis, J.M., Hutti, J.E., Homer, C.R., Cobb, B.A., Cantley, L.C., McDonald, C., and Abbott, D.W. (2012). I κ B kinase α phosphorylation of TRAF4 downregulates innate immune signaling. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2479–2489.
- Martin, T.A., and Jiang, W.G. (2001). Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol. Histopathol.* 16, 1183–1195.
- Martin, T.A., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2011). Tight junctions in cancer metastasis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 16, 898–936.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., and Mostov, K. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128, 383–397.
- Masson, R., Régnier, C.H., Chenard, M.P., Wendling, C., Mattei, M.G., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (1998). Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) expression pattern during mouse development. *Mech. Dev.* 71, 187–191.
- Mathew, S.J., Rembold, M., and Leptin, M. (2011). Role for Traf4 in polarizing adherens junctions as a prerequisite for efficient cell shape changes. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4978–4993.
- Matsuuchi, L., and Naus, C.C. (2013). Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 94–108.
- May-Simera, H., and Kelley, M.W. (2012). Planar cell polarity in the inner ear. *Curr. Top. Dev. Biol.* 101, 111–140.
- McCaffrey, L.M., Montalbano, J., Mihai, C., and Macara, I.G. (2012). Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell* 22, 601–614.

- McNeill, H. (2009). Planar cell polarity and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 2104–2111.
- Medina, A., Reintsch, W., and Steinbeisser, H. (2000). *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 92, 227–237.
- Médina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L., and Le Bivic, A. (2002). Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 94, 305–313.
- Métais, J.-Y., Navarro, C., Santoni, M.-J., Audebert, S., and Borg, J.-P. (2005). hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett.* 579, 3725–3730.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell Sci.* 118, 4049–4057.
- Montcouquiol, M., Rachel, R.A., Lanford, P.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Kelley, M.W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423, 173–177.
- Monteiro, A.C., and Parkos, C.A. (2012). Intracellular mediators of JAM-A-dependent epithelial barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 115–124.
- Moon, R.T., Campbell, R.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Shih, J., and Fraser, S. (1993). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Camb. Engl.* 119, 97–111.
- Mosesson, Y., Mills, G.B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850.
- Mosialos, G., Birkenbacht, M., Yalamanchill, R., Van Arsdale, T., Ware, C., and Kleff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389–399.
- Müller, S.L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepsbergenov, D.I., Huber, O., Blasig, I.E., and Krause, G. (2005). The Tight Junction Protein Occludin and the Adherens Junction Protein α -Catenin Share a Common Interaction Mechanism with ZO-1. *J. Biol. Chem.* 280, 3747–3756.
- Muraoka, R.S., Koh, Y., Roebuck, L.R., Sanders, M.E., Brantley-Sieders, D., Gorska, A.E., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2003). Increased Malignancy of Neu-Induced Mammary Tumors Overexpressing Active Transforming Growth Factor β 1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8691–8703.
- Müsch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W.J., Rodriguez-Boulan, E., and Brennwald, P.J. (2002). Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 158–168.

-N-

- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C.F., Yagita, H., and Okumura, K. (1996). TRAF5, an Activator of NF- κ B and Putative Signal Transducer for the Lymphotoxin- β Receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 14661–14664.
- Narimatsu, M., Bose, R., Pye, M., Zhang, L., Miller, B., Ching, P., Sakuma, R., Luga, V., Roncari, L., Attisano, L., et al. (2009). Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases. *Cell* 137, 295–307.

Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.-J., Arsanto, J.-P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330–4339.

Nie, J., Xie, P., Liu, L., Xing, G., Chang, Z., Yin, Y., Tian, C., He, F., and Zhang, L. (2010). Smad Ubiquitylation Regulatory Factor 1/2 (Smurf1/2) Promotes p53 Degradation by Stabilizing the E3 Ligase MDM2. *J. Biol. Chem.* 285, 22818–22830.

Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2525–2532.

Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell* 2, 389–395.

-O-

O'Malley, W.E., Achinstein, B., and Shear, M.J. (1988). *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 29, 1962: Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *Nutr. Rev.* 46, 389–391.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708.

Oft, M., Heider, K.-H., and Beug, H. (1998). TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* 8, 1243–1252.

Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., and Kemler, R. (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 8), 1237–1245.

Ozören, N., and El-Deiry, W.S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia New York* 4, 551–557.

-P-

Patrie, K.M., Drescher, A.J., Welihinda, A., Mundel, P., and Margolis, B. (2002). Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J. Biol. Chem.* 277, 30183–30190.

Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724–729.

Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 49–62.

Petratos, S., Ozturk, E., Azari, M.F., Kenny, R., Lee, J.Y., Magee, K.A., Harvey, A.R., McDonald, C., Taghian, K., Moussa, L., et al. (2012). Limiting multiple sclerosis related axonopathy by blocking Nogo receptor and CRMP-2 phosphorylation. *Brain* 135, 1794–1818.

Pierce, D.F., Gorska, A.E., Chytil, A., Meise, K.S., Page, D.L., Coffey, R.J., and Moses, H.L. (1995). Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4254–4258.

Pierce, D.F., Johnson, M.D., Matsui, Y., Robinson, S.D., Gold, L.I., Purchio, A.F., Daniel, C.W., Hogan, B.L., Moses, H.L., 1993. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF-beta 1. *Genes Dev.* 7, 2308–2317.

Pineda, G., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2007). Ubiquitination and TRAF signaling. In *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*, H. Wu, ed. (Springer New York), pp. 80–92.

Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J.-M., Birembaut, P., and Gilles, C. (2007). Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs* *185*, 61–65.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods San Diego Calif* *24*, 218–229.

Pullen, S.S., Miller, H.G., Everdeen, D.S., Dang, T.T., Crute, J.J., and Kehry, M.R. (1998). CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 11836–11845.

-Q-

Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., and Macara, I.G. (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J. Cell Biol.* *171*, 1061–1071.

Quan, C., and Lu, S.-J. (2003). Identification of genes preferentially expressed in mammary epithelial cells of Copenhagen rat using subtractive hybridization and microarrays. *Carcinogenesis* *24*, 1593–1599.

-R-

Razin, S.V., Borunova, V.V., Maksimenko, O.G., and Kantidze, O.L. (2012). Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochem. Biokhimiia* *77*, 217–226.

Régnier, C.H., Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Chenard, M.P., Wendling, C., Basset, P., and Rio, M.C. (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* *270*, 25715–25721.

Régnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z., and Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* *90*, 373–383.

Régnier, C.H., Masson, R., Kedinger, V., Textoris, J., Stoll, I., Chenard, M.-P., Dierich, A., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2002). Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5585–5590.

Rendon, J.L., and Choudhry, M.A. (2012). Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 529–538.

Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., and Chinnaiyan, A.M. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9309–9314.

Richardson, G.P., de Monvel, J.B., and Petit, C. (2011). How the Genetics of Deafness Illuminates Auditory Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* *73*, 311–334.

Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* *157*, 161–172.

- Rosenhouse-Dantsker, A., and Logothetis, D.E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 455, 45–53.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681–692.
- Rousseau, A., Rio, M.-C., and Alpy, F. (2011). TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer. *Cancers* 3, 2734–2749.

-S-

- Sahai, E., Garcia-Medina, R., Pouyssegur, J., and Vial, E. (2007). Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J. Cell Biol.* 176, 35–42.
- Santoni, M.-J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., and Borg, J.-P. (2002). The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet. TIG* 18, 494–497.
- Sato, T., Irie, S., and Reed, J.C. (1995). A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett.* 358, 113–118.
- Savagner, P. (2010). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 21 Suppl 7*, vii89–92.
- Schütze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 655–662.
- Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R.M., and Wajant, H. (1999). The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 19368–19374.
- Scott, C.A., and Kelsell, D.P. (2011). Key functions for gap junctions in skin and hearing. *Biochem. J.* 438, 245–254.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., et al. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495–1499.
- Severson, E.A., and Parkos, C.A. (2009). Mechanisms of Outside-in Signaling at the Tight Junction by Junctional Adhesion Molecule A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 10–18.
- Shen, B., Liu, H., Skolnik, E.Y., and Manley, J.L. (2001). Physical and functional interactions between *Drosophila* TRAF2 and Pelle kinase contribute to Dorsal activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8596–8601.
- Shewan, A., Eastburn, D.J., and Mostov, K. (2011). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004796.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Shi, C.S., Leonardi, A., Kyriakis, J., Siebenlist, U., and Kehrl, J.H. (1999). TNF-mediated activation of the stress-activated protein kinase pathway: TNF receptor-associated factor 2 recruits and activates germinal center kinase related. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 3279–3285.
- Shiels, H., Li, X., Schumacker, P.T., Maltepe, E., Padrid, P.A., Sperling, A., Thompson, C.B., and Lindsten, T. (2000). TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am. J. Pathol.* 157, 679–688.

- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–235.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 769–796.
- Skoglund, P., and Keller, R. (2010). Integration of planar cell polarity and ECM signaling in elongation of the vertebrate body plan. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 589–596.
- Smrcka, A.V., Brown, J.H., and Holz, G.G. (2012). Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell. Signal.* 24, 1333–1343.
- Sokol, S.Y. (1996). Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Curr. Biol. CB* 6, 1456–1467.
- Soler, A.P., Miller, R.D., Laughlin, K.V., Carp, N.Z., Klurfeld, D.M., and Mullin, J.M. (1999). Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 20, 1425–1431.
- Song, H.Y., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6721–6725.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., Landström, M., 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1199–1207.
- Sotelo, N.S., Valiente, M., Gil, A., and Pulido, R. (2012). A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains. *J. Cell. Biochem.* 113, 2661–2670.
- St Johnston, D., and Sanson, B. (2011). Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 540–546.
- Staehelin, L.A. (1974). Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39, 191–283.
- Straight, S.W., Shin, K., Fogg, V.C., Fan, S., Liu, C.-J., Roh, M., and Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol. Biol. Cell* 15, 1981–1990.
- Striegel, A.M., and Brewer, A.K. (2012). Hydrodynamic chromatography. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 5, 15–34.
- Sun, S.-C., and Ley, S.C. (2008). New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* 29, 469–478.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., and Ohno, S. (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* 152, 1183–1196.

-T-

- Tada, M., and Heisenberg, C.-P. (2012). Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Development* 139, 3897–3904.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 603–615.

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). Anatomy of traf2 distinct domains for nuclear factor- κ b activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 19935–19942.
- Tartaglia, L.A., Rothe, M., Hu, Y.-F., and Goeddel, D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213–216.
- Tepass, U. (2012). The Apical Polarity Protein Network in *Drosophila* Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 655–685.
- Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787–799.
- Van Tintelen, J.P., and Hauer, R.N.W. (2009). Cardiomyopathies: New test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 450–451.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222–228.
- Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M.G., Chenard, M.P., Lidereau, R., Basset, P., and Rio, M.C. (1995). Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* 28, 367–376.
- Torres-Arzuayus, M.I., de Mora, J.F., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R., and Brown, M. (2004). High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* 6, 263–274.
- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y.-C., Stelzhammer, W., Krizbai, I.A., Fresser, F., Bauer, H.-C., and Bauer, H. (2002). The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch. *J. Biol. Chem.* 277, 10201–10208.
- Tseng, P.-H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A.A., and Karin, M. (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 11, 70–75.
- Tsybin, Y.O., Fornelli, L., Kozhinov, A.N., Vorobyev, A., and Miladinovic, S.M. (2011). High-resolution and tandem mass spectrometry--the indispensable tools of the XXI century. *Chimia (Aarau)* 65, 641–645.

-U-

- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 279, 44785–44794.
- Ungar, A.R., Kelly, G.M., and Moon, R.T. (1995). Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* 52, 153–164.

-V-

- Vermeer, P.D., Einwalter, L.A., Moninger, T.O., Rokhlina, T., Kern, J.A., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422, 322–326.

Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campi, A., and De Matteis, M.A. (2008). Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2833–2841.

-W-

Waite, J.C., and Skokos, D. (2011). Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *Int. J. Inflamm.* 2012.

Wajant, H., Henkler, F., and Scheurich, P. (2001). The TNF-receptor-associated factor family: Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell. Signal.* 13, 389–400.

Wallingford, J.B., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell* 2, 695–706.

Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134, 647–658.

Wang, J., Mark, S., Zhang, X., Qian, D., Yoo, S.-J., Radde-Gallwitz, K., Zhang, Y., Lin, X., Collazo, A., Wynshaw-Boris, A., et al. (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat. Genet.* 37, 980–985.

Wang, J., Hamblet, N.S., Mark, S., Dickinson, M.E., Brinkman, B.C., Segil, N., Fraser, S.E., Chen, P., Wallingford, J.B., and Wynshaw-Boris, A. (2006). Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1767–1778.

Wang, Q., Chen, X.-W., and Margolis, B. (2007). PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 874–885.

Wang, X., Jin, C., Tang, Y., Tang, L.-Y., and Zhang, Y.E. (2013). Ubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 4 (TRAF4) by Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1 (Smurf1) Regulates Motility of Breast Epithelial and Cancer Cells. *J. Biol. Chem.*

Wang, Y., Zhang, P., Liu, Y., and Cheng, G. (2010). TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses. *Sci. China Life Sci.* 53, 159–168.

Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.-R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., and Forman-Kay, J.D. (2007). Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell* 130, 651–662.

Williamson, B.D., Carswell, E.A., Rubin, B.Y., Prendergast, J.S., and Old, L.J. (1983). Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5397–5401.

Wong, V., and Gumbiner, B.M. (1997). A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J. Cell Biol.* 136, 399–409.

Woolner, S. (2007). Morphogenesis: Joining the Dots to Shape an Embryo. *Curr. Biol.* 17, R289–R291.

Woolner, S., and Martin, P. (2006). Embryo Morphogenesis and the Role of the Actin Cytoskeleton. In *Advances in Molecular and Cell Biology*, E. Edward Bittar and Seema Khurana, ed. (Elsevier), pp. 251–283.

Wu, H. (2004). Assembly of Post-Receptor Signaling Complexes for the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. In *Advances in Protein Chemistry*, K. Christopher Garcia, ed. (Academic Press), pp. 225–279.

Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.-N., Huang, S., and Zhang, M. (2007). PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol. Cell* 28, 886–898.

-X-

Xia, X., Mariner, D.J., and Reynolds, A.B. (2003). Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 9195–9204.

Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2001). NF- κ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- κ B2 p100. *Mol. Cell* 7, 401–409.

Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat. Cell Biol.* 15, 189–200.

-Y-

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol. CB* 13, 734–743.

Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nat. Immunol.* 2, 620–624.

Yang, Q., Chen, S.-P., Zhang, X.-P., Wang, H., Zhu, C., and Lin, H.-Y. (2009). Smurf2 participates in human trophoblast cell invasion by inhibiting TGF- β type I receptor. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 57, 605–612.

Yang, Y., Liu, Y., Wei, P., Peng, H., Winger, R., Hussain, R.Z., Ben, L.-H., Cravens, P.D., Gocke, A.R., Puttapparthi, K., et al. (2010). Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease. *Ann. Neurol.* 67, 498–507.

Yates, L.L., Schnatwinkel, C., Murdoch, J.N., Bogani, D., Formstone, C.J., Townsend, S., Greenfield, A., Niswander, L.A., and Dean, C.H. (2010). The PCP genes *Celsr1* and *Vangl2* are required for normal lung branching morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2251–2267.

Ybot-Gonzalez, P., Savery, D., Gerrelli, D., Signore, M., Mitchell, C.E., Faux, C.H., Greene, N.D.E., and Copp, A.J. (2007). Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development* 134, 789–799.

Ye, H., and Wu, H. (2000). Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8961–8966.

Ye, H., Arron, J.R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N.K., Segal, D., Dzivenu, O.K., Vologodskaya, M., Yim, M., et al. (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418, 443–447.

Yi, P., Xia, W., Wu, R.-C., Lonard, D.M., Hung, M.-C., and O'Malley, B.W. (2013). SRC-3 coactivator regulates cell resistance to cytotoxic stress via TRAF4-mediated p53 destabilization. *Genes Dev.* 27, 274–287.

Yin, C., Ciruna, B., and Solnica-Krezel, L. (2009). Convergence and extension movements during vertebrate gastrulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 89, 163–192.

Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 1), 127–142.

Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J.H., and Kyriakis, J.M. (1998). Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.* 273, 22681–22692.

-Z-

Zapata, J.M., Martínez-García, V., and Lefebvre, S. (2007). Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 1–24.

Zepp, J.A., Liu, C., Qian, W., Wu, L., Gulen, M.F., Kang, Z., and Li, X. (2012). Cutting edge: TNF receptor-associated factor 4 restricts IL-17-mediated pathology and signaling processes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 33–37.

Zotti, T., Vito, P., and Stilo, R. (2012). The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J. Cell. Physiol.* 227, 1280–1284.

ANNEXE-1

In Vivo Evidence That TRAF4 Is Required for Central Nervous System Myelin Homeostasis

Sébastien Blaise^{1‡a}, Marie Kneib², Adrien Rousseau¹, Frederic Gambino², Marie-Pierre Chenard³, Nadia Messadeq¹, Martine Muckenstrum³, Fabien Alpy¹, Catherine Tomassetto¹, Yann Humeau^{2‡b}, Marie-Christine Rio^{1*}

1 Functional Genomics and Cancer Department, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Illkirch, France, **2** Centre National de la Recherche Scientifique UPR3212, Strasbourg, France, **3** Département de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Haute-pierre, Strasbourg, France

Abstract

Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs) are major signal transducers for the TNF and interleukin-1/Toll-like receptor superfamilies. However, TRAF4 does not fit the paradigm of TRAF function in immune and inflammatory responses. Its physiological and molecular functions remain poorly understood. Behavioral analyses show that TRAF4-deficient mice (TRAF4-KO) exhibit altered locomotion coordination typical of ataxia. TRAF4-KO central nervous system (CNS) ultrastructure shows strong myelin perturbation including disorganized layers and disturbances in paranode organization. TRAF4 was previously reported to be expressed by CNS neurons. Using primary cell culture, we now show that TRAF4 is also expressed by oligodendrocytes, at all stages of their differentiation. Moreover, histology and electron microscopy show degeneration of a high number of Purkinje cells in TRAF4-KO mice, that was confirmed by increased expression of the Bax pro-apoptotic marker (immunofluorescence), TUNEL analysis, and caspase-3 activation and PARP1 cleavage (western blotting). Consistent with this phenotype, MAG and NogoA, two myelin-induced neurite outgrowth inhibitors, and their neuron partners, NgR and p75NTR were overexpressed (Q-RT-PCR and western blotting). The strong increased phosphorylation of Rock2, a RhoA downstream target, indicated that the NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway, known to induce actin cytoskeleton rearrangement that favors axon regeneration inhibition and neuron apoptosis, is activated in the absence of TRAF4 (western blotting). Altogether, these results provide conclusive evidence for the pivotal contribution of TRAF4 to myelination and to cerebellar homeostasis, and link the loss of TRAF4 function to demyelinating or neurodegenerative diseases.

Citation: Blaise S, Kneib M, Rousseau A, Gambino F, Chenard M-P, et al. (2012) In Vivo Evidence That TRAF4 Is Required for Central Nervous System Myelin Homeostasis. PLoS ONE 7(2): e30917. doi:10.1371/journal.pone.0030917

Editor: Noriyuki Nishida, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan

Received: September 27, 2011; **Accepted:** December 29, 2011; **Published:** February 17, 2012

Copyright: © 2012 Blaise 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 work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, l'Agence Nationale pour la Recherche, the Hôpital Universitaire de Strasbourg, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Française contre le Cancer (Equipe labellisée LIGUE 2010) and the Comités du Haut-Rhin et du Bas-Rhin, the Institut National du Cancer, Fond National pour la Santé ACI 2007 Cancéropôle Grand-Est. SB was recipient of an Institut National du Cancer fellowship. 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.

* E-mail: rio@igbmc.fr

‡a Current address: Centre National de la Recherche Scientifique UMR6237, Université de Champagne Ardenne, Reims, France

‡b Current address: Centre National de la Recherche Scientifique UMR5091, Bordeaux, France

Introduction

Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factors (TRAFs), originally described by Goeddel and colleagues [1], constitute a family of adapter proteins containing 7 members that has been found in mammals, as well as in other multicellular organisms such as *Drosophila* [2], *Caenorhabditis elegans* [3], and zebra fish [4]. Mammalian TRAFs have emerged as the major signal transducers for the TNF receptor, Toll-like receptor and interleukin receptor superfamilies. A wide range of biological functions, such as adaptive and innate immunity, embryonic development, stress response and bone metabolism, are mediated by TRAFs via the induction of cell survival, proliferation, differentiation and death (reviewed in [5] [6]).

We first identified TRAF4 in human breast tumors [7]. TRAF4 orthologues have been reported in the mouse, rat, fly, fish and

worm, suggesting that TRAF4 exerts important and conserved function(s). Although TRAF4 shares common protein features with other TRAFs, it does not behave like them. It is not involved in biological processes related to the immune system, as the other TRAF. We previously generated TRAF4-null mice (TRAF4-KO), and showed that TRAF4 deficiency in the mouse was lethal at embryonic stage in approximately one third of the homozygote mutants, mainly due to defects in neural tube closure [8]. Surviving animals manifest various alterations. All TRAF4-KO mice have a defect in the upper respiratory tract, with a striking reduction of the diameter of the tracheal lumen, leading to a wheezing sound [8,9]. Three to six of the upper tracheal rings below the cricoid cartilage are frontally interrupted and sometimes fused. The disorganization of the upper respiratory tract extends to the level of the stem bronchi below the tracheal bifurcation [8]. Other non-fully penetrant phenotypes including various malfor-

mations of the axial skeleton (ribs, sternum, tail), and mild spina bifida were also observed [8]. Recently, TRAF4 was confirmed to be an essential gene for neural crest development and neural folding in *Xenopus* [10]. Unlike other TRAF-deficient mice, TRAF4-KO mice exhibit normal immune response [11].

Our current knowledge of the physiological role of TRAF4 remains poor and its molecular function is largely unknown [12] [13] (reviewed in [14] [15]) [16]. TRAF4 has notably been shown to be involved in the subcellular localization of reactive oxygen species (ROS) products in endothelial cells via its binding to the p47phox protein [17], in the maintenance of epithelial cell polarity via a function at the tight junction (TJ) level [18], and in the migration of dendritic cells [11]. Moreover, TRAF4 has been shown to be overexpressed in numerous human carcinomas and an oncogenic role has been proposed for TRAF4 [7,19]. Interestingly, TRAF4 expression was observed in several regions of the CNS. Thus, during embryogenesis, a high level of expression is observed during the ontogenesis of the mouse [20] and Zebrafish [4] CNS. In *Drosophila*, DTRAF1 (fly TRAF4 orthologue) accumulates in mesodermal cells and neural precursors and is correlated with the onset of morphogenetic and cellular movements [21]. Strong TRAF4 expression is also observed in several regions of adult mouse CNS. In all cases, it has been reported to be expressed by neurons, and notably in the Purkinje cells of the cerebellum [20]. Collectively, all these data suggest that TRAF4 might exert a function related to the nervous system.

Here we show that TRAF4-KO mice exhibit altered coordination of locomotion, typical of ataxia. We find that, in addition to neurons, TRAF4 is also expressed in oligodendrocytes from early progenitors to mature myelinating cells. We demonstrate a dramatic alteration of the myelin ultrastructure and a degeneration of a high number of Purkinje cells in the absence of TRAF4. Molecular analyses indicate the activation of the NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway, triggered by overexpression of the MAG and NogoA myelin-induced neurite outgrowth inhibitors. Our findings show that TRAF4 is required for myelin integrity and Purkinje cell survival, and link the loss of TRAF4 function to brain diseases.

Materials and Methods

Ethics statement

All mice were housed in an animal facility licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement no. B67-218-5), and all animal experiments were supervised by MC. Rio (agreement no. 67-194 to MC. Rio, approved by the Direction des Services Vétérinaires, Strasbourg, France), in compliance with the European legislation on care and use of laboratory animals.

Animals and sample collection

Homozygous TRAF4-KO [8] or WT 129SvPas littermate pups were maintained under standard laboratory conditions. Mice were sacrificed by excess halothane except for electrophysiology analysis where animals were decapitated under isoflurane general anaesthesia. Tissues were immediately incubated in 4% paraformaldehyde (PFA) or frozen in liquid nitrogen.

Oligodendrocyte culture

Primary culture of mouse oligodendrocytes was carried out by differential adhesion as described previously [22]. Briefly, 3–4 day postnatal mouse cerebella were dissected and cleared of meninges. After mechanical dissociation in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) through a nylon sieve (82 micron), the suspension was maintained in DMEM supplemented with sodium bicarbonate (25 mM), insulin (0.5 μ M), gentamycin (0.05 mg/ml),

and 10% calf serum. Cells were plated in poly-D-lysine-coated culture flasks and incubated at 37°C in a water-saturated incubator equilibrated with 5% CO₂. Medium was changed every 3 days. After 10 days, oligodendrocyte progenitor cells (OPC) fixed on an astrocyte layer were obtained. OPC were detached mechanically by gentle buffer flow. The obtained OPC were then plated in 10 cm diameter plates (without poly-D-lysine coating) and incubated for 2 h at 37°C to eliminate contaminating cells. This step was repeated 3 times. Finally, OPC were plated in poly-D-lysine-coated culture flasks at 0.3 to 1 \times 10⁶ cells/plate (35 mm diameter). After a few hours, the cells were rinsed and exposed to a serum-free, chemically defined medium composed of DMEM supplemented with bovine transferrin (10 μ g/ml), progesterone (20 nM), bovine insulin (5 μ g/ml), putrescine (100 μ M), sodium selenite (30 nM), penicillin (50 UI/ml), D-glucose (5 g/l), T3 (0.1 μ M) and streptomycin (50 μ g/ml) to allow cell differentiation. The medium was completely renewed every 1 day. Cells were allowed to differentiate for 1, 2 and 4 days. OPC and differentiating cells were directly harvested for RNA extraction.

Western blotting

Proteins were extracted from tissues (4°C, RIPA buffer, Proteases inhibitor cocktail) (Sigma Chemicals, St Louis, MO). Twenty μ g of proteins were analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrotransfer in Tris-glycine buffer (48 mM Tris base, 39 mM glycine, 0.037% SDS and 20% ethanol; 100 mV, 60 min), membranes (PVDF, New England Nuclear, Boston, MA) were blocked (5% bovine serum albumin, Tris-buffered saline (TBS), 1 h). Blots were then probed (overnight, 4°C) with appropriate primary antibodies (listed in Table 1). After washing (TBS, 0.1% Tween 20), peroxidase-conjugated secondary antibody (40 mU/ml, Boehringer), luminol chemiluminescent substrate (Boehringer, Mannheim, Germany) and Kodak X-Omat films (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) were used.

Histopathological and immunofluorescence analyses

Four-micrometer sections of paraffin-embedded samples were stained with hematoxylin-eosin (HE), cresyl violet or Luxol fast blue. Cells were counted in six section areas delineated by an ocular grid of 1/400 mm² (\times 40 magnification). Tissue sections were counterstained by the 4,6-diamidino-2-phenylindole fluorescent dye (Dapi, 0.5 μ g/mL in PBS, Sigma). For immunofluorescence, tissue was first denatured by incubating CNS sections in 2 N HCl for 45 min at room temperature followed by 10 min neutralization in 0.1 M sodium borate at pH 8.5. Tissue was rinsed in PBS for 10 min and then in PBS containing 10% bovine serum for 1 h and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Table 1). Tissue was incubated for 1 h with the secondary antibody (IgG conjugated to AlexaFluor, 1/1000; Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) in PBS containing 10% bovine serum [23]. Immunofluorescence was analysed by confocal microscopy. TUNEL staining was performed using the Apoptag Apoptosis Detection Kit (Millipore Corp). Sections were counterstained with nuclear fast red.

Electron microscopy. The tissue samples were fixed (2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, overnight, 4°C), washed for 30 min in the same buffer and then post-fixed (1 h, 1% buffered osmium tetroxide) [24]. Samples were dehydrated with gradient concentrations of ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate before analysis (Morgagni 268D microscope). Our experiments included 6 WT and 6 TRAF4-KO mice. For each of them and for each tissue, 3 grids were done and at least 6 areas were observed for each grid (a total of more than 100 images).

Table 1. Antibodies used for immunofluorescence and western blotting.

Antibody	Immuno-fluorescence	Western blotting	Source	Suppliers
Bax	1/500	-	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Calbindin D 28K	1/1000	-	Mouse	Swant
Caspase-3 uncleaved	-	1/1000	Rabbit	Chemicon
Caspase-3 cleaved	-	1/1000	Rabbit	Sigma
Claudin-11	-	1/500	Rabbit	USBiological
MAG	-	1/1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
MBP	-	1/500	Mouse	USBiological
NogoA (H300)	-	1/1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
P75NTR	-	1/1000	Rabbit	Upstate
PARP	-	1/1000	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Rock 2	-	1/1000	Goat	Santa Cruz Biotechnology
P-Rock 2	-	1/500	Rabbit	Rockland
TRAF4	-	1/1000	Rabbit	IGBMC
Tubulin	-	1/2000	Mouse	Sigma

doi:10.1371/journal.pone.0030917.t001

RNA preparation and quantitative RT-PCR

RNA was extracted using Rneasy® Lipid Tissue (Qiagen S.A., France) and converted to cDNA with SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen™ lifetechnologies) and oligo dT24 primers. Quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) was performed using SYBR® Green JumpStart PCR kit (Sigma). 36B4, 18S, GAPDH mRNA were used as internal controls. RNA tested and primer sequences are listed on Table 2.

Behavioral analyses

Mice were weighed before use. For all tests, mice were given 3 trials separated by 10 min intertrial intervals. The mean of these consecutive trials was taken.

Negative geotaxis. [23]: reflexes were tested as previously described. Mice were positioned with the head facing down on an inclined plane with a 20% slope. The time needed for mice to turn completely and reach a position with the head facing up was measured. The duration of the test was limited to 120 sec.

Wooden Beam. [25]: mice were placed in the center of a rectangular wooden beam (length, 110 cm; width, 5.5 cm; thickness, 3.5 cm) divided into 11 segments and situated at 75 cm from floor. The number of crossed segments and fall latency (cut-off 60 sec) were recorded.

Wooden Edge. [25]: mice were placed at edge center (length, 90 cm; width, 1 cm), divided into 9 segments, at 75 cm from floor. The number of crossed segments and fall latency (cut-off 60 s) were recorded.

Rotarod. [26]: motor performance was evaluated using a rotarod apparatus (Bioseb, Chaville, France). Mice were placed on the rod (3 cm diameter) under constant acceleration (4 to 40 rpm at a rate of 0.1 rpm/sec). Fall latency was measured.

Locomotion/equilibrium test. [23]: this test comprises 3 phases: swimming in a round container (15 cm diameter, 23 cm height), climbing along a vertical metal rod (6 mm diameter, 20 cm) whose base was inside the water, and reaching a platform. The time necessary for the mice to reach the platform with all four paws after being put inside the water was recorded (cut-off 300 sec). The percentage of mice that succeeded in each group were given.

Grip test. [27]: the animal with its forelimbs holding onto a grip (Bioseb, Chaville, France) was slowly moved backwards until the grip was released. The dynamometer records the maximal strength developed.

Suspension test. [23]: mice were suspended by the forelimbs on a metal rod (1 mm diameter, 20 cm above the table). Fall latency was recorded.

Open field. [27]: mice were analyzed for 30 min in a square arena (44×44×17 cm). Motor activity (distance traveled and the time spent in movement) were automatically recorded (Panlab, Actitrack, Barcelona, Spain).

Touch test. [28]: mice were placed under plastic chambers (3×8×12 cm) on top of a wire mesh-top table and allowed to acclimate for 5 min. The number of withdrawals in response to

Table 2. Primers used for Q-RT-PCR.

mRNA	Sense probe (5'-3')	Antisense probe (5'-3')
18S	GGGAGCCTGAGAACGGC	GGGTCGGGAGTGGTAATTTT
36B4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
Caspr	CGCCATGACCTTCACTACCACTT	GCCATATCGATCCACCCGCACAT
CNPase	AGACAGCGTGGCGACTAGACT	GGGCTTCAGCTTCTCAGGT
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCTGTTGCTGTA
MAG	ACCATCTCAGCCTTCGAGGGCA	TGTCCAGGACGCTGTGCTCCGA
MBP	CCTGCCCCAGAAGTCGC	CTGGGATGGAGGTGGTGTTT
NF68	CCCCTCTGAAGGAGAAGCA	TCTTTTGTGTCTTCAGACTCATCC
NgR	AGAGGTTGTTGGCAACAGGTAG	ATCTTCTGCATGGCAACCGAAT
NogoA	CAGGTGATGTACGCTCTGGA	TGAGGGAAAGTAGGGATGTGC
Olig2	GCGGTGGCTCAAGTCATCTT	CGGGCTCAGTCATCTGCTTCT
OmgP	ACCTCAAGCTTATTTACTATGAAG	AGTGTTTCCATTTGCAAGTGGTT
PDGF-RaGACGTTCAAGACCAGCGAGTT		CAGTCTGGCGTGCCTCC
PLP	GCAAGGTTTGTGGCTCCAAC	CGCAGCAATAAACAGGTGGAA
P75NTR	GCGCCACCAGCCGCTCAAGC	CGTCAGAGCCCTCCGGGGCG
TRAF4	GCCTTTGTTCTCTGCCCTTT	TCCCATGGCAGCTTAGG

doi:10.1371/journal.pone.0030917.t002

non-noxious mechanical stimuli using calibrated von Frey monofilaments of increasing force (0.008 to 4 g) (Bioseb, Chaville, France) were recorded (six applications).

Hot plate test. [29]: mice were placed on a 52°C hot plate and the latency of forelimb licking were measured.

Electrophysiology

Standard procedures were used to prepare 300 µm thick parasagittal slices from 8-day-old and 90-day-old (P8–P90) mice [30]. Briefly, brains were dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF), and sliced with a vibratome at 4°C. Slices were maintained for 30 min at 32°C in an interface chamber containing ACSF equilibrated with 95% O2/5% CO2 and containing (in mM): 124 NaCl, 2.7 KCl, 2 CaCl2, 1.3 MgCl2, 26 NaHCO3, 0.4 NaH2PO4, 10 glucose, 4 ascorbate, and then for at least 1 hour at room temperature before being transferred to a superfusing recording chamber. Whole-cell recordings from Purkinje neurons were performed at 33°C, in a chamber perfused at 2 ml/min with bubbled ACSF. Patch electrodes (3–5 MΩ) were pulled from borosilicate glass tubing and filled with a solution containing (in mM): 140 Cs-methylsulfonate, 5 QX314-Cl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, and 0.3 Na-GTP (pH adjusted to 7.25 with CsOH, 295 mOsm). Monopolar stimulation electrodes were pulled from borosilicate glass tubing and filled with ACSF. Stimulation pulses (1 ms, 1 to 30 µA) were applied using an externally triggered stimulus isolator device (World Precision Instruments). Data were recorded with a Multiclamp700B (Axon Instruments), filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz. In all experiments, series resistance was monitored throughout the experiment by applying a hyperpolarizing current, and if it changed by more than 15% or overwhelmed 25 MΩ, the data were not included in the analysis. Data were acquired and analyzed with: ClampEx10.2, ClampFit10.0 (Axon Instruments), SigmaPlot 11 software and R language and environment for statistical computing. Spontaneous Inhibitory PSCs (sIPSC) were automatically detected by a template-based routine in the ClampFit 10.0 software. Evoked IPSC and EPSC amplitude were determined as the maximal current obtained following stimulation within the molecular layer by holding the Purkinje cell at +10 mV and -70 mV respectively. All values are given as means ± standard error of the mean (SEM) and statistical procedures performed using R language and environment for statistical computing. Mean values were compared between genotypes using either unpaired Student’s t test or Mann-Whitney test as appropriate. QX314 was purchased from Alomone labs.

Statistical Analyses

Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Reported as means±SD, raw data were compared by using one-way analysis of variance with Fisher’s test. Regarding behavioral studies, the distribution of the data deviated quite strongly from normality and variances were not equal. Therefore, nonparametric statistics were used and data were analyzed by Student’s t test and Mann-Whitney U-test. For all analyses, at least three independent experiments (each of them including at least 6 mice) were performed. p values lower than 0.05 were considered as significant (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

Results

TRAF4 deficiency alters locomotion coordination

A panel of standard neurobehavioral tests for motor and coordination performance [31] [23] was performed on TRAF4-

KO and wild-type (WT) littermate mice. There is no difference between WT and TRAF4-KO mouse body weights whatever their age (Table 3). All results are summarized in Table 4. The geotaxis test was first performed on 8- (closed eyes) and 21- (opened eyes) day-old mice. At both ages, the time needed to turn up completely was significantly increased in TRAF4-KO compared with WT mice (day 8: p<0.001 and day 21: p=0.002). This is also true for 6-month-old mice (p<0.011). These data suggest that TRAF4-KO mice exhibit alterations in anterior limb coordination and/or brain maturation. The Rotarod test performed on adult mice (8 weeks and 6 months) showed that TRAF4-KO mice stayed a shorter time on the rod compared with WT (p=0.011 and p=0.010). Moreover, the rod speed at fall moment was slower in TRAF4-KO mice (p=0.007 and p=0.029), confirming alterations in movement coordination in adult mice in the absence of TRAF4. We therefore investigated the equilibrium capacity using the wooden edge test. TRAF4-KO mice stayed less time at the edge (p=0.004) and crossed lower number of segments (p<0.001) compared with WT. Moreover, using the wooden beam test, TRAF4-KO mice crossed less segments than control mice (p=0.016), although the fall latency was similar (p=0.273). These data show that TRAF4-KO mice exhibit an equilibrium deficiency. A locomotion coordination and equilibrium test including swimming, climbing and landing gave similar results. At 8 weeks, four-fold more WT mice successfully achieved the task compared with TRAF4-KO mice (p=0.004), a difference which was not due to decreased muscular force in the absence of TRAF4 since the grip and suspension tests gave similar results in TRAF4-KO and WT mice (p=0.060 and p=0.111, respectively). Similar results were obtained at 6 months. Thus, TRAF4 is important for the correct coordination of limbs during exercise, suggesting that impaired TRAF4-KO locomotion/equilibrium might result from an alteration in the cerebellum. Indeed, several studies have shown that the adult cerebellum is implicated in equilibrium and posture [25]. This behavioral phenotype is not greatly amplified with age (6 months). Since the cerebellum is involved in agonist and antagonist muscle coordination and reflex control [32–33], we directly explored these functions by performing the touch test and the hot-plate test. The touch test showed that TRAF4-KO mice were less sensitive to pressure from von Frey monofilaments than WT mice (p=0.019). Moreover, the latencies for forepaw licking in the hot plate test were significantly increased (p=0.038). Finally, we studied the exploration capacity of TRAF4-KO mice using the open field test. The number of movements recorded, the time and the total distance covered by TRAF4-KO mice were reduced compared with control mice (p=0.044, p=0.008 and p=0.013, respectively). Collectively, all these symptoms indicate that TRAF4 deficiency induces an alteration in locomotion coordination typical of ataxia.

Table 3. Body weight of WT and TRAF4-KO mice at various ages.

Age/nb	WT (g)	TRAF4-KO (g)	p-value
8 d (n=18)	15.8±0.4	16.5±0.5	0.3276
21 d (n=18)	18.2±0.2	18.5±0.1	0.2660
8 w (n=18)	21.9±0.9	22.1±0.2	0.8690
6 m (n=8)	29.2±1.2	26.7±2.0	0.2873

Data are means±SD; g, gram; n, number of mice/group; d, day; w, week; m, month.

doi:10.1371/journal.pone.0030917.t003

TRAF4 deficiency induces myelin alteration

Myelin plays a key role in the functioning of the nervous system by allowing fast saltatory conduction of nerve pulses. Since it has been reported that myelin disorganization leads to alterations in locomotion coordination and/or severe ataxia [34–35], CNS myelin organization was examined in WT and TRAF4-KO mice. Histological analysis by Luxol fast blue staining, a marker of myelin, showed that the myelin network in the cerebellum white matter was disorganized and less dense in TRAF4-KO mice compared with WT (Figure 1A). Electron microscopy was performed on 6 WT and 6 TRAF4-KO 8-week-old mice, investigating both internodal and paranodal regions. We observed major ultrastructural alterations in the myelin of TRAF4-KO mice (Figure 1B). The number of myelinated axons was reduced when compared with WT mice (84.4 ± 6.6 vs $97.9 \pm 5.1\%$, $p = 0.0005$). Moreover, in the WT brain, the adjacent axons were in contact with each other, while spaces between the axons were observed in the TRAF4-KO brain (Figure 1B a and b). The myelin layers surrounding the axons showed a loss of parallelism in the TRAF4-KO brain compared with WT (Figure 1B c–f). We then analyzed the ultrastructure of the optic nerve, another CNS component. Similar myelin alterations were observed (Figure 1B g and h), indicating that the myelin abnormalities due to the TRAF4 absence were not restricted to the cerebellum. Finally, the node of Ranvier, where lamellae of compact myelin sheaths normally terminate in glial loops to establish the paranodal axoglial septate-like junctions [36], were also altered. In the WT cervical spinal cord and optic

nerve we found the regular, densely stained transverse bands (TBs) in almost all of the paranodes examined between the paranodal loop and axon. Moreover, the paranodal loops contact the axon (Figure 1B, i and k). In contrast, although the majority of the TRAF4-KO paranodes exhibited correct morphology, 10–20% showed dramatic defects (Figure 1B, j and l). Thus, the attachment of the paranodal loops to the axon, and the space between the loops and axon may be increased. We observed loops completely detached and even everted, facing away from the axonal membrane. Finally, spacing between TBs may be irregular, or paranodal loops or portions of loops may lack well-defined TBs. We could not find any similar paranodal myelin alterations in the WT mice. Similar myelin phenotype was observed in older animals TRAF4-KO mice (6-month-old).

We then checked for myelin molecular abnormalities in TRAF4-KO cerebellum. Consistent with our ultrastructural observations, using western blot and immunofluorescence analyses, we observed a reduction in myelin basic protein (MBP), the second most abundant protein in the CNS myelin [37] (Figures 1C and 1D b and f). Moreover, it has been reported that myelin organization around the axons is maintained by tight-junction-like structures (TJ) located first between the lamellae of myelin sheaths and second, between the axon and the inner myelin loop. The observed TRAF4-KO myelin ultrastructural phenotype suggests that these structures might be altered in the absence of TRAF4. We then checked for the presence of oligodendrocyte-specific protein/Claudin-11 (OSP/cl11) and contactin-associated protein (Caspr ; also known as paranodin) proteins that are known to be

Table 4. Results of locomotion and behavior tests in WT and TRAF4-KO mice.

Test	Age/nb	Parameters	WT(n = 18)	TRAF4-KO	p-value
Geotaxis	8 d (n = 8)	Time (s)	7.1 (3.1)	20.2 (18.6)	0.0007
	21 d (n = 8)	Time (s)	6.8 (6.0)	18.3 (40.5)	0.0019
	6 m (n = 8)	Time (s)	8.5 (4.5)	13.7 (15.0)	0.0112
Rotarod	8 w (n = 18)	Fall latency (s)	149.5 (65.0)	89.0 (31.5)	0.0111
		Speed (rpm/min)	13.0 (2.0)	9.0 (1.5)	0.0068
	6 m (n = 8)	Fall latency (s)	92.9 (17.6)	76.0 (20.7)	0.0104
		Speed (rpm/min)	10.0 (2.5)	7.0 (1.5)	0.0286
Wooden edge	8 w (n = 18)	Fall latency (s)	389.5 (441.8)	28.7 (134.8)	0.0045
		Segment (nb)	5.0 (0.0)	3.0 (1.5)	0.0005
Wooden beam	8 w (n = 18)	Fall latency (s)	720.0 (0)	720.0 (0.0)	0.2733
		Segment (nb)	11.0 (21.0)	6.0 (0.0)	0.0158
Locomotion/equilibrium	8 w (n = 18)	Success (%)	61.5	15	0.0036
	6 m (n = 8)	Success (%)	37.5	0	<0.001
Grip	8 w (n = 18)	Force (N)	95.0 (37.0)	72.1 (38.0)	0.0604
	6 m (n = 8)	Force (N)	115.0 (49.0)	104.5 (19.0)	0.2264
Suspension	8 w (n = 18)	Time (s)	96.3 (12.5)	76.9 (8.8)	0.1110
	6 m (n = 8)	Time (s)	35.6 (43)	12.2 (22.0)	0.0033
Touch	8 w (n = 18)	Pressure (g)	0.5 (0.8)	1.2 (2.5)	0.0193
Hot-plate	8 w (n = 18)	Latency (s)	36.1 (7.8)	46.5 (13.3)	0.0378
Open field	8 w (n = 18)	Movement (nb)	313.0 (450.5)	105.0 (315.5)	0.0440
		Time (s)	183.0 (280.1)	1.3 (34.9)	0.0078
		Distance (cm)	1632.1 (3089.7)	60.2 (35.2)	0.0135

Tests were performed with animals aged 8-day-old, 21-day-old, 8-week-old and 6-month-old as indicated. Values correspond to medians with interquartiles in parentheses. Statistical analysis was two-tailed Mann-Whitney U-test. S, second; n, number of mice of each set (WT and TRAF4-KO) involved in the test; nb, number; %, percentage; N, Newton; cm, centimeter.
doi:10.1371/journal.pone.0030917.t004

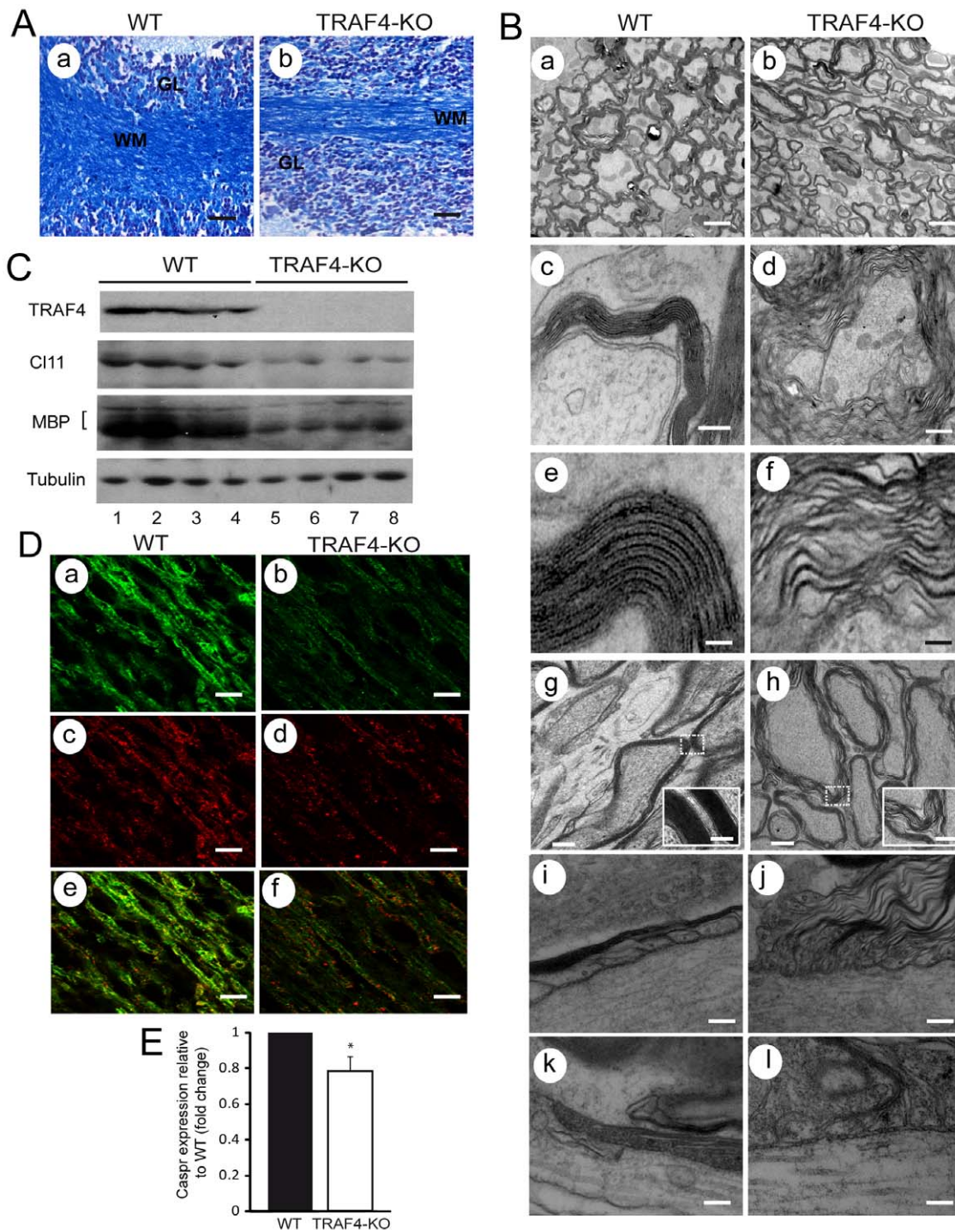


Figure 1. Myelin alteration in 8-week-old TRAF4-KO mice. (A): Histological analysis of myelin using Luxol fast blue staining of the cerebellum from WT (a) and TRAF4-KO (b) mice showed a lower amount of myelin in the absence of TRAF4 (n = 6/group). (B): (a–h) Electron microscopy analysis on transversal section of WT (a, c, and e) and TRAF4-KO (b, d and f) cerebellum. The continual wrapping of the oligodendrocyte cell myelin membrane forms a multilamellar layer around axons that is electron dense. The number of myelinated axons was lower and they were not in close contact with each other in the absence of TRAF4 (b versus a). Note the loss of organization of myelin sheath in TRAF4-KO cerebellum (b, d and f) compared with WT mice (a, c and e) suggesting defects of myelin TJs. Similar myelin abnormalities were observed in the TRAF4-KO optic nerves (h) compared with WT mice (g). (i–l) : Electron microscopy analysis on longitudinal section of WT (i, k) and TRAF4-KO (j, l) paranodes. WT paranodal myelin was well organized, and electron-dense TBs between the axonal and oligodendrocyte membranes were present in the cervical region of the spinal cord (i) and the optic nerve (k). In contrast, in the TRAF4-KO spinal cord (j) and optic nerve (l), some paranodal loops showed disorganization. Myelin membranes were separated from the axon and from each other. Paranodal loops oriented away from the axon were also observed. TBs are sometimes disordered or absent. Bars: a and b, 1 μ m; c and d, 0.5 μ m; e and f, 0.2 μ m; g and h: 1 μ m, inset 0.5 μ m; i–l: 0.25 μ m. (C): Western blot analysis of the myelin-specific MBP marker and of the interglial-specific TJ marker claudin 11 (cl 11) showed a decreased expression level of both proteins in 4 independent TRAF4-KO cerebellum protein extracts (lanes 5–8) compared with 4 WT samples (lanes 1–4) ; tubulin served as a loading control. (D): MBP (a and b)

and claudin 11 (c and d) immunofluorescence of adjacent sections of WT and TRAF4-KO cerebellum, respectively, showed a lower expression of both protein in the absence of TRAF4. (e and f): merge of the MBP-stained and claudin 11-stained adjacent sections. Bars: a–f, 10 μ m. (E): Q-RT-PCR analysis of expression of the specific marker of axoglia TJs caspr using total RNA extracts from WT (black) and TRAF4-KO (white) cerebellum showed a decrease of caspr expression in the absence of TRAF4. Data are means \pm SD (n=6/group) (ANOVA, Fisher's test). doi:10.1371/journal.pone.0030917.g001

respectively involved in these types of TJs [34] [38]. The TRAF4-KO cerebellum exhibited a reduction in claudin 11 protein compared with WT (Figures 1C and 1D d and f). Moreover, Q-RT-PCR of total RNA extracts from the cerebellum showed that caspr expression was also reduced by 20% compared with WT (0.8 \pm 0.1 fold change; p=0.0257) (Figure 1E). These results show that both axoglial and interglial TJs, necessary for the correct organization and stabilization of myelin around axons, are altered in the absence of TRAF4.

TRAF4 is normally expressed in the oligodendrocyte

Neurons and myelinating glia communicate with each other bidirectionally in multiple ways to orchestrate axon myelination [39] [40]. The myelin phenotype of the TRAF4-KO animals suggests that TRAF4 might exert a key physiological function in the CNS myelination. We therefore studied the expression of TRAF4 in oligodendrocytes that are CNS cells producing myelin proteins. Oligodendrocyte progenitor cells (OPC) were extracted and purified from 3 to 4-day-old mouse brains. After in vitro differentiation, four stages (numbered 1–4, from the least to the most differentiated one) were obtained corresponding to early OPC, late OPC (preoligodendrocytes), immature (pre-myelinating), and mature (myelinating) oligodendrocytes, as characterized by their specific morphologies [41]. Thus, from a bipolar phenotype (stage 1), cells extend multipolar short processes (stage 2), long ramified branches (stage 3), and finally myelin membranes (stage 4) (Figure 2A). Total RNA was extracted from cells at each stage and analyzed by Q-RT-PCR for the expression of platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGF-Ra), oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factor (Olig2), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), ProteoLip-

id Protein (PLP) and (MBP) known markers of oligodendrocyte differentiation [41] (Figure 2). As previously described, high PDGF-Ra expression was observed at stage 1 (C), Olig2 was shown at all stages (D), whereas PLP, MBP and CNPase were mainly expressed at stage 4 (E–G). These patterns of expression confirmed the four morphologically-identified oligodendrocyte differentiation stages. Since TRAF4 is expressed by neurons, we also tested the expression of Neurofilament 68 (NF68), a marker of neurons [42]. The very low level of NF68 expression observed in primary cell cultures compared with that in the adult mouse brain extract (H) indicated that oligodendrocyte cultures were not contaminated by neurons. Thus, TRAF4 was expressed in all stages of differentiation with highest expression in early OPC (B). Together, these data show that TRAF4 is indeed expressed in oligodendrocytes.

TRAF4 deficiency leads to Purkinje cell degeneration

Since it is well documented that structural/functional abnormalities of the myelin sheath may cause axon degeneration and neuronal death [43], we hypothesize that the Purkinje cells might be altered in TRAF4-KO mice. The mouse cerebellum matures massively during the first month of life. Therefore, we first studied the 15-day-old mouse cerebellum (Figure 3A). Histological analysis using Cresyl violet staining showed several alterations, notably a less compact granular layer, a less cohesive Purkinje cell layer, and a Purkinje cell body with altered morphology (reduced cell size, condensed nuclei) in the absence of TRAF4 (a and b, and insets). Calbindin 28K (Calb28), a marker for Purkinje cells [44], immunostaining revealed obvious gaps in the Purkinje cell layer in the TRAF4-KO brain compared with WT (c and d), suggesting Purkinje cell degeneration in the absence of TRAF4. Accordingly,

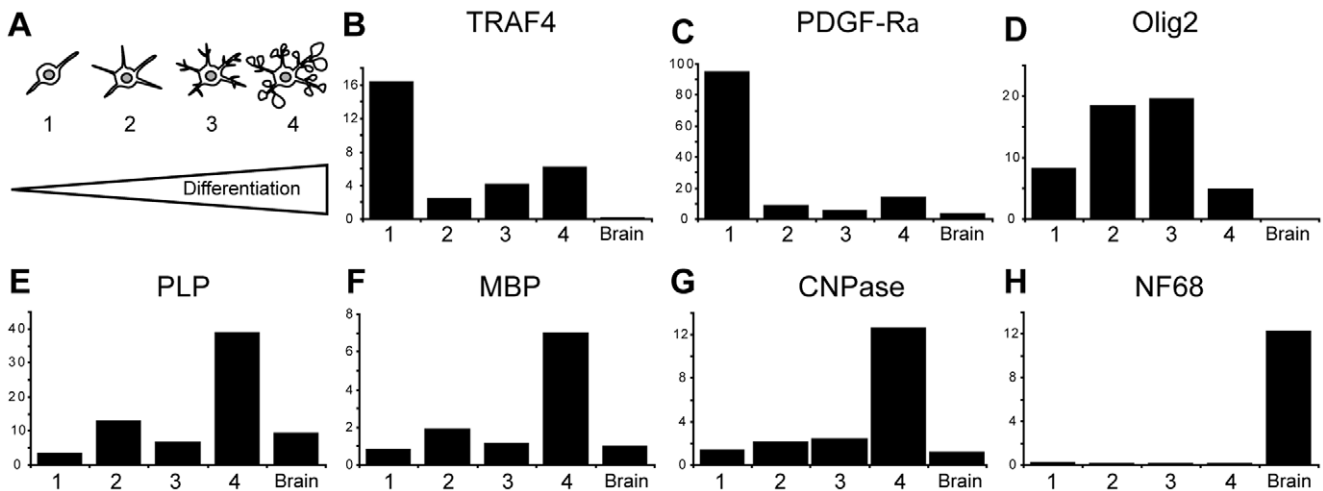


Figure 2. TRAF4 expression in WT oligodendrocyte primary cultures. (A): Oligodendrocyte primary culture and differentiation: schemes of the morphological characteristics of the 4 stages of differentiation obtained: early OPC, late OPC, pre-myelinating and myelinating oligodendrocytes (numbered from 1 to 4); (B–H): results of Q-RT-PCR analyses of RNA extracted from cells at each stages (relative expression compared with that of the GAPDH gene as control); (B) pattern of TRAF4 expression, (C–F) patterns of expression of the oligodendrocyte markers PDGF-Ra, Olig2, PLP, MBP and CNPase, respectively. NF68 expression pattern (H) in total adult brain extract (brain) serves as cell culture purity control. TRAF4 is expressed at all stages of oligodendrocyte differentiation. doi:10.1371/journal.pone.0030917.g002

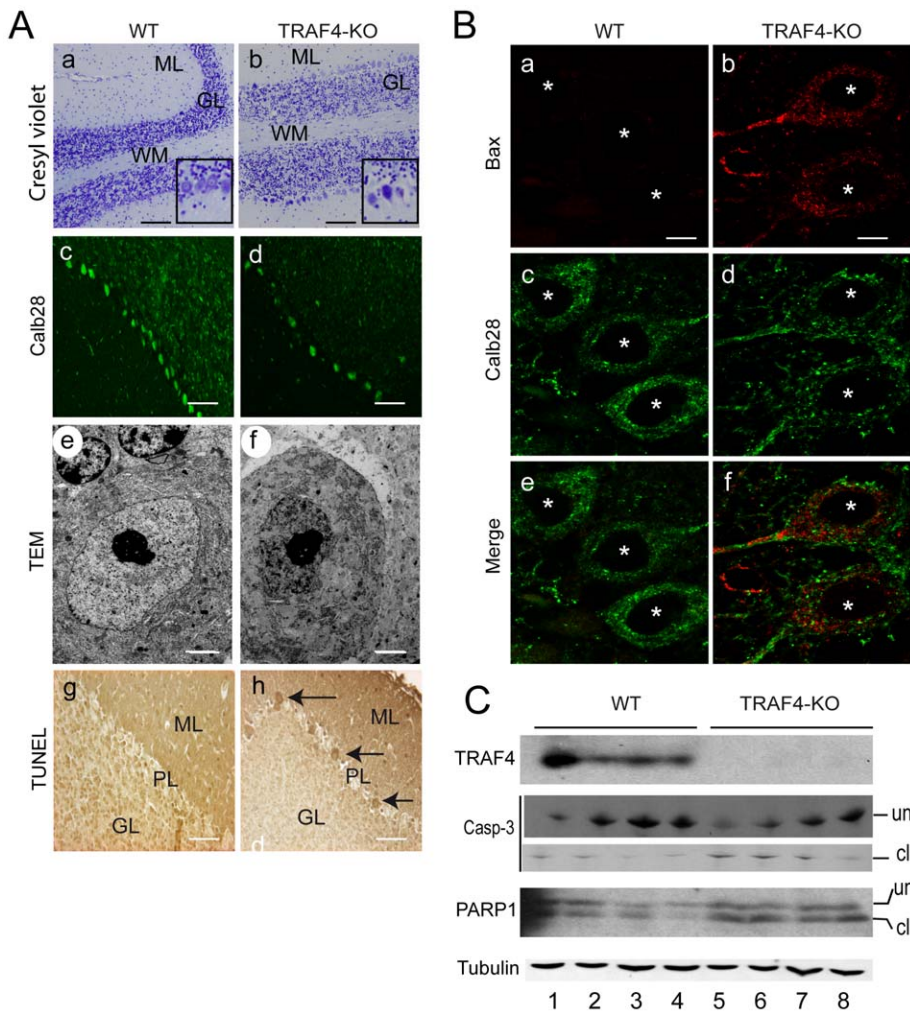


Figure 3. Purkinje cell degeneration in TRAF4-KO cerebellum. (A): analyses of WT (a, c, e and g) and TRAF4-KO (b, d, f and h) cerebellum at 15 postnatal days; (a, b) cresyl violet staining of parasagittal sections (ML, molecular layer; GL, granular cell layer; WM, white matter); (c, d) white matter immunofluorescence analysis of calb28 (green); In the absence of TRAF4, the number of Purkinje cells was decreased. (e, f) EM ultrastructural analysis: Purkinje cell nuclei exhibit classical morphological alterations specific of apoptosis notably chromatin condensation and nuclear membrane blebbing. (g, h) TUNEL staining: In the absence of TRAF4, the number of apoptotic Purkinje cells was increased (brown, arrows). Bars: a–d, g and h, 30 μ m, insets 2-fold increase; e and f, 3.5 μ m. (B): Bax immunofluorescence of WT and TRAF4-KO Purkinje cells showed a higher expression of this pro-apoptotic factor in the absence of TRAF4 (white stars, cell nuclei). Bars: a–f, 10 μ m. (C): Western blot analysis of total cerebellum protein extracts from 4 WT (lanes 1–4) and 4 TRAF4-KO (lanes 5–8) 8-week-old mice. Both caspase 3 and PARP-1 cleaved forms were increased in the absence of TRAF4. cl, cleaved forms; un, uncleaved forms. Tubulin served as a loading control. doi:10.1371/journal.pone.0030917.g003

TRAF4-KO Purkinje cell nuclei presented altered ultrastructural features, namely condensed chromatin and blebbing of the nuclear membrane (e and f), as previously described in apoptotic cells [45]. Moreover, Bax immunofluorescence analysis showed an increased expression of this pro-apoptotic factor [46] in TRAF4-KO Purkinje cells (Figure 3B). Accordingly, we observed a high number of apoptotic Purkinje cells in the TRAF4-KO brain using TUNEL staining (Figure 3A g and h). Consistently, histological analysis of the adult cerebellum (8-week-old mice) showed that the number of Purkinje cells was lower in the TRAF4-KO brain compared with WT (101.7 \pm 29.1 versus 176.6 \pm 64.3; $p < 0.0001$). Furthermore, the activation of caspase-3, an apoptosis effector, in TRAF4-KO mice was observed by western blot analysis of total cerebellum protein extracts (Figure 3C). Finally, cleavage of the caspase-3 nuclear target, Poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP1), was also increased in the TRAF4-KO cerebellum compared with WT (lanes 5–8 versus lanes 1–4). These

data show that TRAF4 deficiency induces apoptosis in the cerebellum, notably affecting Purkinje cells.

The functional organization of neuronal activity in the remaining Purkinje cells of TRAF4-KO mice is not altered

The ataxia observed in the TRAF4-KO mice may therefore be due to modifications in the cerebellum microcircuitry. Indeed, alterations in Purkinje cell survival have been associated with rearrangements of the synaptic inputs onto the surviving cells. For example, Aldolase-C expression, which has been suggested to be correlated with parasagittal heterogeneity in the feed-forward circuits of the cerebellum cortex [47], is also crucial for the survival of Purkinje cells [48]. Thus, to directly address the synaptic connectivity in the cerebellum cortex in the absence of TRAF4, we performed whole cell patch-clamp recordings of the Purkinje cells in acute transverse cerebellar slices of TRAF4-KO and WT brains

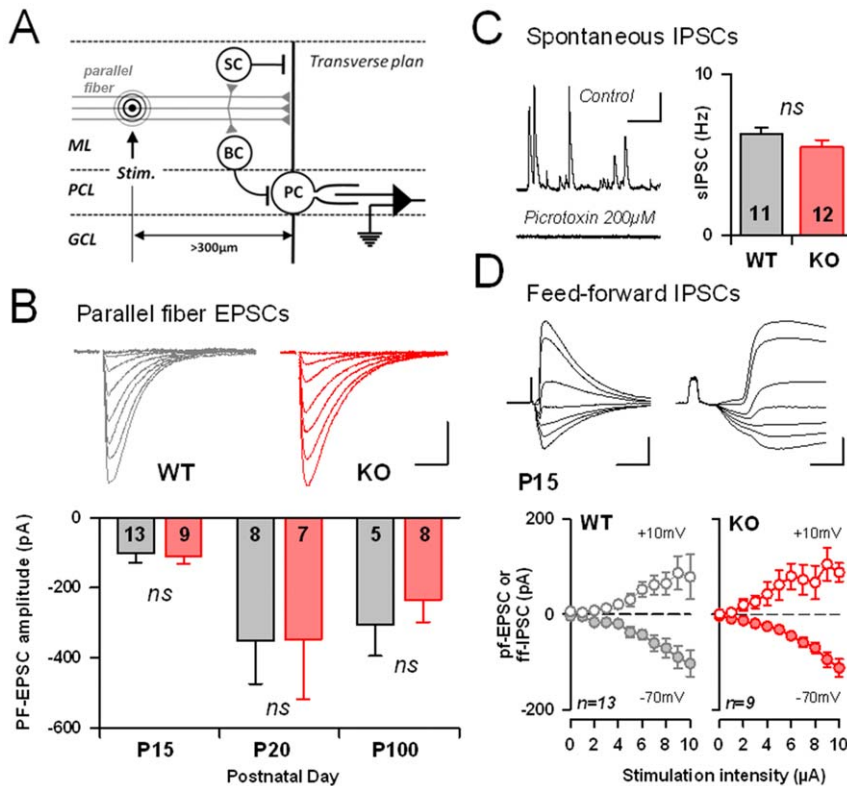


Figure 4. Cerebellum cortex electrophysiology in the absence or presence of TRAF4. (A): Scheme of the experimental procedure. Parallel fibers were stimulated by an electrode placed in the middle of the molecular layer (ML, Stim.) at more than 300 μm from the recorded Purkinje cell (PC). GCL: granule cell layer; PCL: Purkinje cell layer; SC: stellate cell; BC: Basket cell. (B): PF evoked EPSC at different stimulation strength were obtained from wild-type and TRAF4 KO mice, at different postnatal ages. No difference in the mean eEPSC at 10 μA was detectable. The number of recorded cells is indicated. NS: not significant. Scale bars: 20 msec and 200 pA. (C): The frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents was similar between genotypes. sIPSCs were abolished by the GABA_A receptor antagonist Picrotoxin (200 μM). Number of recorded cells is indicated. Scale bars: 0.5 sec and 100 pA. (D): At P15, both parallel fiber EPSC, and associated feed-forward IPSCs (ff-IPSC) had similar amplitudes between WT and KO mice at all stimulations tested. Ff-IPSCs and PF-EPSCs are recorded by holding the PC at +10 mV and -70 mV respectively. Scale bars: Left: 15 msec and 200 pA; Right: 3 msec and 200 pA. doi:10.1371/journal.pone.0030917.g004

[30] (Figure 4). During the early postnatal period, cerebellar granular cells migrate from the external granular cell layer to the internal cell layer to establish synaptic contacts with the Purkinje cells (Parallel fiber→Purkinje cell synapses). Thus, the loss of numerous Purkinje cells in the absence of TRAF4 may perturb the excitatory drive of parallel fibers onto the Purkinje cells [49]. However, this was not the case. The excitatory post-synaptic currents elicited by local stimulation within the molecular layer were similar in TRAF4-KO or WT Purkinje cells (Figure 4A and B).

The regularity of the spiking activity of Purkinje cells has been correlated with motor coordination and crucially depends on the activity of molecular layer interneurons (MLIs) [50]. Thus, we recorded the spontaneous (sIPSCs, Figure 4C) inhibitory transmission in Purkinje cells by holding Purkinje cells at +10 mV. Both the mean frequency (Figure 4C) and amplitude (data not shown) of sIPSCs were similar in 15-day-old (P15) TRAF4-KO and WT Purkinje cells. Further, when evoked by incoming parallel fiber excitation, feed-forward evoked IPSCs were also comparable between genotypes ([51], Figure 4D), indicating that both the synaptic weight at the MLI→PC synapses and the efficacy of the parallel fibers to recruit MLIs are preserved in the absence of TRAF4. Together, these electrophysiological results suggest that no major rearrangement of the cortical micro-circuitry in the remaining Purkinje cells occurs in the absence of TRAF4.

TRAF4 deficiency favors the expression of the neurite outgrowth inhibitors Nogo A and MAG

To further understand how TRAF4 deficiency could induce Purkinje cell death, we analyzed myelin-related proteins expressed by oligodendrocytes and known to induce neuron apoptosis. Myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte myelin glycoprotein (OmgP) and reticulon-4 (Nogo A) have been reported to be overexpressed following myelin alterations which in turn inhibit axon outgrowth, regeneration and/or repair [52]. We performed Q-RT-PCR analysis of Nogo A, MAG and OmgP mRNA expression in the cerebellum of TRAF4-KO and WT mice (6 animals/group) (Figure 5A). Nogo A and MAG levels were significantly increased in TRAF4-KO mice compared with WT (2.0±0.1 fold change, p<0.0001 and 1.9±0.2 fold change, p=0.0062, respectively). OmgP expression was unchanged (1.1±0.1 fold change, p=0.3624). Thus, the overexpression of NogoA and MAG in the absence of TRAF4 results from their transcriptional upregulation. NogoA and MAG overexpression was confirmed at the protein level by western blot analysis of total cerebellum protein extracts from WT (lanes 1–4) or TRAF4-KO (lanes 5–8) mice (Figure 5B). Altogether, these results indicate that TRAF4 deficiency leads to the activation of the neurite outgrowth inhibitory pathway.

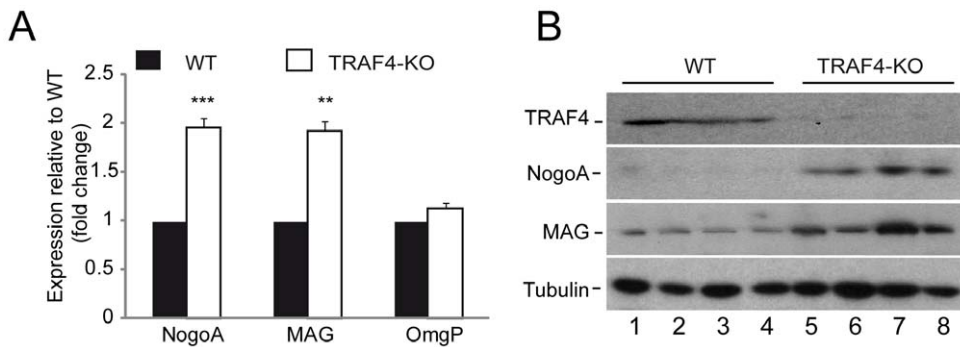


Figure 5. NogoA, MAG and OmgP Expression in the cerebellum of 8-week-old WT and TRAF4-KO mice. (A): Q-RT-PCR analysis of NogoA, MAG and OmgP expression in cerebellum total RNA extracts from WT (black) and TRAF4-KO (white) mice. Both NogoA and MAG were overexpressed whereas OmgP level remained stable. Data are means \pm SD (n=8) (ANOVA, Fischer's test). (B): Western blot analysis of TRAF4, NogoA, MAG and tubulin expression using 4 total protein extracts from WT (lanes 1–4) and TRAF4-KO (lanes 5–8) cerebellum. NogoA and MAG proteins were overexpressed in the absence of TRAF4. Tubulin served as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0030917.g005

TRAF4 deficiency activates the NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway

In the CNS, there is a cross-talk between neurons and oligodendrocytes. It has been reported that NogoA and MAG proteins present at the oligodendrocyte membrane might interact with the Nogo receptor (NgR) located at the neuron membrane [53]. The NgR acts through binding to a co-receptor, the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) [16]. Q-RT-PCR analyses of total RNA cerebellum extracts showed that NgR and p75 NTR mRNA levels were increased in TRAF4-KO mice compared with WT (2.5 \pm 0.6 fold change, p = 0.0019 and 1.6 \pm 0.2 fold change, p = 0.0189, respectively) (Figure 6A). Moreover, it has been reported in neuronal cells that p75NTR might activate the Ras homologous A (RhoA) signaling pathway to mediate cytoskeletal changes [16]. Accordingly, western blot analyses of cerebellum protein extracts showed that the phosphorylation level of the Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (Rock2), a key effector of RhoA, was increased in TRAF4-KO mouse cerebellum that expressed higher p75 NTR protein levels (lanes 5–8) compared with WT (lanes 1–4). Altogether, these data indicate an activation of the RhoA signaling pathway in the absence of TRAF4.

Discussion

In the present study, we provide evidence that TRAF4 is a new player in the myelination processes, and a key factor in cerebellar ontogenesis/homeostasis. The locomotion/motor coordination deficits observed in TRAF4-KO mice are similar to that described for several spontaneous murine mutants exhibiting cerebellar ataxia [26].

We show that, in addition to neurons, TRAF4 is expressed by oligodendrocytes at all stages of their differentiation. Moreover, TRAF4 expression is an early event in oligodendrocyte differentiation since it is strongly expressed in early OPC, suggesting that TRAF4 might play a critical role in oligodendrocyte commitment.

Dramatic ultrastructural alterations of the TRAF4-KO CNS myelin were observed, including a lower number of myelinated axons, disorganized myelin layers and abnormal paranodes, indicating that TRAF4 is a key player in the CNS myelination processes. Myelin is essential for the effective and rapid propagation of action potentials and therefore, the functional integrity of the nervous system [39] [40]. Myelination is a multistep process. In the CNS, the myelin sheath is formed by the spiral wrapping of multiple layers of oligodendrocyte glia plasma membrane extensions around the axon, followed by the extrusion

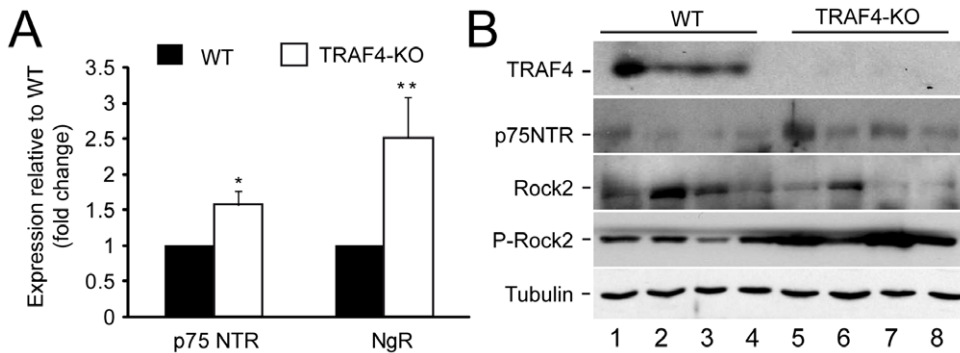


Figure 6. Activation of the NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway in 8-week-old TRAF4-KO mouse cerebellum. (A): Q-RT-PCR analysis of p75NTR and NgR expression in WT (black) and TRAF4-KO (white) cerebellum total RNA extracts. Both receptor expression was increased in the absence of TRAF4. Data are means \pm SD (n=8) (ANOVA, Fischer's test). (B): Western blot analysis of TRAF4 and p75NTR and downstream effector Rock2 using cerebellum protein extracts from 4 WT (lanes 1–4) and 4 TRAF4-KO (lanes 5–8) mice. This confirmed the overexpression of p75NTR at the protein level, and its activity via RhoA since Rock2 exhibited higher phosphorylation levels (P-Rock2). Tubulin served as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0030917.g006

of cytoplasm and the compaction of the stacked membrane bilayers. The reciprocal communication between neurons and oligodendrocytes plays an essential role in the domain organization of myelinated axons, defining node, paranode, juxtaneuron and internode domains. The myelin phenotype observed in the absence of TRAF4 indicates that the septate-like junctions located between the myelinating glia and axonal membrane, and the TJ-like structures involved in the intermembranous sealing of glial cells, that both contribute to stabilization of correct compartmentalization, were altered. Consistently, the expression of *caspr*, a major transmembrane component of axoglial junctions in axons [38], and claudin-11, a member of the claudin family of TJ transmembrane proteins predominantly expressed by oligodendrocytes and that constitutes a marker for intramyelinic linear-array TJs in CNS [34], were reduced in TRAF4-KO cerebellum. Interestingly, it has been shown that the mice deficient for claudin-11 or *caspr* present myelin and TJ disorganization, alterations in locomotion coordination and/or severe ataxia [34] [35]. Our findings implicate the importance of TRAF4 in the formation and/or stability of axoglial and interglial junctions, and subsequent myelin integrity.

Depending on the organ and/or cell types, various transmembrane proteins are involved in the TJs to guarantee cell polarity: occludin is observed in epithelia, claudin-11 in oligodendrocytes, and *caspr* in neurons. The crucial task of TRAF4 in the polarity function of TJs is highlighted by the following data. First, TRAF4 was previously identified as a TJ-related protein in adjacent epithelial cells, responsible for the maintenance of the epithelium integrity [18]. Second, the present data yield new insights into the role of TRAF4 in the establishment and/or maintenance of axoglial and interglial TJs. Third, claudin-11 is also normally robustly expressed in Sertoli cells of the testis where it forms parallel organized TJs similar to those shown in oligodendrocytes [34]. Interestingly, the testis expresses TRAF4 [20], and exhibits altered TJs in TRAF4-KO mice (our unpublished results). Altogether, these data represent conclusive evidence for the pivotal contribution of TRAF4 to TJ structures and function, and suggest that TRAF4 shares a general function in several TJ types, presumably independent of the nature of the transmembrane proteins involved (e.g.: occludin, claudin, *caspr*). In this context, TRAF4 might act at the level of the cytoplasmic plaque, a scaffolding and signaling center, underlying TJs at the plasma membrane [54]. This macromolecular structure interacts with the cytoskeleton and recruits the integral membrane proteins that bind to adjacent cells. The present data further support the already proposed role for TRAF4 in cell polarity, tissue homeostasis, cytoskeletal organization and morphogenesis [14] [16].

Effects consecutive to myelin defects are mediated via the overexpression and release of myelin-associated inhibitory molecules into the axonal environment [52]. In this context, MAG and NogoA, which colocalizes with MAG in the innermost loop of the myelin membrane [55], are 2 prototypical myelin-derived neurite growth inhibitors. We show here that TRAF4 deficiency leads to increased MAG and NogoA expression. MAG and NogoA are glial ligands for the neuronal glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored NgR that transduces the downstream growth inhibitory signal in susceptible neurons. This is achieved via NgR binding to the transmembrane co-receptor p75NTR, a member of the TNFR-superfamily that is expressed in neurons [53]. NgR/p75NTR has been shown to regulate cell morphogenesis by controlling the activity of RhoA, a member of the small GTPase Rho family. Moreover, activation of downstream signaling via p75NTR requires intracellular adaptor proteins since this receptor is devoid of intrinsic kinase activity. In this line, Rho guanine-

nucleotide dissociation inhibitor (Rho-GDI) binds to the cytoplasmic domain of p75NTR to mediate the signal [16]. Finally, it has been reported that MAG or NogoA activate RhoA and its downstream effector Rho-associated kinase (ROCK) leading to actin cytoskeleton rearrangement favoring axon regeneration inhibition and neuron apoptosis [56] [57] [16]. In this context, the observed MAG, NogoA, NgR and p75NTR overexpression and up-regulated function, as evidenced by increased phosphorylation of Rock2, clearly indicate that TRAF4 deficiency activates the NgR/p75NTR/RhoA pathway. Collectively, these data strongly support that TRAF4 normally down-regulates this pathway. In this context, in addition to its role in TJs homeostasis, TRAF4 may also directly modulate p75NTR signaling pathway since it has been reported to bind with the p75NTR intracytoplasmic juxtamembrane region [12,58].

Consistent with the activation of the RhoA pathway, we observed Purkinje cell apoptosis in TRAF4-KO cerebellum. The cerebellum is the brain region essential for coordination and motor control, and TRAF4-KO mice present motor behavior deterioration. In the process of motor coordination, Purkinje cells and more precisely their spontaneous discharge activity play an essential role [49]. The precision of the spiking pattern of Purkinje cells is controlled both by incoming cortical, vestibular and sensory information relayed by excitatory and inhibitory synaptic inputs [59], as well as intrinsic conductances [60]. For example, feed-forward recruitment of local interneurons has been shown to efficiently control Purkinje cell spiking activity [51] [30]. Although no major rearrangement of the cortical microcircuitry is induced by the absence of TRAF4 in the remaining TRAF4-KO Purkinje cells, the dramatic Purkinje cell degeneration observed in the TRAF4-KO cerebellum leads to the overall reduction in the number of functional units. Interestingly, several studies report that ataxia might be due to Purkinje cell number reduction [61] [48] [62]. Thus, the loss of Purkinje cells in TRAF4-KO mice may participate in the ataxic syndrome developed by these mice.

Finally, Rho GTPase signaling has been reported to substantially control polarity protein signaling and vice versa. The complex interplay between RhoA and polarity proteins is not fully understood [63]. It has been shown that junctional dynamics and RhoA activity are interconnected, at least in the epithelial cells. Indeed, on the one hand, activation of RhoA is implicated in the disassembly of TJs, most likely by regulation of the actin cytoskeleton. On the other hand, TJs might negatively regulate RhoA signaling as the TJ-associated Rho exchange factor (GEFH1) contributes to the downregulation of active RhoA in confluent monolayers [64]. Thus, Rho activities need to be finely balanced to obtain optimal TJ integrity. Thus, our data bring new clues about the regulatory function of TJs on the RhoA signaling pathway, and identify TRAF4 as being a major molecule in this process.

We might hypothesize that TRAF4 should not act directly on the NogoA/MAG signaling pathway. Based on the essential function of TRAF4 on TJs and published data in the field of myelin alteration, we propose the following cascade of events to explain the TRAF4-KO ataxia phenotype: the absence of TRAF4 first affects myelin TJs leading to the loss of myelin integrity, and subsequently to MAG and NogoA overexpression, activation of the NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway, actin cytoskeleton changes, Purkinje cell death and, hence, ataxia.

The present study will hopefully contribute to the understanding of demyelinating or neurodegenerative diseases. For example, genome-wide screens have identified several candidate mechanisms for schizophrenia, including myelination disturbances [65], and if future studies are needed to elucidate the molecular

mechanisms that underlie these abnormalities, there is converging evidence for the implication of NgR [66]. Interestingly, a decrease of TRAF4 expression has been observed in the cortex from schizophrenic patients [67].

Acknowledgments

We would like to thank Y. Schwab, J.L. Bossu, R. Roman, and S. Bour for technical assistance, S. Chan and B. Dales for helpful discussion, and M.

Perrault, G. Roussel and V. Lelièvre for helpful discussion and the generous gift of oligodendrocyte RNAs.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SB MK M-PC FA CT YH M-CR. Performed the experiments: SB MK AR FG MM NM FA. Analyzed the data: SB M-PC FA CT YH M-CR. Contributed reagents/materials/analysis tools: SB MK AR FG MM NM FA. Wrote the paper: SB YH M-CR.

References

1. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681–692.
2. Liu H, Su YC, Becker E, Treisman J, Skolnik EY (1999) A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol* 9: 101–104.
3. Wajant H, Muhlenbeck F, Scheurich P (1998) Identification of a TRAF (TNF receptor-associated factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Evol* 47: 656–662.
4. Kedinger V, Alpy F, Tomasetto C, Thisse C, Thisse B, et al. (2005) Spatial and temporal distribution of the traf4 genes during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 5: 545–552.
5. Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115: 679–688.
6. Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, et al. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 254: 14–24.
7. Regnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard MP, Wendling C, et al. (1995) Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 270: 25715–25721.
8. Regnier CH, Masson R, Kedinger V, Textoris J, Stoll I, et al. (2002) Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5585–5590.
9. Shiels H, Li X, Schumacker PT, Maltepe E, Padrid PA, et al. (2000) TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am J Pathol* 157: 679–688.
10. Kalkan T, Iwasaki Y, Park CY, Thomsen GH (2009) Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor-beta signaling that affects neural crest formation. *Mol Biol Cell* 20: 3436–3450.
11. Cherfils-Vicini J, Vingert B, Varin A, Tartour E, Fridman WH, et al. (2008) Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice. *Immunology* 124: 562–574.
12. Esparza EM, Arch RH (2004) TRAF4 functions as an intermediate of G1TR-induced NF-kappaB activation. *Cell Mol Life Sci* 61: 3087–3092.
13. Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, Kojima Y, Coban C, et al. (2005) TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 35: 2477–2485.
14. Kedinger V, Rio MC (2007) TRAF4, the unique family member. *Adv Exp Med Biol* 597: 60–71.
15. Rousseau A, Rio MC, Alpy F (2011) TRAF4, at the Crossroad between Morphogenesis and Cancer. *Cancers* 3: 2734–2749.
16. Mathew SJ, Haubert D, Kronke M, Leptin M (2009) Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci* 122: 1939–1946.
17. Wu RF, Xu YC, Ma Z, Nwariaku FE, Sarosi GA, Jr., et al. (2005) Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol* 171: 893–904.
18. Kedinger V, Alpy F, Baguet A, Polette M, Stoll I, et al. (2008) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *PLoS One* 3: e3518.
19. Camilleri-Broet S, Cremer I, Marmey B, Comperat E, Viguie F, et al. (2007) TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* 26: 142–147.
20. Masson R, Regnier CH, Chenard MP, Wendling C, Mattei MG, et al. (1998) Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) expression pattern during mouse development. *Mech Dev* 71: 187–191.
21. Preiss A, Johannes B, Nagel AC, Maier D, Peters N, et al. (2001) Dynamic expression of *Drosophila* TRAF1 during embryogenesis and larval development. *Mech Dev* 100: 109–113.
22. Lee M, Lelièvre V, Zhao P, Torres M, Rodriguez W, et al. (2001) Pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 21: 3849–3859.
23. Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, et al. (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170: 667–679.
24. Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard MP, et al. (2008) Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function

- against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* 27: 6347–6355.
25. Deiss V, Strazielle C, Lalonde R (2000) Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor co-ordination in staggerer mutant mice. *Neuroscience* 95: 903–911.
26. Lalonde R, Strazielle C (2007) Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Res* 1140: 51–74.
27. Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, et al. (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* 34: 243–255.
28. Christianson JA, Ryals JM, Johnson MS, Dobrowsky RT, Wright DE (2007) Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice. *Neuroscience* 145: 303–313.
29. Contet C, Gaveriaux-Ruff C, Matifas A, Caradec C, Champy MF, et al. (2006) Dissociation of analgesic and hormonal responses to forced swim stress using opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 31: 1733–1744.
30. Gambino F, Kneib M, Pavlowsky A, Skala H, Heitz S, et al. (2009) IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice. *Eur J Neurosci* 30: 1476–1486.
31. Hoeger H, Engelmann M, Bernert G, Seidl R, Bubna-Littitz H, et al. (2000) Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci* 66: 947–962.
32. Garwicz M (2002) Spinal reflexes provide motor error signals to cerebellar modules—relevance for motor coordination. *Brain Res Brain Res Rev* 40: 152–165.
33. Timmann D, Brandauer B, Hermsdorfer J, Ilg W, Konczak J, et al. (2008) Lesion-symptom mapping of the human cerebellum. *Cerebellum* 7: 602–606.
34. Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, et al. (1999) CNS myelin and sirtoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99: 649–659.
35. Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, et al. (2001) Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 30: 369–383.
36. Teigler A, Komljenovic D, Draguhn A, Gorgas K, Just WW (2009) Defects in myelination, paranode organization and Purkinje cell innervation in the ether lipid-deficient mouse cerebellum. *Hum Mol Genet* 18: 1897–1908.
37. Boggs JM (2006) Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* 63: 1945–1961.
38. Bellen HJ, Lu Y, Beckstead R, Bhat MA (1998) Neurexin IV, caspr and paranodin—novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci* 21: 444–449.
39. Simons M, Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119: 4381–4389.
40. Thaxton C, Bhat MA (2009) Myelination and regional domain differentiation of the axon. *Results Probl Cell Differ* 48: 1–28.
41. Buchet D, Baron-Van Evercooren A (2009) In search of human oligodendroglia for myelin repair. *Neurosci Lett* 456: 112–119.
42. Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* 119: 1814–1824.
43. Trapp BD, Stys PK (2009) Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 8: 280–291.
44. Ariel M, Ward KC, Tolbert DL (2009) Topography of Purkinje cells and other calbindin-immunoreactive cells within adult and hatchling turtle cerebellum. *Cerebellum* 8: 463–476.
45. Norman DJ, Feng L, Cheng SS, Gubbay J, Chan E, et al. (1995) The *lurcher* gene induces apoptotic death in cerebellar Purkinje cells. *Development* 121: 1183–1193.
46. D’Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 17: 1104–1114.
47. Gao W, Chen G, Reinert KC, Ebner TJ (2006) Cerebellar cortical molecular layer inhibition is organized in parasagittal zones. *J Neurosci* 26: 8377–8387.
48. Heitz S, Gautheron V, Lutz Y, Rodeau JL, Zanjani HS, et al. (2008) BCL-2 counteracts Doppel-induced apoptosis of prion-protein-deficient Purkinje cells in the *Ngsk Prnp(0/0)* mouse. *Dev Neurobiol* 68: 332–348.
49. Pietrobon D (2010) Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine. *J Physiol* 588: 1871–1878.
50. Hausser M, Clark BA (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19: 665–678.

51. Mittmann W, Koch U, Hausser M (2005) Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 563: 369–378.
52. Xie F, Zheng B (2008) White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol* 209: 302–312.
53. Dupuis L, Pehar M, Cassina P, Rene F, Castellanos R, et al. (2008) Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 740–745.
54. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S (2008) The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 1778: 601–613.
55. Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME (2002) Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22: 3553–3567.
56. Spencer T, Domeniconi M, Cao Z, Filbin MT (2003) New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 13: 133–139.
57. Aloy EM, Weinmann O, Pot C, Kasper H, Dodd DA, et al. (2006) Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biol* 35: 137–156.
58. Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, et al. (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274: 30202–30208.
59. Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 9: 304–313.
60. Walter JT, Alvina K, Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2006) Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci* 9: 389–397.
61. Grusser-Cornehls U, Baurle J (2001) Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. *Prog Neurobiol* 63: 489–540.
62. Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, et al. (2009) A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6706–6711.
63. Iden S, Collard JG (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 846–859.
64. Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS (2010) Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)* 25: 16–26.
65. Lee PR, Fields RD (2009) Regulation of myelin genes implicated in psychiatric disorders by functional activity in axons. *Front Neuroanat* 3: 4.
66. Budel S, Padukkavidana T, Liu BP, Feng Z, Hu F, et al. (2008) Genetic variants of Nogo-66 receptor with possible association to schizophrenia block myelin inhibition of axon growth. *J Neurosci* 28: 13161–13172.
67. Aston C, Jiang L, Sokolov BP (2004) Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J Neurosci Res* 77: 858–866.

ANNEXE-2

TRAF4 Promotes TGF- β Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis

Long Zhang,^{1,6,7} Fangfang Zhou,^{1,7,*} Amaya García de Vinuesa,¹ Esther M. de Kruijf,² Wilma E. Mesker,² Li Hui,³ Yvette Drabsch,¹ Yihao Li,¹ Andreas Bauer,⁴ Adrien Rousseau,⁵ Kelly-Ann Sheppard,³ Craig Mickanin,³ Peter J.K. Kuppen,² Chris X. Lu,³ and Peter ten Dijke^{1,*}

¹Department of Molecular Cell Biology, Cancer Genomics Centre Netherlands and Centre for Biomedical Genetics

²Department of Surgery

Leiden University Medical Center, Postbus 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands

³Novartis Institutes for Biomedical Research, 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA

⁴Novartis Institutes for BioMedical Research, CH-4002 Basel, Switzerland

⁵Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7104, Centre National de la Recherche Scientifique/U964 Institut National de Santé et de Recherche Médicale/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

⁶Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: f.zhou@lumc.nl (F.Z.), p.ten_dijke@lumc.nl (P.t.D.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.014>

SUMMARY

TGF- β signaling is a therapeutic target in advanced cancers. We identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4) as a key component mediating pro-oncogenic TGF- β -induced SMAD and non-SMAD signaling. Upon TGF- β stimulation, TRAF4 is recruited to the active TGF- β receptor complex, where it antagonizes E3 ligase SMURF2 and facilitates the recruitment of deubiquitinase USP15 to the TGF- β type I receptor (T β RI). Both processes contribute to T β RI stabilization on the plasma membrane and thereby enhance TGF- β signaling. In addition, the TGF- β receptor-TRAF4 interaction triggers Lys 63-linked TRAF4 polyubiquitylation and subsequent activation of the TGF- β -activated kinase (TAK)1. TRAF4 is required for efficient TGF- β -induced migration, epithelial-to-mesenchymal transition, and breast cancer metastasis. Elevated TRAF4 expression correlated with increased levels of phosphorylated SMAD2 and phosphorylated TAK1 as well as poor prognosis among breast cancer patients. Our results demonstrate that TRAF4 can regulate the TGF- β pathway and is a key determinant in breast cancer pathogenesis.

INTRODUCTION

Transforming growth factor- β (TGF- β) signaling controls a vast majority of cellular processes and the development of all metazoans (Kang et al., 2009; Moustakas and Heldin, 2009). Deregulation of TGF- β activity can result in developmental defects and/or diseases, including cancer (Ikushima and Miyazono,

2010; Massagué, 2008). TGF- β elicits its cellular effects via specific type I and II serine/threonine kinase receptors. The activated TGF- β type I receptor (T β RI) phosphorylates specific receptor-regulated (R)-SMAD proteins, SMAD2 and SMAD3, which assemble into heteromeric complexes with common (Co-) SMAD4. Heteromeric SMAD complexes efficiently translocate into the nucleus, where they regulate the transcription of target genes (Ikushima and Miyazono, 2010; Kang et al., 2009; Massagué, 2008; Moustakas and Heldin, 2009). SMAD7 functions as an inhibitory SMAD by recruiting the E3 ligase SMURF2 to the type I receptor and subsequently mediates the proteasomal degradation of T β RI, thereby mitigating TGF- β signaling (Kavsak et al., 2000). In addition, non-SMAD signaling pathways, such as the TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)/p38 MAP kinase pathway, are initiated (Miyazono, 1997). The TGF- β induced signals can exert proinvasive and prometastatic responses in advanced cancers (Chiang and Massagué, 2008; Heldin et al., 2009; Padua and Massagué, 2009).

Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4) is unique among TRAF family members, which mainly function in the immune system, where they mediate signaling via tumor necrosis factor receptors (TNFRs) and interleukin-1/Toll-like receptors (IL-1R/TLRs) (Chung et al., 2002; Keding and Rio, 2007). No immunological defects have been identified in mice lacking TRAF4. Instead, TRAF4-deficient mice exhibit impaired neural tube closure and tracheal ring disruption, indicating abnormal cell migration (Régnier et al., 2002; Shiels et al., 2000). As a RING domain-containing E3 ligase, TRAF4 was originally identified in a differential expression screen using a cDNA library of breast cancer-derived metastatic lymph nodes (Régnier et al., 1995). Because of their druggable enzymatic activity, E3 ubiquitin ligases can be considered therapeutic targets. In this work, we identify TRAF4 as a key regulator of both SMAD and non-SMAD TGF- β receptor-induced signaling responses and of TGF- β -dependent oncogenic effects in breast cancer.

RESULTS

Identification of TRAF4, a Highly Expressed Gene in Human Cancers, as an Activator of TGF- β Receptor Signaling

To identify pivotal regulators of TGF- β signaling, we performed a gain-of-function screen by overexpressing 27,000 genes using a TGF- β -induced SMAD3/4-driven CAGA-luc transcriptional reporter as readout (Zhang et al., 2012b). We found that a number of E3 ligases markedly repressed or enhanced the activity of the TGF- β -induced luciferase reporter. After examination of the candidate E3 ligases (data not shown), we focused our attention on TRAF4 (Figure 1A). Consistent with the results of the genetic screen, we observed that forced TRAF4 expression led to an increase in CAGA-luc transcriptional reporter activity in TGF- β -treated HEK293T cells. By contrast, overexpression of the catalytically inactive TRAF4 mutant TRAF4 C18A (TRAF4C/A) or RING domain-deleted TRAF4 Δ R (60-470) did not significantly affect the activity of the TGF- β /SMAD-responsive reporter (Figure 1B). This suggests that the E3 ligase activity of TRAF4 is required for the stimulation of the TGF- β /SMAD pathway. We therefore tested the effect of TRAF4 loss of function. We observed that two independent shRNAs targeting TRAF4 efficiently decreased TGF- β -induced CAGA-luc activity (Figure 1C). Moreover, we observed that well-characterized direct transcriptional gene targets of TGF- β , i.e., *PAI-1*, *SMAD7*, and *CTGF*, were less expressed in mouse embryonic fibroblast cells (MEFs) deficient in TRAF4 (Figure 1D).

To determine the mechanism by which TRAF4 regulates the TGF- β pathway, we first assessed whether TRAF4 affects the main immediate mediators of TGF- β receptor signaling. TGF- β -induced SMAD2 phosphorylation (p-SMAD2), SMAD2-SMAD4 complex formation, and phosphorylated p38 MAP kinase were attenuated in TRAF4 knockout MEFs. However, the lack of TRAF4 did not affect the total levels of SMAD2, SMAD4, or p38 MAP kinase (Figure 1E). These data suggest that endogenous TRAF4 is a critical determinant for both TGF- β /SMAD and non-SMAD signaling in various cell types.

High-grade tumors frequently express elevated levels of TGF- β , and this has been correlated with poor prognosis in cancer patients (Massagué, 2008). Given the role of TRAF4 in the regulation of TGF- β signaling activity, we investigated the possibility that TRAF4 might be a relevant factor in late-stage cancer. In line with a report that high TRAF4 expression is a common characteristic of human carcinomas (Camilleri-Broët et al., 2007), onco-mine expression analysis revealed TRAF4 upregulation in human cancers (Glück et al., 2012; Bonome et al., 2008; Ginos et al., 2004) in which TGF- β is prometastatic (Figure 1F). Using the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, we observed that individuals with ovarian carcinoma and higher TRAF4 expression had a shorter life expectancy than those with ovarian cancer and lower TRAF4 expression (Figure 1G). These data suggest that TRAF4 may play an oncogenic role in multiple cancer types by activating TGF- β signaling pathways.

TRAF4 Is an E3 Ubiquitin Ligase that Targets SMURF2 Polyubiquitination and Degradation

Next, we investigated the molecular mechanism by which TRAF4 enhances TGF- β signaling. In an independent whole proteomic

tandem affinity purification (TAP) screen, we identified a potential association between TRAF4 and SMURF2 (Figures 2A and 2B and see Table S1 online). Ectopic expression of SMURF2 and TRAF4 in both a yeast two-hybrid system and HEK293T cells demonstrated strong interactions between the two proteins (Figures 2C and 2D). In addition, SMURF2 interacts with TRAF4 (and SMAD7) in transfected cultured cells (Figure 2E). The C2 and WW domains of SMURF2 are of critical importance for the interaction of SMURF2 with TRAF4 (Figure S1A). Importantly, in nontransfected breast cancer cell lines, endogenous TRAF4 was found to interact with SMURF2 (Figure 2F and Figure S1C). Consistent with a previous report in *Xenopus* (Kalkan et al., 2009), we also found that SMURF1 interacts with TRAF4 in breast cancer cells (Figure S1B).

Coexpression of TRAF4 diminished SMURF2 expression (Figure 2D); this effect could be partially rescued by treatment with the proteasome inhibitor MG132 (data not shown), indicating that SMURF2 is a TRAF4 substrate. To further verify the relationship between SMURF2 and TRAF4, we performed ubiquitination assays. Wild-type TRAF4, but not the CA mutant, dramatically increased the polyubiquitination of ectopically expressed SMURF2 in cultured cells (Figure 2G). In vitro ubiquitination assays demonstrated that SMURF2 is a direct target of TRAF4 and that polyubiquitinated His-SMURF2 was only detected in the presence of wild-type TRAF4, and not the CA mutant (Figure 2H). We next determined whether these effects also occur endogenously. As shown by a His-ubiquitin nickel pull-down assay, wild-type TRAF4 increased the polyubiquitination of endogenous SMURF2, whereas the RING domain-deletion and CA mutation did not have this effect (Figure 2I). Moreover, the depletion of endogenous TRAF4 significantly reduced the polyubiquitination of endogenous SMURF2, but not SMURF1 (Figure 2J and Figure S2A), suggesting that TRAF4 is a major E3 ligase controlling SMURF2 polyubiquitination. Consistently, we found that the half-life of SMURF2 was increased in TRAF4-deficient MEF cells (Figure 2K). Taken together, these results demonstrate that TRAF4 depletion causes a reduction in SMURF2 polyubiquitination that stabilizes SMURF2. Furthermore, in line with and extending a previous report in which SMURF1 was shown to target TRAF4 (Li et al., 2010; Wang et al., 2013), we found that TRAF4 can be polyubiquitinated by both SMURF1 and SMURF2 (Figure 2L and Figures S2B-S2D). Thus, TRAF4 serves as the main E3 ligase for SMURF2, and TRAF4 itself is a substrate for both SMURF E3 ligases.

TRAF4 Is Associated with Activated TGF- β Receptors

The results above suggest that TRAF4 affects TGF- β signaling upstream of or at the level of R-SMAD activation. By serving as an E3 ligase for SMURF2, TRAF4 may determine TGF- β receptor stability and function. SMURF2 interacts with T β RI via SMAD7. We therefore tested whether TRAF4 interacts with SMAD7 or T β RI. TRAF4 did not bind SMAD7 (or other SMADs; data not shown). Endogenous TRAF4 interacted with T β RI and T β RII, which form a complex when they are overexpressed (Feng and Derynck, 1996), and the TRAF4-TGF- β receptor complex interaction was enhanced upon TGF- β stimulation (Figure S3A). In addition, ectopically expressed TRAF4 also coimmunoprecipitated with endogenous TGF- β receptors (Figure 3A). In cell lysates of

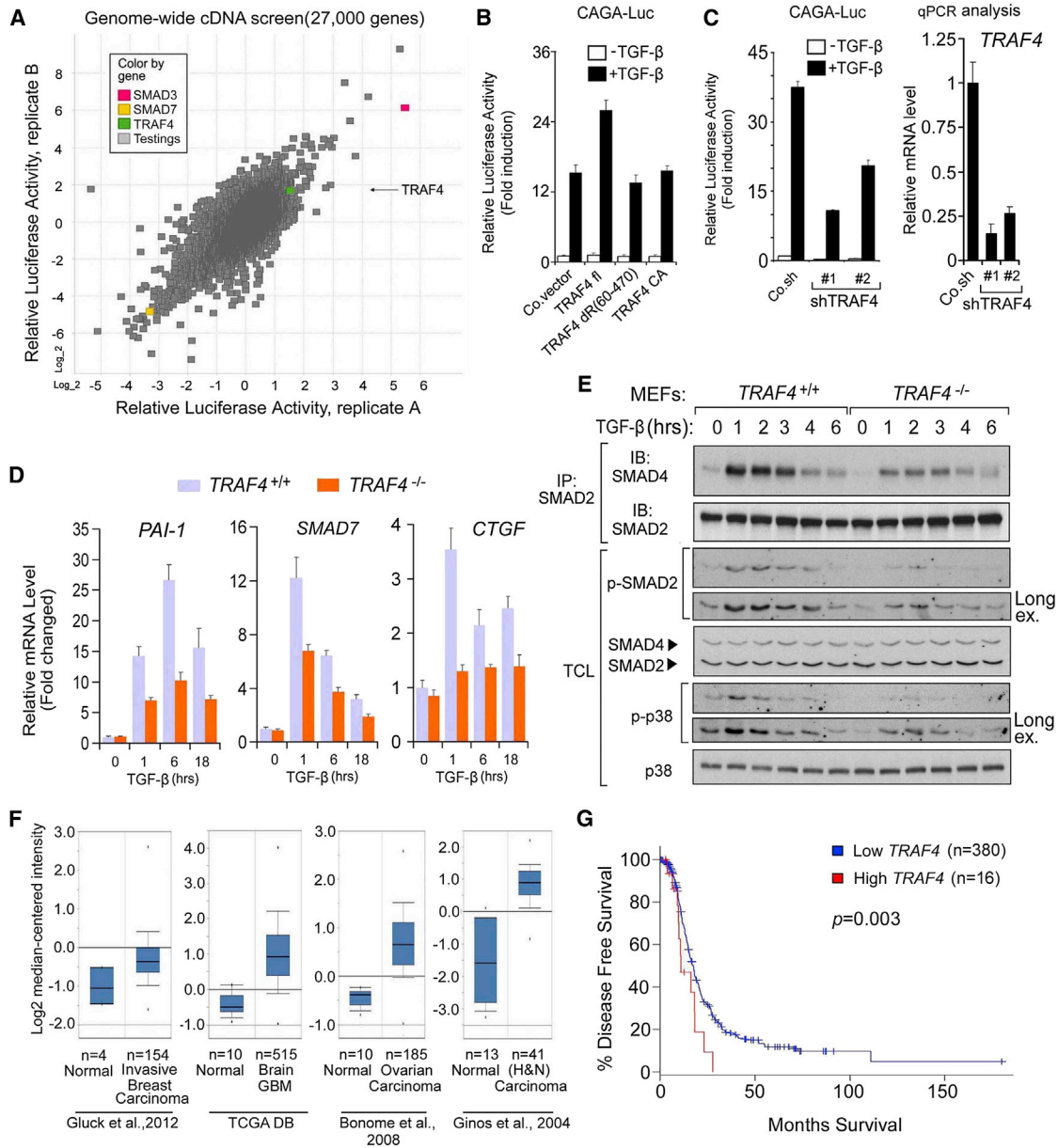


Figure 1. TRAF4 Is an E3 Ligase Required for TGF- β Signaling

(A) Diagram of genome-wide cDNA screening data in HEK293T cells; TRAF4 (green square), which activates the TGF- β -induced SMAD3-SMAD4-dependent CAGA12-Luc transcriptional reporter, is indicated. SMAD3 (red square) and SMAD7 (yellow square) are indicated as positive/negative control. Grey squares refer to all other cDNA clones tested. The x and y axes represent the relative luciferase activity in two replicates, $p < 0.01$.

(B) Effect of TRAF4 wild-type (TRAF4 fl) and E3 ligase-inactive TRAF4 mutants (TRAF4-CA, TRAF4-dR) on the CAGA12-Luc transcriptional response induced by TGF- β (1 ng/ml) in HEK293T cells. The data are presented as the mean \pm SD. Co.vec, empty vector.

(C) (Left panel) Effect of TRAF4 knockdown (shTRAF4 #1 and #2) on the CAGA12-Luc transcriptional response induced by TGF- β (5 ng/ml) in HEK293T cells. Co.sh, non-targeting shRNA. (Right panel) qRT-PCR (qPCR) analysis of TRAF4 expression in control and stably TRAF4-depleted (shTRAF4 #1 and #2) HEK293T cells. Co.sh, non-targeting shRNA. The data are presented as the mean \pm SD.

(D) qRT-PCR analysis of the TGF- β target genes *PAI-1*, *Smad7*, and *CTGF* in wild-type and TRAF4^{-/-} MEFs treated with TGF- β (5 ng/ml) for the indicated lengths of time. Values and error bars represent the mean \pm SD of triplicates and are representative of at least two independent experiments.

(E) Analysis of TGF- β -induced SMAD2-SMAD4 heteromeric complex formation in wild-type and TRAF4^{-/-} MEFs (1 ng/ml) by immunoprecipitation (IP) followed by immunoblotting (IB). Treatment times are indicated. Cell lysates were also immunoblotted for phosphorylated SMAD2 (p-SMAD2), phosphorylated p38 (p-p38) MAP kinase, total p38 MAP kinase (p38), total SMAD4, and total SMAD2.

(F) Oncomine box plots of TRAF4 expression levels in multiple human advanced cancers.

(G) Kaplan-Meier curves showing that the overall survival of individuals with ovarian carcinoma and higher TRAF4 gene expression (with overexpression defined as greater than 1.8 SDs above the mean) is significantly lower than that of individuals with lower TRAF4 expression ($p = 0.003$) by a log rank test.

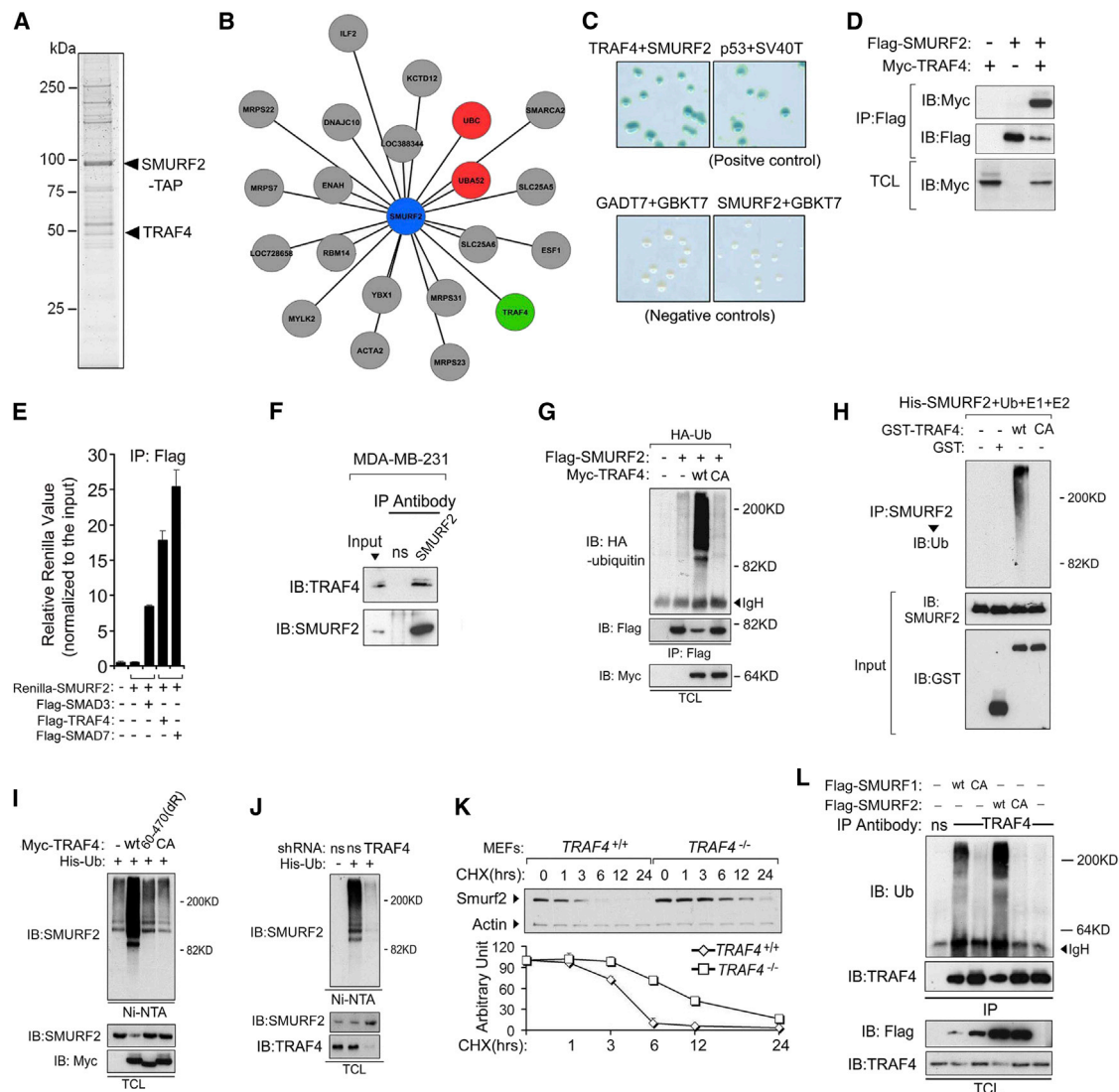


Figure 2. TRAF4 Is an E3 Ubiquitin Ligase for SMURF2

(A and B) Proteomic screening for proteins that interact with SMURF2. Red or gray ovals in (B) indicate the known or unknown interacting proteins of SMURF2 (also listed in Table S1). TRAF4 is highlighted in green. The TRAF4 running position is indicated (A). The graph was created using Cytoscape's Edge-Weighted Spring Embedded layout, with the Fisher's exact p values as weights (Smoot et al., 2011).

(C) Yeast two-hybrid system data verifying TRAF4 as a SMURF2-associating protein. p53 and SV40T served as positive controls.

(D) Immunoblots (IB) of the total cell lysate (TCL) and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids.

(E) LUMIER analysis of HEK293T cells transfected with Renilla-tagged SMURF2 and Flag-tagged TRAF4 (Barrios-Rodiles et al., 2005). The interactions were determined by measuring Renilla activity in anti-Flag immunoprecipitates. The data represent the mean \pm SD (n = 3). Flag-SMAD3 and Flag-SMAD7 served as positive controls.

(F) Endogenous interaction between SMURF2 and TRAF4 in MDA-MB-231 cells as analyzed by immunoprecipitation (IP) followed by IB with indicated antibodies.

(G) IB analysis of TCL and immunoprecipitates derived from ubiquitin (Ub)-expressing HEK293T cells transfected with the indicated plasmids and treated with MG132 (5 μ M) for 5 hr.

(H) In vitro ubiquitination assays were performed with His-SMURF2 and GST-TRAF4, E1, E2 (UbcH6), and ubiquitin. The assay mixtures were incubated for 3 hr at 37°C and subjected to IP with a SMURF2 antibody and IB with an anti-ubiquitin antibody.

(I and J) IB analysis of the TCL and Ni-NTA pull-down products from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids. SMURF2 polyubiquitination is visible as a ladder pattern.

(K) SMURF2 expression by IB analysis in wild-type and TRAF4^{-/-} MEFs treated with CHX (20 μ g/ml) for the indicated lengths of time.

(L) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids and treated with MG132 (5 μ M) for 5 hr. TRAF4 polyubiquitination is visible as a ladder.

See also Figures S1 and S2 and Table S1.

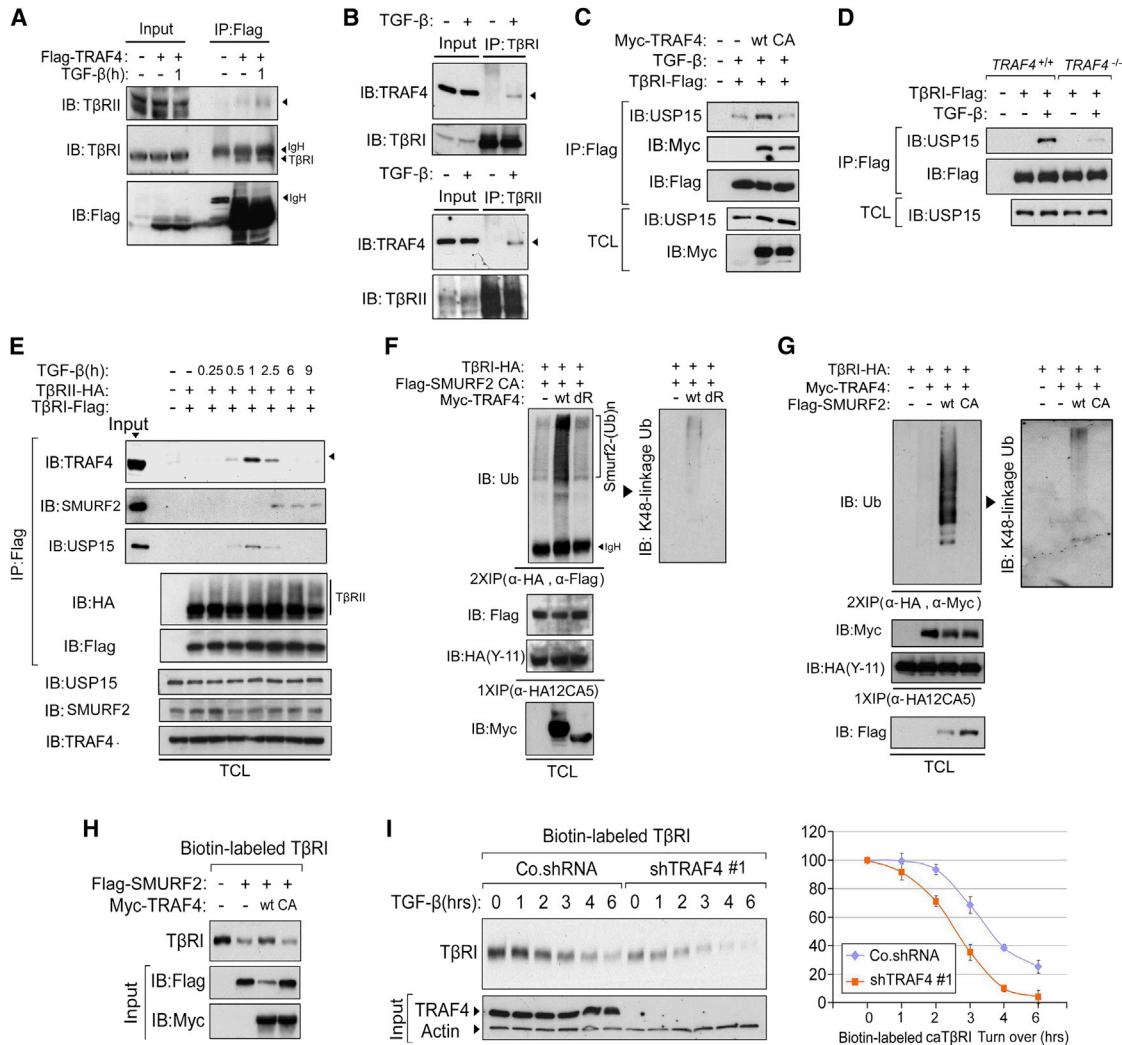


Figure 3. TRAF4 Is Associated with Activated TGF- β Receptors and Sustains the Level of T β RI on the Plasma Membrane

(A) Immunoblots (IB) of whole-cell lysates and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with TRAF4 and treated with TGF- β (5 ng/ml) as indicated. (B) IB analysis of whole-cell lysates and immunoprecipitates from MDA-MB-231 cells treated with TGF- β (5 ng/ml) for 1 hr. (C) IB analysis of total cell lysates (TCL) and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids and treated with TGF- β (5 ng/ml) for 1 hr. (D) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from wild-type and *TRAF4*^{-/-} MEFs transfected with Flag-tagged T β RI and treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 1 hr. (E) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with or without HA-tagged T β RII and Flag-tagged T β RI and treated with TGF- β (5 ng/ml) for the indicated lengths of time. (F) IB analysis of TCL and immunoprecipitates (two rounds of immunoprecipitation: first with an anti-HA antibody and then with an anti-Flag antibody) from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids. (G) IB analysis of TCL and immunoprecipitates (two rounds of immunoprecipitation: first with an anti-HA antibody and then with an anti-Myc antibody) from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids. (H) Immunoblots (IB) of biotinylated T β RI in HeLa cells transfected with the indicated plasmids. (I) Immunoblots of biotinylated T β RI in MDA-MB-231 cells infected with TRAF4 shRNA lentivirus and treated with TGF- β (5 ng/ml) for the indicated lengths of time. The data are presented in the right panel as the mean \pm SD. See also Figure S3.

nontransfected MDA-MB-231 cells, TRAF4 coimmunoprecipitated with both anti-T β RI and anti-T β RII upon TGF- β treatment (Figure 3B) and vice versa (Figure S3B). Moreover, USP15, a recently reported deubiquitinating enzyme for T β RI (Eichhorn et al., 2012), also associates with TRAF4 (Figures S3C and S3D). Wild-type TRAF4, but not the CA mutant, increased the

T β RI-USP15 interaction (Figure 3C). The TGF- β -induced T β RI-USP15 association was partially lost in TRAF4-deficient cells (Figure 3D). In summary, while SMURF2 targets T β RI degradation to inhibit TGF- β signaling, TRAF4 might stabilize T β RI and potentiate TGF- β signaling by antagonizing SMURF2 and facilitating the recruitment of USP15 to T β RI.

TRAF4 and USP15 were found to transiently bind to the TGF- β receptor complex, with maximum binding at 1 hr. Detectable SMURF2 binding to TGF- β receptors occurs only subsequently to the TRAF4 interaction (Figure 3E), suggesting that TRAF4 may antagonize SMURF2 recruitment to the TGF- β receptor complex. Therefore, we immunoprecipitated the tagged T β RI, disrupted the immunocomplexes with SDS-containing buffer, and reprecipitated the receptor-bound SMURF2, enabling the detection of TRAF4-promoted ubiquitinated (K48-linked) SMURF2 that was specifically associated with T β RI (Figure 3F).

Interestingly, receptor-associated TRAF4 was also found to be ubiquitinated (K48-linked) by wild-type SMURF2 (Figure 3G). This is consistent with the transient binding of TRAF4 to TGF- β receptors; SMAD7 participates in a negative feedback loop for TGF- β /SMAD signaling (Hayashi et al., 1997; Nakao et al., 1997; Wiesner et al., 2007) which, after several hours of TGF- β stimulation, increases the levels of SMAD7, enhancing SMURF2 recruitment to the TGF- β receptor.

TRAF4 Sustains the Level of T β RI on the Plasma Membrane

To further validate the interplay of TRAF4 and SMURF2 in T β RI function, we determined the membrane localization and stability of T β RI. Consistent with a previous report (Kavsak et al., 2000), SMURF2 severely reduced the levels of membrane-associated T β RI. Wild-type TRAF4, but not the CA mutant, sharply diminished SMURF2 expression and partially rescued T β RI expression (Figure 3H). Accordingly, TRAF4 depletion in MDA-MB-231 cells led to a lower amount of cell-surface T β RI and accelerated T β RI turnover (Figure 3I). These results suggest that TRAF4 antagonizes SMURF2 and thereby sustains T β RI stability on the plasma membrane.

TGF- β Promotes K63 Ubiquitination of TRAF4 and Its Interaction with TAK1

When lysates of MDA-MB-231 cells treated with TGF- β were probed with a TRAF4 antibody, we observed trace amounts of high-molecular-weight proteins (data not shown). Consistent with the notion that these proteins may represent TRAF4 with covalently conjugated polyubiquitin chains, we observed a typical smear/ladder pattern when these TRAF4 immunoprecipitates were blotted for ubiquitin (Figure 4A), with a peak at 30 min after TGF- β stimulation. TGF- β also enhanced the polyubiquitination of exogenous TRAF4, but not of TRAF4 dR (60-470) (Figure 4B), suggesting that the RING domain is required for ubiquitination of TRAF4. This modification is apparently nondegradative, because both endogenous and exogenous TRAF4 levels remained unaffected (Figures 4A and 4B). The type of ubiquitin chain linkage is mainly K63; the K63- but not the K48-ubiquitin mutant of TRAF4 was conjugated in response to TGF- β (Figure 4C).

To demonstrate that the TRAF4 bound to TGF- β receptors was ubiquitinated, we first isolated Flag-tagged T β RI from cell lysates, disrupted the immunocomplexes with SDS buffer, and reprecipitated the receptor-bound Myc-tagged TRAF4. In this way, we detected the ubiquitinated TRAF4 that was specifically associated with T β RI and activated by TGF- β (Figure 4D).

TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase that is activated by other TRAF family members (Sorrentino et al., 2008; Wang et al., 2001; Xia et al., 2009; Yamashita et al., 2008). This led us to examine whether TAK1 could also be activated by TGF- β receptor-associated polyubiquitinated TRAF4. Indeed, TAK1 was observed to associate with TRAF4, and their interaction was promoted by treatment with TGF- β (Figures 4E and 4F). We observed an enrichment of TAK1 in the anti-TRAF4 immunocomplex and ladders of high-molecular-weight TAK1 in MDA-MB-231 cells in the absence of TGF- β that became more pronounced after TGF- β treatment (Figure 4F). This suggests that TRAF4 may promote TAK1 ubiquitination in a manner similar to that found previously for TRAF6 (Sorrentino et al., 2008). Wild-type TRAF4, but not its catalytically inactive mutant, promoted exogenous TAK1 ubiquitination and phosphorylation, which were further stimulated upon TGF- β stimulation (Figure 4G). Moreover, the extraction of K63-ubiquitin chain conjugated substrates with tandem ubiquitin binding entities (TUBE) 1 from nontransfected MEFs revealed that TAK1 modification is reduced in TRAF4-deficient cells compared to control cells upon TGF- β stimulation (Figure 4H). These data indicate that TRAF4 contributes to TAK1 activation in response to TGF- β .

TAK1 is a K63-linked polyubiquitin-dependent protein kinase that activates MKK and IKK, which in turn can activate the p38 kinase and NF κ B pathways (Wang et al., 2001). We found that the TGF- β -induced phosphorylated (active) p38 levels were lower in *TRAF4*^{-/-} cells (Figure 1E). TRAF4 ectopic expression potently stimulated NF κ B-luc transcriptional reporter activity, which was further promoted by TGF- β (Figure 4I). TAK1 is required for efficient activation of p38 and NF κ B (Figures S3E and S3F), and selective inhibitors for TAK1 kinase, p38 MAP kinase, and NF κ B signaling could potently block breast cancer cell migration in response to TGF- β (Figure S3G). Consistently, depletion of endogenous TRAF4 was also observed to reduce the NF κ B response (Figure S3H). Thus, the TGF- β /TAK1-mediated activation of p38 MAP kinase and NF κ B transcriptional activity occurs at least partially in a TRAF4-dependent manner.

TRAF4 Is Critical for TGF- β -Induced EMT, Migration, and Invasion

TGF- β stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells (Xu et al., 2009). The upregulation of N-cadherin, fibronectin, smooth muscle actin, and vimentin and the downregulation of E-cadherin are typical EMT characteristics. *TRAF4* expression was inversely correlated with *E-cadherin* expression and was higher in mesenchymal cells such as MDA-MB-231 than in epithelial-like breast cancer cells such as MCF7 and MCF10A (Figure 5A). Compared to controls, TRAF4 deficiency resulted in higher expression of E-cadherin; the expression of E-cadherin was insensitive to TGF- β treatment (Figures 5B and 5C). Accordingly, TRAF4-deficient cells exhibited enhanced cell-cell adherence (data not shown) and reduced cell-migratory capacity (Figure 5D). Upon depletion of TRAF4, the TGF- β -induced changes in EMT markers were attenuated (Figure 5E and Figure S4A), whereas ectopic expression of wild-type TRAF4, but

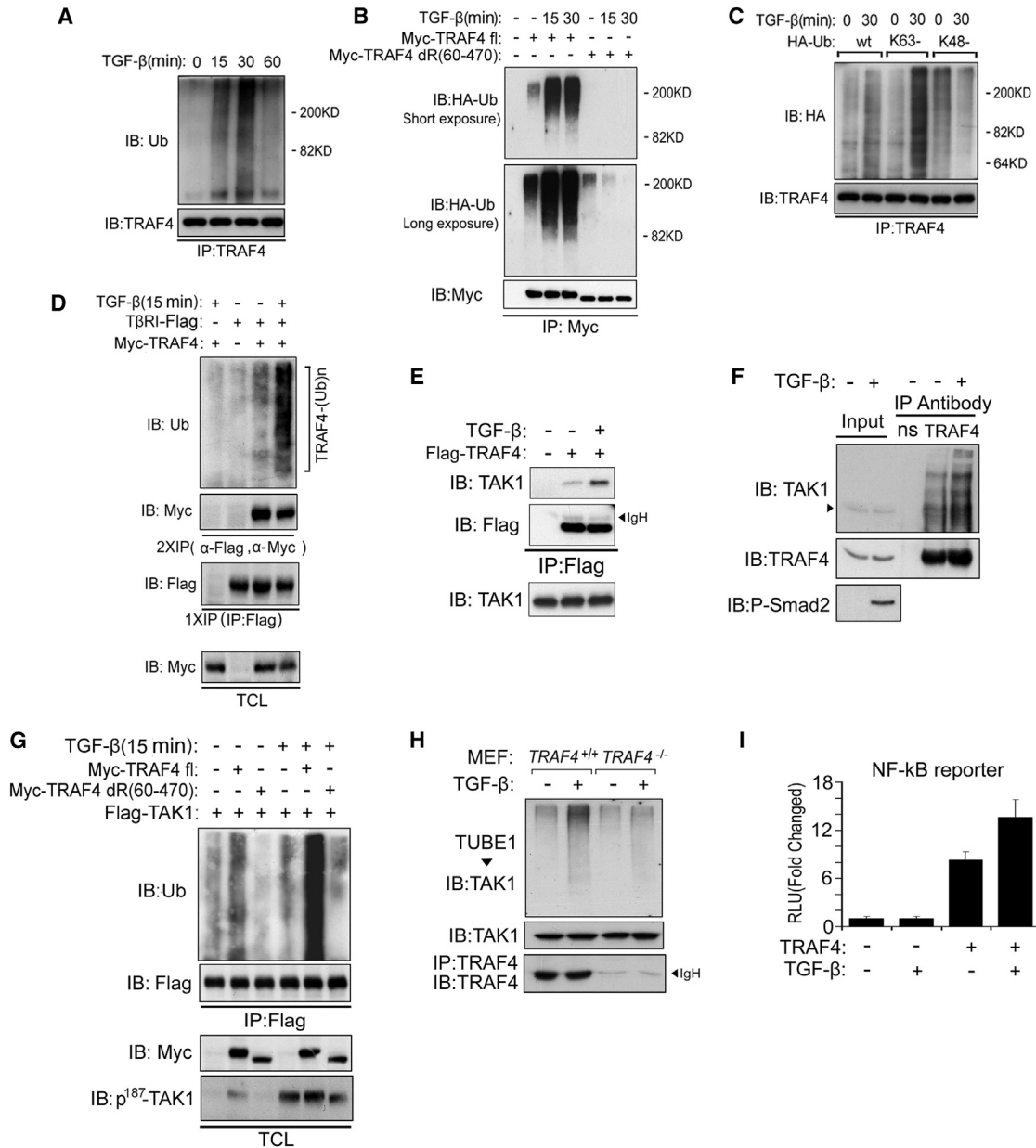


Figure 4. TGF- β Promotes K63 Ubiquitination of TRAF4 and Its Interaction with TAK1

(A) Immunoblot (IB) analysis of whole-cell lysates and immunoprecipitates from MDA-MB-231 cells treated with TGF- β (5 ng/ml) for the indicated lengths of time. (B) IB analysis of total cell lysates (TCL) and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with wild-type TRAF4 (WT) or the TRAF4 Δ RING mutant and treated with TGF- β (5 ng/ml) as indicated. (C) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with wild-type, K63 only, or K48 only ubiquitin (Ub) plasmids and treated with TGF- β (5 ng/ml) as indicated. (D) IB analysis of the TCL and two rounds of immunoprecipitation (first with an anti-Flag antibody and then with an anti-Myc antibody, as indicated) from HEK293T cells transfected with plasmids and treated with TGF- β (5 ng/ml) as indicated. (E) IB analysis of the TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with Flag-TRAF4 and treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 30 min. (F) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 30 min. (G) IB analysis of TCL and immunoprecipitates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids and treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 15 min. (H) IB analysis of TCL and TUBE1 pull-down products from wild-type and *TRAF4*^{-/-} MEFs treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 30 min. (I) NF- κ B reporter activity in HEK293T cells transfected with TRAF4 and treated with or without TGF- β (5 ng/ml) overnight as indicated. The data are presented as the mean \pm SD.

See also Figure S3.

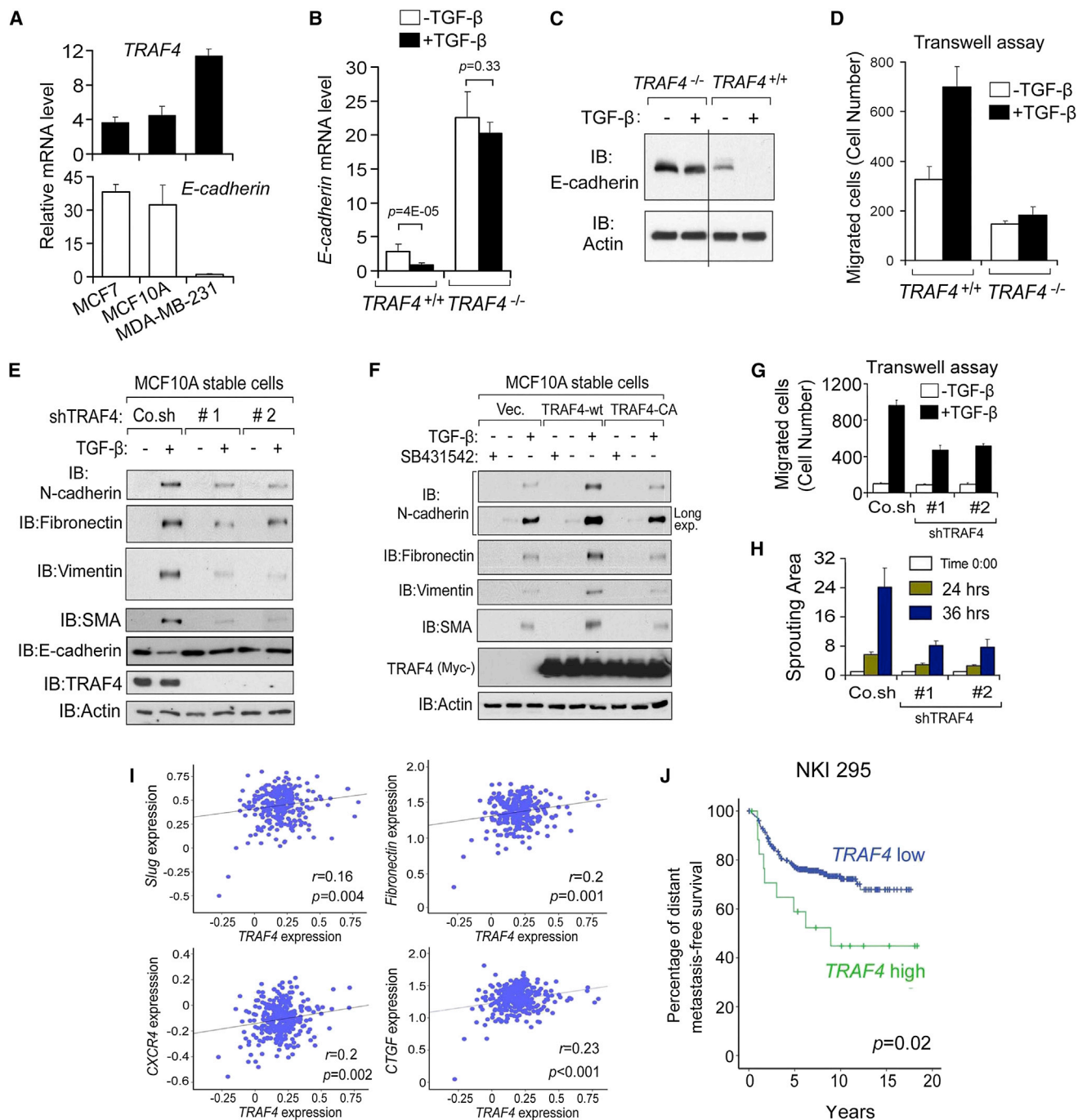


Figure 5. TRAF4 Is Critical for TGF- β -Induced EMT, Cell Migration, and Invasion

(A) qRT-PCR analysis of *TRAF4* and *E-cadherin* levels in different breast cancer cell lines. The data are presented as the mean \pm SD. (B and C) qRT-PCR (B) and immunoblot (IB) (C) analyses of *E-cadherin* expression in wild-type and *TRAF4*^{-/-} MEFs treated with or without TGF- β (5 ng/ml) overnight. The data are presented as the mean \pm SD. (D) Transwell migration assay of wild-type and *TRAF4*^{-/-} MEFs treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 8 hr. Migrated cells were counted in four random fields, and the mean \pm SD was calculated ($p < 0.05$). (E and F) IB analysis of MCF10A-Ras cells stably expressing *TRAF4* WT/CA (F) or depleted of *TRAF4* by two independent shRNAs (E) and treated with SB431542 or TGF- β (5 ng/ml) for 48 hr, as indicated. (G) Transwell migration assay of control and MDA-MB-231 cells stably depleted of *TRAF4* by two independent shRNAs and treated with or without TGF- β (5 ng/ml) for 8 hr. Representative images are shown. Migrated cells were counted from four random fields, and the mean \pm SD was calculated ($p < 0.05$). Representative images are shown in Figure S4B.

(legend continued on next page)

not the CA mutant, had the reverse effect (Figure 5F). In MDA-MB-231 cells, TRAF4 knockdown attenuated TGF- β -induced migration in 2D transwell assays (Figure 5G and Figure S4B) and invasion in 3D spheroid-collagen culture systems (Figure 5H and Figure S4C).

MDA-MB-231 is a highly aggressive human breast cancer cell line, and the metastasis of these cells in a xenograft model is dependent on TGF- β receptor signaling (Kang et al., 2003; Zhang et al., 2012b). Consistent with our cell culture studies, TRAF4 depletion in MDA-MB-231 cells led to impaired SMAD and TAK1 activation in response to TGF- β (Figure S4D). Furthermore, qRT-PCR analysis of MDA-MB-231 cells after shRNA-mediated TRAF4 knockdown indicated that endogenous TRAF4 is required for the efficient induction of metastasis-related TGF- β target genes such as *IL-11*, *CXCR4*, *PTHrP*, and *SNAIL* (Figure S5). Moreover, we observed a weak but significant positive correlation between TRAF4 and EMT markers in breast cancer patients (Figure 5I), in which high TRAF4 expression is associated with poor prognosis of distant metastasis-free survival (Figure 5J).

TRAF4 Depletion Reduces Breast Cancer Metastasis

To examine whether TRAF4 affects invasion and metastasis properties in vivo, we first used a zebrafish xenograft breast cancer model. TRAF4-depleted MDA-MB-231 cells were injected into the ducts of Cuvier 48 hpf and analyzed over 6 days postinjection (dpi). When control cells were injected, 57% of embryos exhibited invasion, whereas knockdown of TRAF4 by two independent shRNAs significantly reduced this amount (Figures 6A and 6B). The number of micrometastases was similarly reduced upon TRAF4 depletion (Figure 6C).

To further validate these data, we repeated this set of xenograft experiments in a mouse model (Kang et al., 2003). Mice that were intracardially injected with control MDA-MB-231 cells began to develop detectable bone metastasis after 4 weeks; the latter 2 weeks of this 4 week period were marked by an expansion of the metastatic area. By contrast, mice injected with TRAF4-depleted cells did not develop any detectable bone metastases after 35 days (Figures 6D–6J). Interestingly, at 42 days, there was one mouse in the TRAF4-depleted group that developed a bone metastasis. We euthanized this mouse, obtained the MDA-MB-231 cells that had metastasized to the bone, and analyzed the TRAF4 expression levels (Figure 6H). The results revealed that this metastatic tumor in the TRAF4-depleted mouse had partially regained TRAF4 expression (Figures 6I and 6J), suggesting that TRAF4 is required for the metastasis of MDA-MB-231 cells to bone. Taken together, these results suggest that TRAF4 regulates TGF- β signaling and modulates EMT, migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells both in vitro and in vivo.

TRAF4 Gene Amplification Correlates with SMAD/TAK1 Activation and Poor Prognosis in Breast Cancer Patients

To determine the clinical relevance of the above findings in advanced human cancers, we first analyzed the TCGA database and found that the *TRAF4* gene is amplified in breast cancer and in other tumor types (Figure 7A and Table S2). A detailed analysis of breast cancer patients revealed that in addition to gene amplification, up to 25% of patients had gained *TRAF4* expression (Figure 7B). *TRAF4* amplification apparently correlates with *ERBB2* amplification (Figure 7C). In a large public clinical microarray database of breast tumors from 2,960 patients (Györfy et al., 2010), we found trends toward bad prognoses for *TRAF4*-high patients and even worse prognoses for both *TRAF4*-high and *HER2*-positive patients (Figure 7D).

In light of our observations, we sought to determine whether TRAF4, p-TAK1, and p-SMAD2 levels were correlated in breast cancers. From primarily surgical resections, we collected 574 patient-derived samples of breast cancer for tissue microarray analysis (Table S3). The analysis of TRAF4, p-SMAD2, and p-TAK1 levels revealed a statistically significant positive correlation between TRAF4 and p-SMAD2 and TRAF4 and p-TAK1 (Figures 7E and 7F and Table S3). In addition, a statistically significant positive association between p-TAK1 and p-SMAD2 was observed (Figure 7G and Table S3). Furthermore, we observed a statistically significant inverse correlation between high TRAF4 levels and a relapse-free period for 20 years (Figure 7H and Table S4). Accordingly, we also observed a statistically significant inverse correlation between p-TAK1 and a relapse-free period for 20 years (Figure 7I and Table S5). These findings confirmed our hypothesis that TRAF4 promotes human breast cancer metastasis by controlling both SMAD-dependent and -independent TGF- β signaling.

DISCUSSION

Anti-TGF- β signaling therapies are efficacious in inhibiting cancer invasion and metastasis in animal models (Hu et al., 2012; Korpál et al., 2009). Importantly, clinical trials of agents that target this pathway have shown promising results (Seoane, 2008). While the TGF- β signaling pathway is considered a therapeutic target in advanced tumors, its role in tumor suppression and its highly multifunctional action make it a very challenging target (Akhurst and Hata, 2012). Current TGF- β signaling inhibitors are used systemically and inhibit all TGF- β responses, thereby conferring a high risk for unwanted on-target side effects. To try to avoid this problem, we performed a functional genetic and proteomic screen for pivotal modulators of TGF- β signaling that may allow for selective targeting of the oncogenic arm of TGF- β receptor signaling. The results of these screens were used in combination with database mining of

(H) TRAF4 depletion inhibits TGF- β -induced invasion of MDA-MB-231 breast cancer spheroid cell cultures in collagen. The data are presented as the mean \pm SD. Co.sh, non-targeting shRNA. Representative images are shown in Figure S4C.

(I) Scatterplot showing the positive correlation between *TRAF4* and *Slug/Fibronectin/CTGF/CXCR4* expression in patients of the NKI295 clinical data set. Pearson's coefficient tests were performed to assess statistical significance.

(J) Kaplan-Meier plots of distant metastasis-free survival of patients stratified by *TRAF4* expression in the NKI295 clinical data set. The p value was calculated by a log rank test.

See also Figures S4 and S5.

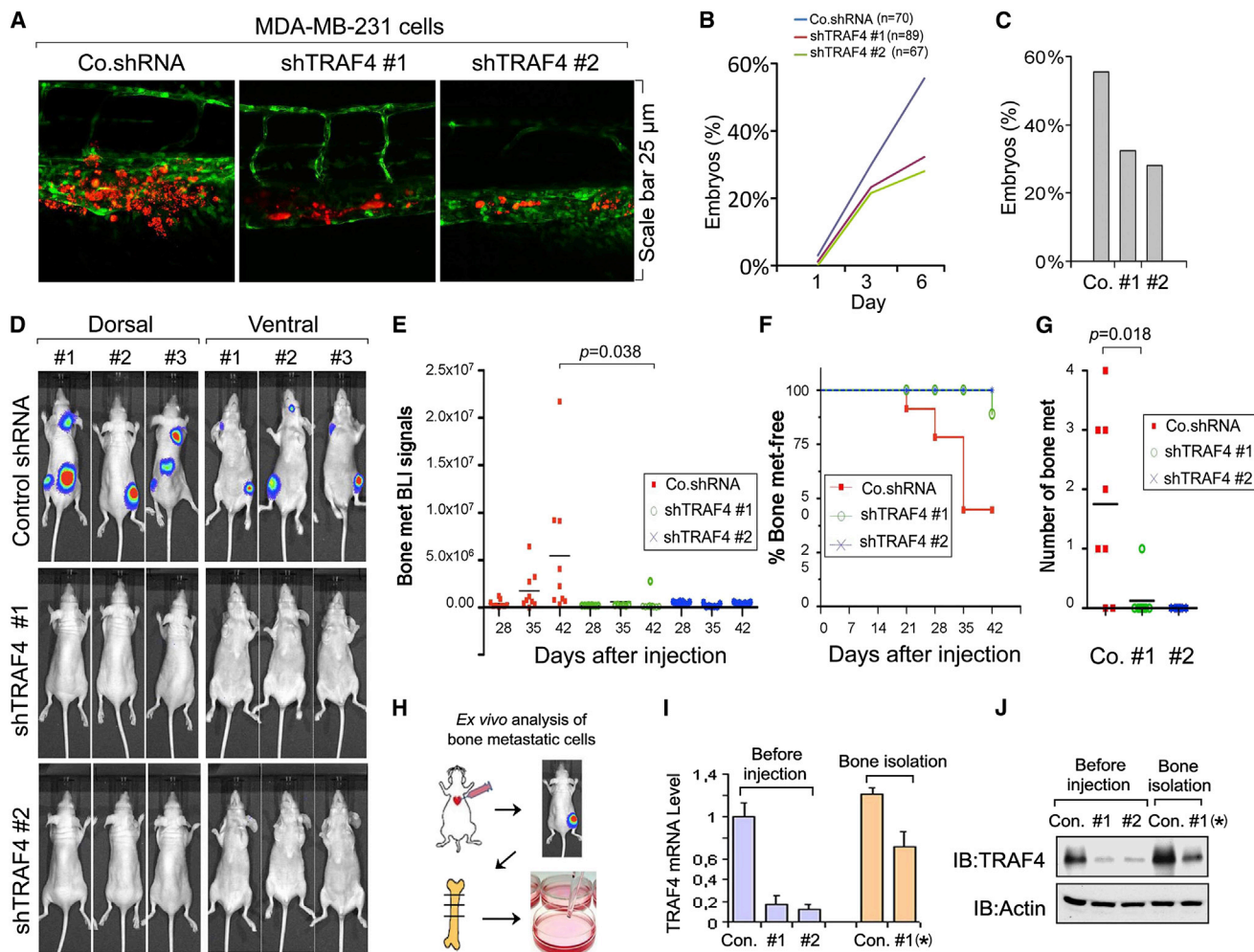


Figure 6. TRAF4 Is Required for Efficient Metastasis In Vivo

(A–C) Control and MDA-MB-231 cells stably depleted of TRAF4 by two independent shRNAs were injected into the blood circulation of 48 hpf zebrafish. Representative images of the zebrafish at 6 dpi are shown (A). Experimental micrometastasis (B) was detected in the posterior tail fin after 6 days. The final percentage of embryos displaying metastasis (C) at 6 dpi is shown. The results of two independent experiments are shown ($p < 0.05$). The numbers (n) of each experimental group are indicated in the figure.

(D–J) Bioluminescent imaging (BLI) of three representative mice from each group at week 6 injected with control or MDA-MB-231 cells stably depleted of TRAF4 by two independent shRNAs. Both ventral and dorsal images are shown (D). Bioluminescent imaging (BLI) signals of each mouse (E) and the percentage of bone metastasis-free mice (F) in each experimental group, followed over time. The number of bone metastasis in each mouse in each experimental group (G).

(H–J) Ex vivo analysis of bone metastatic cells. qRT-PCR analysis (I) and protein levels (J) of TRAF4 expression in control and TRAF4-depleted MDA-MB-231 cells harvested before injection and after bone metastasis. #1(*) is the mouse in the TRAF4-depleted group (shRNA #1) that developed metastasis. The data are presented as the mean \pm SD (I).

inappropriately expressed proteins and genetic alterations in cancer and further functional studies. This led to the identification of TRAF4 as a possible important druggable driver and biomarker for TGF- β -dependent oncogenesis in breast cancer.

TRAF4 was shown to be recruited to the TGF- β receptor complex in a TGF- β -dependent manner, where it antagonizes the inhibitor SMURF2 and facilitates the interaction of the deubiquitinating enzyme USP15 with T β RI. Through these two mechanisms, TRAF4 can sustain membrane-associated T β RI and thereby potentiate TGF- β signaling. TRAF4 binds to SMURF2 and USP15. Both of the latter proteins interact with T β RI via SMAD7 (Eichhorn et al., 2012); by contrast, TRAF4

does not interact with SMAD7, and endogenous SMAD7 seems not required for binding of TRAF4 to T β RI (data not shown). In addition to the SMAD pathway, TRAF4 also potentiates non-SMAD signaling. Upon interaction with T β RI, TRAF4-induced K63-polyubiquitination contributes to the activation of TAK1 as well as of the downstream p38 MAP kinase and NF- κ B cascades.

While TRAF6 has been reported to mediate activation of non-SMAD pathways by TGF- β (Sorrentino et al., 2008; Yamashita et al., 2008), TRAF4 is not likely to act via TRAF6, because these two TRAFs do not interact (data not shown). Moreover, unlike TRAF4, TRAF6 does not regulate membrane receptor levels (data not shown). As TRAF6 deficiency only partially mitigates

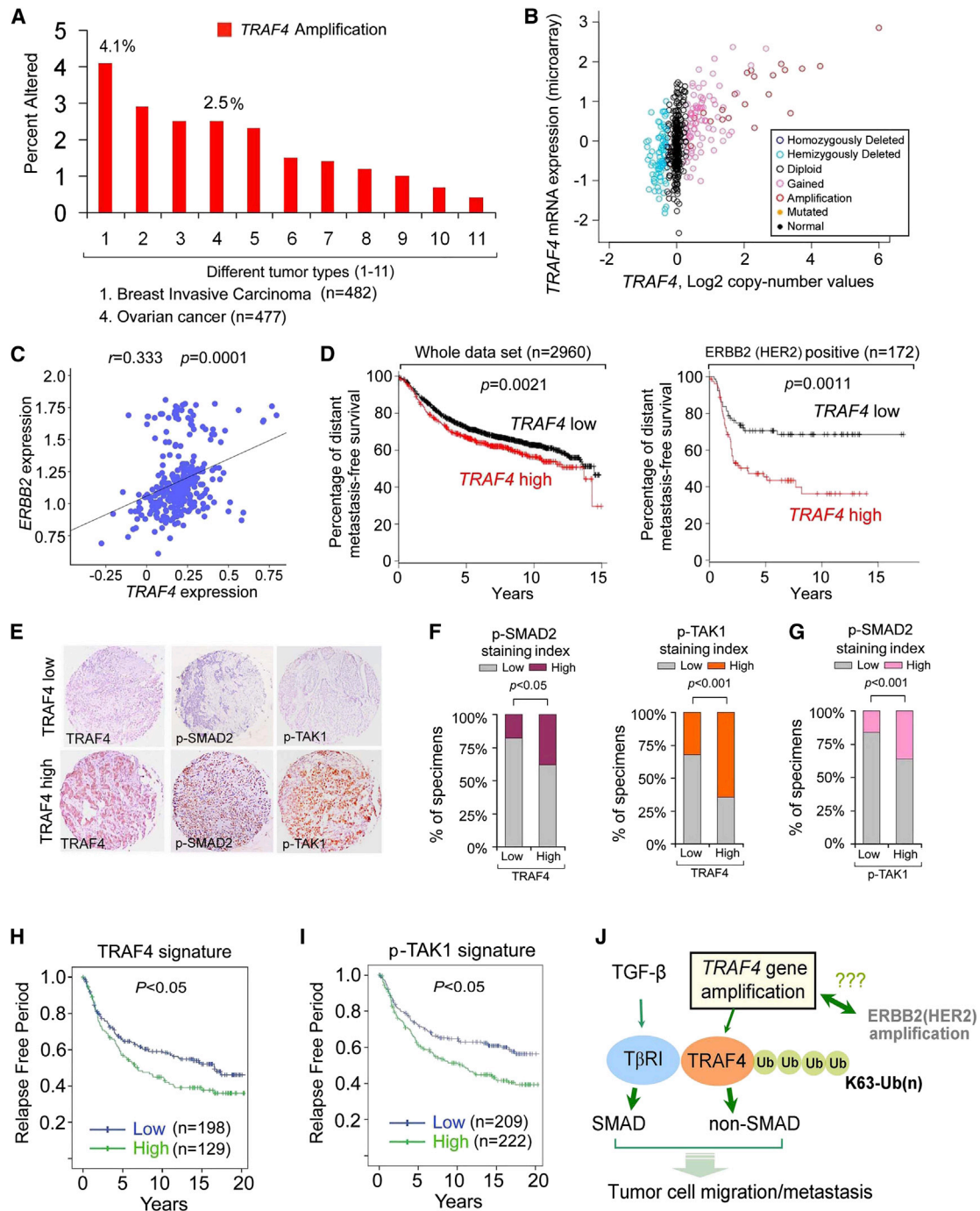


Figure 7. Amplification of the TRAF4 Gene Confers Poor Prognosis in Breast Cancer Patients

(A) Graph showing the number of *TRAF4* amplifications (%) in different tumor types. Data were obtained from the TCGA database. Detailed values are listed in Table S2.

(B) Graph showing the correlation between *TRAF4* gene copy numbers and mRNA expression in human breast cancer patients (n = 825). Data were obtained from the TCGA database.

(C) Scatterplot showing the positive correlation between *TRAF4* and *ERBB2* expression in patients of the NKI295 clinical data set. Pearson's coefficient tests were performed to assess statistical significance.

(D) Kaplan-Meier plots of distant metastasis-free survival of patients, stratified by expression of *TRAF4*. Data obtained from the Kaplan-Meier plotter database. The p value was calculated by a log rank test.

(E) Immunohistochemical analysis of *TRAF4*, p-SMAD2, and p-TAK1 in breast cancer tissue microarrays.

(F) Percentage of specimens displaying low or high *TRAF4* expression compared to the expression levels of p-SMAD2 and p-TAK1.

(legend continued on next page)

non-SMAD signaling (Yamashita et al., 2008), TRAF4 may serve as an alternate, parallel route.

TRAF4 was found to be needed for TGF- β -induced oncogenic effects on breast cancer cells by potentiating T β RI signaling pathways. TGF- β /SMAD activation and induction of SMAD-dependent target genes involved in EMT (e.g., *SNAIL*) and metastasis (e.g., *IL-11*) were strongly downregulated upon TRAF4 depletion in breast cancer cells. This, taken together with previous results showing that SMAD3 and SMAD4 are critical for TGF- β -induced EMT and metastasis of breast cancer cells (Kang et al., 2003), suggests that TRAF4 by potentiating SMAD signaling contributes to TGF- β -induced invasion and metastasis. In addition, interfering with TAK1, p38 MAP kinase, and NF κ B signaling mitigated TGF- β -induced migration of breast cancer cells, thereby also implicating non-SMAD signaling in this response. To explore whether TRAF4 also affects antioncogenic effects of TGF- β , we depleted TRAF4 in HaCaT cells, which are potently growth inhibited by TGF- β . Depletion of endogenous TRAF4 did not significantly affect the cytostatic response of TGF- β (data not shown). As TRAF4 protein levels in HaCaT cells are lower than in (breast) cancer cells, it may play a more critical (pathological) role in TGF- β -induced progression of carcinomas in which its levels are elevated, and that have defects in the TGF- β -induced cytostatic response.

We observed that some breast cancers express aberrantly high concentrations of TRAF4 as a result of *TRAF4* gene amplification and that the gain of TRAF4 expression in patient tissue arrays is correlated with a poor prognosis in individuals with breast cancer. *TRAF4* gene amplification was observed to significantly correlate with ERBB2 (HER2) amplification both in ERBB2 gene copy and average protein abundance (Figures S6A–S6D). In experimental cancer models, ERBB2 and TGF- β receptor signaling have been shown to collaborate with each other in promoting cancer survival and metastasis (Wang, 2011). Importantly, *TRAF4* gene amplification is also found in many other types of cancers, such as bladder urothelial carcinoma and ovarian cancers, suggesting that the oncogenic role of *TRAF4* is not limited to breast cancer. *TRAF4* is amplified in around 2.5% of ovarian tumors (Figure 7A) (Bell et al., 2010); patients with ovarian carcinoma and *TRAF4* gene amplification apparently had shorter lifetimes than those with ovarian cancer without amplification (Figure S7). Moreover, both p-SMAD2 and p-TAK1 levels correlated with the TRAF4 levels in our breast cancer tissue microarray analysis, further corroborating that TRAF4 has an essential role in the control of both SMAD and non-SMAD TGF- β pathways. Furthermore, in both fish and mouse cancer models, TRAF4 expression is closely associated with breast cancer metastasis. Tissue microarrays of samples from over 500 patients with breast cancer as well as clinical data revealed that high TRAF4 and TAK1 expression is correlated with a poor prognosis.

Taken together, our results demonstrate that TRAF4 could be regarded as a biomarker for a subset of breast cancer patients in

which anti-TGF- β therapy might be effective. In addition, TRAF4 itself could be considered a therapeutic target because TRAF4 expression correlates with TGF- β activity and oncogenesis. Because E3 ligases are druggable (Cohen and Tcherpakov, 2010), this study provides options for therapeutic intervention in breast cancer and other advanced tumors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

MEFs from wild-type and *TRAF4*^{-/-} mice were kindly provided by Marie-Christine Rio (IGBMC, Illkirch, France) (Régnier et al., 2002). HEK293T cells, HeLa cervical cancer cells, MCF7, 4T1, MDA-MB-435, HBL-100, MDA-MB-231 breast cancer cells, and MEFs were cultured in DMEM with 10% FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin.

Transcription Reporter Assay

Reporter assays were performed as previously described (Zhang et al., 2012a). Detailed information is given in the Supplemental Experimental Procedures.

Real-Time RT-PCR

Total RNAs were prepared using the NucleoSpin RNA II kit (BIOKÉ, Netherlands). A total of 1 μ g of RNA was reverse transcribed using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Real-time PCR was conducted with SYBR Green (Applied Bioscience) using a StepOne Plus real-time PCR system (Applied Bioscience). All target gene expression levels were normalized to GAPDH. The sequences of primers are listed in the Supplemental Experimental Procedures.

Tandem Affinity Purification and Yeast Two-Hybrid System

TAP-tagged SMURF2 was used for affinity purification. Details are described in the Supplemental Experimental Procedures. The yeast two-hybrid screen system was purchased from Clontech. Yeast two-hybrid verification was performed according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemical Staining and Evaluation

Primary antibodies to phosphorylated SMAD2 (1:100; Cell Signaling 3108), TRAF4 (1:200; H-72, sc-10776, Santa Cruz Biotechnology), and phosphorylated-TAK1 (Thr187) (1:100; #4536, Cell Signaling) were used for immunohistochemical staining. Detailed information is described in the Supplemental Experimental Procedures.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with a two-tailed unpaired t test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Details are listed in the Supplemental Experimental Procedures.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures, five tables, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.014>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Maarten van Dinther and Midory Thorikay for technical assistance, Doug Sellinger for initial data analysis, and Hans van Dam for critical reading of the manuscript. We are grateful to Joost Schimmel for purification of recombinant proteins. We are grateful to Martijn Rabelink for shRNA constructs. We thank Fabien Alpy, Kenneth K. Iwata, Stefano Piccolo, Jeffrey

(G) Percentage of specimens displaying low or high p-TAK1 expression compared to the expression level of p-SMAD2.

(H and I) Kaplan-Meier curves showing that the relapse free period of individuals is inversely correlated with TRAF4 (H) or p-TAK1 (I) expression by a log rank test.

(J) Working model of TRAF4-mediated regulation of TGF- β -induced cancer cell migration and metastasis.

See also Figures S6 and S7 and Tables S2, S3, S4, and S5.

L. Wrana, and Hongrui Wang for reagents. This work was supported by a Netherlands Organization of Scientific Research grant (MW-NWO 918.66.606), Cancer Genomics Centre Netherlands, and the Centre for Biomedical Genetics. This work was supported in part by Key Construction Program of the National "985" Project and Zhejiang University Special Fund for Fundamental Research, as well as the Fundamental Research Funds for the Central Universities. L.H., A.B., K.-A.S., C.M., and C.X.L. are employed by Novartis Institutes for Biomedical Research.

Received: April 8, 2013

Revised: June 27, 2013

Accepted: July 9, 2013

Published: August 22, 2013

REFERENCES

- Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 790–811.
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* *307*, 1621–1625.
- Bell, D., Berchuck, A., Birrer, M., Chien, J., Cramer, D., Dao, F., Dhir, R., DiSaia, P., Gabra, H., Glenn, P., et al. (2010). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* *474*, 609–615.
- Bonome, T., Levine, D.A., Shih, J., Randonovich, M., Pise-Masison, C.A., Bogomolny, F., Ozbun, L., Brady, J., Barrett, J.C., Boyd, J., and Birrer, M.J. (2008). A gene signature predicting for survival in suboptimally debulked patients with ovarian cancer. *Cancer Res.* *68*, 5478–5486.
- Camilleri-Broët, S., Cremer, I., Marmey, B., Comperat, E., Vigié, F., Audouin, J., Rio, M.C., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., and Régnier, C.H. (2007). TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* *26*, 142–147.
- Chiang, A.C., and Massagué, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N. Engl. J. Med.* *359*, 2814–2823.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., and Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* *115*, 679–688.
- Cohen, P., and Tcherpakov, M. (2010). Will the ubiquitin system furnish as many drug targets as protein kinases? *Cell* *143*, 686–693.
- Eichhorn, P.J., Rodón, L., González-Juncà, A., Dirac, A., Gili, M., Martínez-Sáez, E., Aura, C., Barba, I., Peg, V., Prat, A., et al. (2012). USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* *18*, 429–435.
- Feng, X.H., and Derynck, R. (1996). Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) β signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF- β receptors. *J. Biol. Chem.* *271*, 13123–13129.
- Ginos, M.A., Page, G.P., Michalowicz, B.S., Patel, K.J., Volker, S.E., Pambuccian, S.E., Ondrey, F.G., Adams, G.L., and Gaffney, P.M. (2004). Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* *64*, 55–63.
- Glück, S., Ross, J.S., Royce, M., McKenna, E.F., Jr., Perou, C.M., Avisar, E., and Wu, L. (2012). TP53 genomics predict higher clinical and pathologic tumor response in operable early-stage breast cancer treated with docetaxel-capecitabine \pm trastuzumab. *Breast Cancer Res. Treat.* *132*, 781–791.
- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A.C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., and Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res. Treat.* *123*, 725–731.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., and Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* *89*, 1165–1173.
- Heldin, C.H., Landström, M., and Moustakas, A. (2009). Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 166–176.
- Hu, Z., Zhang, Z., Guise, T., and Seth, P. (2012). Systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing soluble transforming growth factor- β receptor II-Fc fusion protein can inhibit breast cancer bone metastasis in a mouse model. *Hum. Gene Ther.* *21*, 1623–1629.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 415–424.
- Kalkan, T., Iwasaki, Y., Park, C.Y., and Thomsen, G.H. (2009). Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor- β signaling that affects neural crest formation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3436–3450.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* *3*, 537–549.
- Kang, J.S., Liu, C., and Derynck, R. (2009). New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. *Trends Cell Biol.* *19*, 385–394.
- Kavak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol. Cell* *6*, 1365–1375.
- Kedinger, V., and Rio, M.C. (2007). TRAF4, the unique family member. *Adv. Exp. Med. Biol.* *597*, 60–71.
- Korpala, M., Yan, J., Lu, X., Xu, S., Lerit, D.A., and Kang, Y. (2009). Imaging transforming growth factor- β signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nat. Med.* *15*, 960–966.
- Li, S., Lu, K., Wang, J., An, L., Yang, G., Chen, H., Cui, Y., Yin, X., Xie, P., Xing, G., et al. (2010). Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biochem.* *338*, 11–17.
- Massagué, J. (2008). TGF β in cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Miyazono, K. (1997). TGF- β receptors and signal transduction. *Int. J. Hematol.* *65*, 97–104.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2009). The regulation of TGF β signal transduction. *Development* *136*, 3699–3714.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., and ten Dijke, P. (1997). Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* *389*, 631–635.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res.* *19*, 89–102.
- Régnier, C.H., Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Chenard, M.P., Wendling, C., Basset, P., and Rio, M.C. (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* *270*, 25715–25721.
- Régnier, C.H., Masson, R., Kedinger, V., Textoris, J., Stoll, I., Chenard, M.P., Dierich, A., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2002). Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 5585–5590.
- Seoane, J. (2008). The TGF β pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin. Transl. Oncol.* *10*, 14–19.
- Shiels, H., Li, X., Schumacker, P.T., Maltepe, E., Padrid, P.A., Sperling, A., Thompson, C.B., and Lindsten, T. (2000). TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am. J. Pathol.* *157*, 679–688.
- Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.L., and Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* *27*, 431–432.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.H., and Landström, M. (2008). The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1199–1207.

- Wang, S.E. (2011). The functional crosstalk between HER2 tyrosine kinase and TGF- β signaling in breast cancer malignancy. *J. Signal Transduct.* 2011, 804236.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346–351.
- Wang, X., Jin, C., Tang, Y., Tang, L.Y., and Zhang, Y.E. (2013). Ubiquitination of tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4) by Smad ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf1) regulates motility of breast epithelial and cancer cells. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Wiesner, S., Ogunjimi, A.A., Wang, H.R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J.L., and Forman-Kay, J.D. (2007). Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* 130, 651–662.
- Xia, Z.P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461, 114–119.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β . *Mol. Cell* 31, 918–924.
- Zhang, L., Huang, H., Zhou, F., Schimmel, J., Pardo, C.G., Zhang, T., Barakat, T.S., Sheppard, K.A., Mickanin, C., Porter, J.A., et al. (2012a). RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation. *Mol. Cell* 46, 650–661.
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B.E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K.A., Porter, J.A., Lu, C.X., and ten Dijke, P. (2012b). USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. *Nat. Cell Biol.* 14, 717–726.

Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4) est une nouvelle protéine interagissant avec les phosphoinositides, impliquée dans la polarité et la migration cellulaire

Résumé

TRAF4 est un gène fréquemment surexprimé dans les carcinomes suggérant qu'il y joue un rôle. Tandis que la protéine TRAF4 est majoritairement localisée dans les jonctions serrées (JS) des cellules épithéliales mammaires (CEM) normales, elle s'accumule dans le cytoplasme des CEM malignes. Dans cette étude, nous montrons que TRAF4 possède un nouveau domaine liant les phosphoinositides (PIP) et que ce dernier est requis pour son recrutement aux JS. Des analyses moléculaires et structurales ont montré que le domaine TRAF de TRAF4 forme un trimère pouvant lier jusqu'à trois molécules de lipides grâce à des résidus basiques présents à la surface. Des études cellulaires indiquent que TRAF4 régule négativement les JS et augmente la migration cellulaire. Ces deux fonctions sont dépendantes de sa capacité à lier les PIPs. Notre travail suggère que la surexpression de TRAF4 pourrait contribuer à la progression des cancers du sein en déstabilisant les JS et en favorisant la migration cellulaire.

Mots-clés : TRAF4, Jonction serrée, Phosphoinositide, Cancer, Polarité, Migration, cellule épithéliale.

Summary

TRAF4 (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4) is frequently overexpressed in carcinomas suggesting a specific role in cancer. While TRAF4 protein is predominantly found at tight junctions (TJ) in normal mammary epithelial cells (MEC), it accumulates in the cytoplasm of malignant MEC. How TRAF4 is recruited and functions at TJ is unclear. Here we show that TRAF4 possesses a novel phosphoinositide (PIP)-binding domain crucial for its recruitment to TJ. Molecular and structural analyses revealed that the TRAF domain of TRAF4 exists as a trimer which binds up to 3 lipids using basic residues exposed at its surface. Cellular studies indicated that TRAF4 acts a negative regulator of TJ and increases cell migration. These functions are dependent from its ability to interact with PIPs. Our results suggest that TRAF4 overexpression might contribute to breast cancer progression by destabilizing TJ and favoring cell migration.

Keywords: TRAF4, Tight junction, Phosphoinositide, Cancer, Polarity, Migration, epithelial cell.