



HAL
open science

Mécanismes du transfert intercellulaire des homéoprotéines

Thibault Lin

► **To cite this version:**

Thibault Lin. Mécanismes du transfert intercellulaire des homéoprotéines. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066346 . tel-01264533

HAL Id: tel-01264533

<https://theses.hal.science/tel-01264533>

Submitted on 29 Jan 2016

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.

UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ECOLE DOCTORALE COMPLEXITÉ DU VIVANT

CENTRE INTERDISCIPLINAIRE DE RECHERCHE EN BIOLOGIE



Mécanismes du transfert intercellulaire des homéoprotéines.

Par Thibault LIN

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Dirigée par Alain JOLIOT

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2015

Devant un jury composé de :

P ^r Alain TREMBLEAU	Président
D ^r Evelyne BLOCH-GALLEGRO	Rapportrice
D ^r Bruno BEAUMELLE	Rapporteur
D ^r Fabienne BURLINA	Examinatrice

Remerciements

En premier lieu, je suis extrêmement reconnaissant envers le Professeur A. TREMBLEAU de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement les Docteurs E. BLOCH-GALLEGO et B. BEAUMELLE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que d'avoir consacré de leur temps à l'examen de mon travail.

Mes plus sincères remerciements sont également adressés au Docteur F. BURLINA pour sa présence au sein de ce jury.

Bien entendu, je remercie infiniment A. JOLIOT sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Tout d'abord pour l'opportunité qu'il m'a offerte de pouvoir réaliser ces travaux de doctorat mais aussi pour son implication sans faille dans ceux-ci. Ensuite pour son enthousiasme et sa persévérance qui ont su mettre en déroute mon pessimisme naturel. Enfin pour ses grandes qualités scientifiques au premier rang desquelles son honnêteté intellectuelle fait pour moi figure d'exemple. Pour l'ensemble de ces raisons, ces cinq années passées sous sa direction resteront pour moi un excellent souvenir. Merci, tout simplement !

Tous ces moments passés au laboratoire n'auraient pas été les mêmes sans la rencontre de nombreuses personnes que je tenais à remercier :

Edmond pour ton aide, nos innombrables discussions scientifiques ou non, les litres de café ingurgités en ta compagnie, et surtout pour ta bonne humeur légendaire. Travailler quotidiennement à tes côtés a été un réel plaisir.

Valérie pour avoir supporté, non sans mal, ma compagnie parfois peu loquace ainsi que pour ton aide.

Julie et Lorenzo pour m'avoir guidé lors de mon arrivée dans le laboratoire et transmis leur savoir-faire.

L'intégralité des membres de notre équipe nouvellement formée : Sophie, Christine, Carole, Francesca, Marion ainsi que Michel. Merci pour vos conseils avisés, le regard nouveau que vous avez porté sur mes travaux, et ces réunions de labo que bon nombre nous envie.

Vincent pour avoir supporté mes bruyantes sessions de FACS et pour ta gentillesse.

Anabelle, Anne-Cécile, Clémence, Clémentine, Damien, François-Xavier, Hoccine, Jessica, Karen et Raoul pour tous les bons moments passés en vos compagnies que ce soit autour de la machine à café ou sur les chaises usées du Zig-zag.

L'ensemble des membres des équipes GIAUME et ROUACH.

Je tiens également à saluer chaleureusement l'ensemble des membres de l'équipe PROCHIANTZ : Ariel, Chantal, Colette, Eliane, Francine, Julia, Joshua, Ken, Navy, Olivia, Patricia et Rajiv.

Enfin, je tenais à remercier mes amis Dylan, Jimmy, Korentin, Lucas et Michaël qui bien que faisant face la plupart du temps à des réponses laconiques de ma part, n'ont cessé de s'enquérir de l'état d'avancement de mes travaux tout au long de ces années de thèse.

Pour finir, je remercierai mes parents, mes sœurs, Christophe, Philippe et Valentin pour tout le reste (et ça en fait des choses!).

Table des matières

Table des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	x
I Introduction	1
1 La théorie cellulaire, à la base de la biologie cellulaire moderne.	2
1.1 Genèse de la théorie cellulaire : De HOOKE à SCHWANN et SCHLEI- DEN.	2
1.2 Théorie cellulaire moderne : <i>omnis cellula e cellula</i>	3
1.3 La cellule comme unité fondamentale du vivant.	4
2 De la cellule à l'organisme, morphogenèse et homéoprotéines.	5
2.1 Organismes pluricellulaires et morphogenèse.	5
2.2 Transformations homéotiques : observations et naissance du concept.	6
2.3 Du phénotype aux gènes, description des premiers gènes homéo- tiques.	6
2.4 L' <i>homeobox</i> , séquence commune aux gènes homéotiques.	7
2.5 Structure et fonction de l'homéodomaine : l'homéoprotéine comme facteur de transcription.	9
2.5.1 Structure protéique de l'homéodomaine.	9
2.5.2 Sites de liaisons à l'ADN.	9
2.5.3 Fonction physiologique.	10
3 Homéoprotéines, facteurs de transcription aux propriétés re- marquables.	11
3.1 Internalisation d'ANTENNAPEDIA, premier indice d'un trans- fert intercellulaire des homéoprotéines.	11
3.2 L'homéodomaine comme élément central de cette internalisation.	12
3.3 Sécrétion des homéoprotéines : le cas ENGRAILED-2.	13
3.3.1 Brefs rappels des fonctions d'ENGRAILED.	13
3.3.2 Mise en évidence et mécanismes connus de la sécrétion d'ENGRAILED-2.	14
3.4 Une capacité de transfert intrinsèque aux homéoprotéines.	15

4 Bases cellulaires du transfert intercellulaire et conséquences fonctionnelles.	18
4.1 La sécrétion à la base de la communication cellulaire.	18
4.1.1 La voie reticulum endoplasmique / appareil de Golgi / vésicules de sécrétion : mode de sécrétion canonique. . . .	19
4.1.2 En opposition à la voie canonique, les modes de sécrétion non-conventionnels.	23
4.1.3 Une classification arbitraire et non figée.	30
4.2 Après la sécrétion : différents mode d'intégration du signal transmis.	30
4.2.1 Les différentes voies endocytiques.	31
4.2.2 Détournement des voies endocytiques.	34
4.3 Implications physiologiques du transfert intercellulaire des homéoprotéines.	37
4.3.1 Action paracrine de l'homéoprotéine OTX2.	37
4.3.2 Action paracrine de l'homéoprotéine ENGRAILED. . . .	38
4.3.3 Autres modèles d'action paracrine.	39
4.3.4 Action paracrine des homéoprotéines et pathologies. . . .	40
II Matériels et méthodes	43
III Résultats	49
5 Etude comparée de la sécrétion du FGF2 et d'EN-2.	51
5.1 Propriétés communes.	51
5.2 Méthode de quantification de la sécrétion.	53
5.3 Altérations de la sécrétion après traitement à la néomycine. . . .	53
6 Les phosphoinositides.	58
6.1 Brefs rappels des fonctions et rôles connus des phosphoinositides.	58
6.2 Mise en évidence d'une interaction directe entre EN-2 et phosphoinositides.	60
6.2.1 Interaction avec des bicouches lipidiques artificielles. . . .	60
6.2.2 Interaction directe <i>in vitro</i>	61
6.3 Localisation subcellulaire et phosphoinositides.	63
6.4 Rôle des PI(4,5)P ₂ dans la sécrétion d'EN-2 et du FGF2 : approche sub-cellulaire.	63
6.4.1 Présentation des outils utilisés.	66
6.4.2 Validation biologique des constructions mises au point. . .	66
6.4.3 Analyse de la sécrétion de EN-2 et du FGF2.	67
6.5 Rôle des PI(4,5)P ₂ dans l'internalisation d'EN-2.	70
6.5.1 Technique utilisée pour l'observation de l'internalisation. .	70
6.5.2 Un lien entre PI(4,5)P ₂ membranaires et internalisation d'EN-2.	72
7 Les protéoglycanes.	76
7.1 Présentation des protéoglycanes.	76
7.2 Importance des protéoglycanes de surface dans l'internalisation d'EN-2.	77

7.2.1	Lien entre expression de protéoglycanes fonctionnels et internalisation d'EN-2.	77
7.2.2	L'expression de <i>syndecans</i> favorise l'accumulation d'EN-2 à la surface des cellules.	77
7.3	Impact de l'expression de <i>syndecans</i> sur la sécrétion d'EN-2.	79
8	Implication d'une nouvelle séquence dans le transfert intercellulaire d'EN-2.	82
8.1	Un nouveau rôle pour l'hexapeptide?	82
8.2	Article n° 1; Contrôle de la segmentation du cerveau en développement par le transfert paracrine d'Engrailed : une nouvelle fonction du domaine d'interaction avec Pbx.	85
IV	Discussion	87
9.1	Rôle des PI(4,5)P ₂ dans le transfert intercellulaire de EN-2.	88
9.2	Rôle des protéoglycanes dans le transfert intercellulaire de EN-2.	89
9.3	Interactions hydrophobes et électrostatiques, un équilibre subtil?	89
	Bibliographie	94
	Annexes	113

Table des figures

1	Le mutant <i>bithorax</i>	8
2	Structure de l'homéodomaine	8
3	Domaines conservés de la protéine ENGRAILED	17
4	La voie de sécrétion classique.	20
5	Rôle des protéines SNAREs dans la fusion membranaire.	21
6	Les différentes protéines SNAREs impliquées dans les voies endocytiques et de sécrétion chez les mammifères.	22
7	Les principales voies endocytiques.	34
8	Modèle de régulation par OTX2 de la plasticité du cortex visuel.	38
9	Marquage fluorescent de la protéine EN-2 purifiée.	47
10	Effet de la relocalisation cytoplasmique du FGF2 sur sa sécrétion.	52
11	Visualisation d'EN-2 et du FGF2 à la surface des cellules.	54
12	Quantification de la sécrétion par cytométrie en flux.	55
13	Effet de la néomycine sur la sécrétion d'EN-2 et du FGF2.	57
14	Interaction directe entre EN-2 et le PI(4,5)P ₂ <i>in vitro</i>	62
15	La relocalisation cytosolique de EN-2 entraîne une diminution de sa sécrétion.	64
16	Effet de la néomycine sur l'association de EN-2 avec les membranes cellulaires.	65
17	Localisations intracellulaires de domaines protéiques interagissant avec le PI(4,5)P ₂	68
18	Localisation et activité enzymatique d'OCRL et nlsOCRL.	69
19	Influence de l'expression de OCRL et PHPLC sur la sécrétion de EN-2 et du FGF2.	71
20	Visualisation de l'internalisation d'EN-2.	73
21	La protéine EN-2 internalisée colocalise partiellement avec la <i>Caveolin-1</i>	74
22	Influences de la néomycine et d'OCRL sur l'internalisation d'EN-2.	75
23	Les différentes classes de glycosaminoglycanes.	78
24	La présence de GAGs à la surface cellulaire est requise pour l'internalisation de EN-2.	78
25	L'expression des SDC-1 et SDC-2 favorise l'accumulation de EN-2 extracellulaire à la surface des cellules.	80

26	L'expression des SDC-1 et SDC-2 n'influence pas directement le processus de sécrétion de EN-2.	81
27	Influence du pH sur la charge théorique globale de EN-2.	92
28	Le pH extracellulaire modifie l'internalisation de EN-2.	93

Liste des tableaux

1	Les différentes grandes voies endocytiques.	35
2	Localisations et fonctions des phosphoinositides.	59
3	Interaction directe entre EN-2 et les phosphoinositides	64

Liste des abréviations

4E-BP1	<i>eIF4E binding protein 1</i>
<i>Antp</i>	Gène <i>Antennapedia</i>
<i>bpag-1</i>	Gène de <i>Bullous pemphigoid antigen 1</i>
<i>bx</i> ⁺	Gène <i>bithorax</i>
<i>bx</i> ^d	Gène <i>bithoraxoid</i>
<i>fgf8</i>	Gène de <i>fibroblast growth factor 8</i>
<i>ftz</i>	Gène <i>fushi tarazu</i>
<i>iab-2</i> ⁺	Gène <i>infra-abdominal-2</i>
<i>iab-3</i> ⁺	Gène <i>infra-abdominal-3</i>
<i>iab-5</i> ⁺	Gène <i>infra-abdominal-5</i>
<i>iab-8</i> ⁺	Gène <i>infra-abdominal-8</i>
<i>map-1b</i>	Gène de <i>Microtubule-associated protein 1B</i>
<i>Ubx</i> ⁺	Gène <i>Ultrabithorax</i>
ABC1	Transporteur <i>ATP Binding Cassette 1</i>
ADN	Acide desoxyribonucléique
ANT-C	Complexe polygénique <i>Antennapedia</i>
ANTP	Protéine <i>Antennapedia</i>
ANTP-HD	Homéodomaine d' <i>Antennapedia</i>
ANX2	Annexine 2
AP-2	<i>Adaptator Protein 2</i>
Ape1	<i>Vacuolar aminopeptidase 1</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARF1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
Atg8/9	<i>Autophagy related protein 8/9</i>
ATP	Adénosine triphosphate

BAR	<i>Bin-Amphiphysin-Rvs</i>
BCD	Protéine Bicoïd
BFA	Bréfeldine A
BX-C	Complexe polygénique Bithorax
CCP	<i>Clathrin-Coated Pits</i>
CDC42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CK2	Caséine kinase 2
CLIC	<i>Clathrin-independant carrier</i>
CNF1	<i>Cytotoxic necrotizing factor 1</i>
COPI / II	<i>Coat protein complex I / II</i>
CTxB	Sous-unité B de la toxine cholérique
CUPS	<i>Compartment for unconventional protein secretion</i>
Cx26 / 30	Connexine 26 / 30
DAT	<i>Sodium-dependent dopamine transporter</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Dpp	<i>Decapentaplegic protein</i>
EDC	Endocytose dépendante de la clathrine
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylène glycol tétra-acétique
EH-1	<i>Engrailed homology domain 1</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMX1/2	<i>Empty spiracles-like protein 1/2</i>
EN	Protéine Engrailed
EN-1	Protéine Engrailed-1
EN-2	Protéine Engrailed-2
EndoH	Endoglycosidase H
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EXD	<i>Homeobox protein extradenticle</i>
FGF1 / 2	<i>Fibroblast Growth Factor1 / 2</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FTZ	Protéine Fushi Tarazu

GABA	Acide γ -aminobutyrique
GEEC	<i>GPI-AP-enriched early endosomal compartment</i>
GRAF-1	<i>GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1</i>
GRASP	<i>Golgi reassembly stack protein</i>
Grh1	<i>GRASP65 homolog protein 1</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HOM-C	Complexe polygénique homéotique
HSC70	<i>Heat shock cognate 70 kDa protein 1</i>
HSP70	<i>70 kDa Heat shock protein</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HSPG	<i>Heparan-sulfate proteoglycan</i>
IL-1 β	Interleukine 1 β
kDa	kiloDalton
KN-1	Protéine Knotted-1
MAT α 1/ α 2	<i>Mating-type protein α1/α2</i>
MIF	<i>Macrophage migration Inhibition Factor</i>
MMP-14	<i>Matrix metalloproteinase-14</i>
mTOR	<i>mammalian Target of rapamycin</i>
MVB	<i>Multi-vesicular body</i>
NKX3.1	<i>Homeobox protein NK-3 homolog A</i>
OPC	Précurseur d'oligodendrocyte
OTX2	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
P2X7	<i>P2X purinoceptor 7</i>
p40Syn1	Fragment protéolytique de 40 kDa de la synaptogamine 1
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAX6	<i>Paired box protein 6</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBX1	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Exotoxine A de <i>Pseudomonas</i>
Pep12	<i>Carboxypeptidase Y-deficient protein 12</i>
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate

PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
PI(4)P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI(5)P	Phosphatidylinositol 5-phosphate
PINCH	<i>Particularly interesting new Cys-His protein 1</i>
PMT	Toxine de <i>Pasteurella multodica</i>
PNN	<i>Perineuronal net</i>
PRD	Protéine Paired
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PV	Parvalbumine
PVDF	Poly(fluorure de vinylidène)
RAB1a	<i>Ras-related protein Rab-1A</i>
RAB2	textitRas-related protein Rab-2
RAB8a	<i>Ras-related protein Rab-8A</i>
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RGC	Neurone ganglionnaire de la rétine
RhoA	<i>Transforming protein RhoA</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
SDS	Dodécysulfate de sodium
SK1	Sphingosine kinase 1
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SRD	<i>Serin-rich domain</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
STxB	Sous-unité B de la Shiga toxine
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCTP	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
Tlg1	<i>T-SNARE affecting a late Golgi compartment protein 1</i>
tTG / TG2	tissueTransglutaminase / Transglutaminase 2
VAX1	<i>Ventral anterior homeobox 1</i>

Première partie

Introduction

Chapitre 1

La théorie cellulaire, à la base de la biologie cellulaire moderne.

Un des enjeux majeurs de la biologie a été de comprendre ce qui différencie matière vivante et inerte. En ce sens, l'établissement de la théorie cellulaire a engendré un changement de conception du vivant, en mettant en avant une structuration microscopique propre au monde vivant. Les travaux entrepris au cours de cette thèse se centrant autour de l'étude du comportement de protéines à l'échelle cellulaire, il me semble important de rappeler brièvement comment a émergé la notion, qui nous est aujourd'hui familière, de cellule.

1.1 Genèse de la théorie cellulaire : De HOOKE à SCHWANN et SCHLEIDEN.

La naissance du concept de cellule est étroitement liée aux premières observations de la structure de la matière vivante au niveau microscopique. Ainsi, la conception des premiers outils permettant de telles observations a constitué l'étape de départ à l'élaboration de la théorie cellulaire. On attribue à Antoni VON LEEUWENHOEK (1632-1723) la paternité des premiers microscopes modernes, qu'il utilisera pour observer des particules microscopiques mouvantes¹. En 1676, dans une lettre adressée à la *Royal Society* [1], il détaille de nombreuses observations effectuées sur de l'eau de diverses origines (pluie, mer, neige...) dans laquelle il décrit la présence de très nombreux « *animalcula* » de tailles minuscules et de formes variables. Il est ainsi un des premiers à mettre en avant la structuration à l'échelle microscopique du vivant (et par la même occasion à offrir la première description de protozoaires). Bien qu'il soit également à l'origine de la description des globules rouges du sang, il n'établira pas lui-même de principe de structuration global du vivant à l'échelle microscopique. La naissance d'un tel principe est plutôt à aller chercher du côté des travaux de Robert HOOKE (1635-1702). Lui aussi précurseur dans le domaine de la microscopie, il

1. Qu'il considérera comme vivantes du fait de leur capacité à se mouvoir.

est le premier à introduire le terme de cellule², en 1665 dans *Micrographia*, pour décrire l'organisation en petites unités répétées d'une tranche liège. Bien qu'il n'utilise pas ce terme avec le sens qu'on lui donne aujourd'hui³, son utilisation future provient directement de cet ouvrage. En 1831, Robert BROWN observe et nomme pour la première fois le noyau cellulaire dans des cellules épidermiques d'orchidées. Il évoque « *a single circular areola, generally somewhat more opaque than the membrane of the cell [...]* This areola, or nucleus of the cell as perhaps it might be termed, is not confined to the epidermis, being also found [...] in many cases in the parenchyma or internal cells of the tissue » [2]. En décrivant la présence d'une structure récurrente au sein des cellules d'une plante, il est un des premiers à apercevoir l'organisation d'un organisme en terme de constituants cellulaires et plus seulement en termes d'organes et de tissus. Bien qu'il y ait débat sur la question⁴, on attribue généralement la formulation de la théorie cellulaire à Matthias Jakob SCHLEIDEN (1804-1881) et Theodor SCHWANN (1810-1882). En 1838, le premier propose que chaque élément constituant d'une plante est lui même composé de cellules ou de produits de celles-ci [4]. L'année suivante, SCHWANN propose à son tour que tous les tissus, quels qu'ils soient, sont composés de cellules, et que le développement de tout organisme passe nécessairement par la formation de cellules [5]. Les bases de la théorie cellulaire sont ainsi clairement établies, à savoir que *i*) tous les organismes vivants sont constitués de cellules et que *ii*) la cellule est l'unité de structure et de fonction fondamentale du vivant. Restent cependant en suspend plusieurs interrogations comme celle de l'origine des cellules, ou bien encore de leur ultrastructure.

1.2 Théorie cellulaire moderne : *omnis cellula e cellula.*

SCHLEIDEN propose une théorie selon laquelle les cellules se forment par un processus de cristallisation progressif autour d'un noyau dans la substance intracellulaire. C'est en s'opposant à cette hypothèse que Robert REMARK (1815-1865), Rudolf VIRCHOW (1821-1902) et Albert KÖLLIKER (1817-1905) vont ajouter un nouveau principe fondamental à la théorie cellulaire, à savoir que toute cellule provient obligatoirement d'une cellule pré-existante, illustré par VIRCHOW et la locution latine *omnis cellula e cellula*⁵. La cellule, qui est d'abord vue comme un « sac », délimité par une membrane, contenant une substance visqueuse (le « protoplasme ») dans lequel flotte un noyau, va très vite être l'objet de nombreuses études visant à en comprendre la structure. Les progrès importants en microscopie de la fin du XIX^e siècle (objectifs à immersion et apparition de nouvelles techniques de fixation / coloration) vont engendrer de nombreuses découvertes : l'observation de la chromatine lors de la division cellulaire (par Walther FLEMMING) en 1882, le reticulum endoplasmique (par Charles GARNIER) en 1897, la mitochondrie (par Carl BENDA) ou encore l'appareil de Golgi

2. Du latin *Cella* « petite pièce » et de son dérivé *Cellulæ* utilisé à l'époque pour décrire les alcôves des ruches.

3. Il décrit ces cellules comme des canaux permettant la circulation de liquides dans la plante.

4. Dès 1824, Henri DUTROCHET affirme que « tout, en effet, dérive évidemment de la cellule dans le tissu organique des végétaux, et l'observation vient de nous prouver qu'il en est de même chez les animaux. » [3]

5. Formule que l'on doit à François-Vincent RASPAIL (1794-1878).

(par Camillo GOLGI) en 1898. FLEMMING est également à l'origine de la description de la mitose et de ses différentes phases, et note la séparation longitudinale de structures filamenteuses nucléaires (nommées « chromosomes » par Heinrich Wilhelm WALDEYER en 1888) qu'il suggère comme étant équitablement réparties entre les deux cellules filles [6]. Les neurones⁶, resteront longtemps à l'écart de la théorie cellulaire, du fait de la difficulté à les observer. Ils seront longtemps considérés comme un immense réseau syncytial. L'accumulation d'observations de neurones individualisés (notamment par Santiago Ramón y CAJAL) permis l'émergence de la théorie du neurone, qui n'est autre que l'application de la théorie cellulaire aux neurones. Il faudra attendre l'observation de la synapse grâce à la microscopie électronique dans les années 1970 pour valider définitivement la théorie du neurone, et permettre ainsi l'avènement complet de la théorie cellulaire, formulée près de 150 ans plus tôt.

1.3 La cellule comme unité fondamentale du vivant.

La conceptualisation de l'organisation du vivant découlant de la théorie cellulaire, et surtout dans le cas des organismes pluricellulaires, en une somme de briques élémentaires de même origine soulève ainsi de nombreuses interrogations, une des principales étant de savoir si et comment les organismes s'autostructurent. L'organisme n'est donc plus seulement un assemblage de tissus et d'organes mais une communauté de clones cellulaires, puisque tous descendants de la même cellule œuf, qui se sont/ont été organisés et différenciés pour former un organisme fonctionnel. En outre, l'extrême reproductibilité de ce processus implique qu'il n'est pas la résultante du hasard mais de mécanismes robustes.

6. Terme que l'on doit aussi à Wilhelm WALDEYER.

Chapitre 2

De la cellule à l'organisme, morphogenèse et homéoprotéines.

2.1 Organismes pluricellulaires et morphogenèse.

Déjà mise à mal par la théorie cellulaire, la théorie préformiste va connaître un coup d'arrêt avec les travaux de H. DRIESCH [7], en 1894, qui montrent que jusqu'au stade 8-cellules, chaque blastomère isolé de l'embryon d'oursin est capable de donner un oursin complet. Chaque cellule contient donc toutes les informations nécessaires à la formation d'un organisme complet (épigenèse). Cependant DRIESCH estime qu'à l'heure où il avance ces idées, la connaissance que l'on a des lois physico-chimiques ne permet pas de comprendre l'auto-structuration du vivant. Une des premières tentatives visant à expliquer ces processus nous est fournie par A. TURING en 1952 [8]. Dans *The chemical basis of Morphogenesis*, il va poser un des problèmes centraux de la biologie de l'époque, le lien entre morphologie et information génétique. TURING part du principe que les gènes peuvent être vu comme des catalyseurs qui influencent l'anatomie d'un organisme en modulant la vitesse/rendement des réactions qu'ils catalysent. Il introduit ensuite la notion de morphogène comme : « *chemical substances, called morphogens, reacting together and diffusing through a tissue* ». Il propose qu'initialement ces morphogènes soient uniformément distribués puis que via des interactions entre eux ils se répartissent en patrons organisés spatialement. Ensuite, ces morphogènes distribués de manière non-homogène dans le tissu vont activer des réactions chimiques (par l'intermédiaire de l'activation de gènes) qui donneront à ce tissu sa forme finale/attendue/développée. Tout en notant le côté novateur de ce modèle, C.H. WADDINGTON émettra quelques réserves sur la théorie de TURING⁷, notamment que ce modèle ne permet pas d'expliquer comment est régulée la taille finale des organismes ni comment apparaissent au sein de l'embryon un nombre fini d'organes et de tissus (sans états intermédiaires). Peu à peu, ces mécanismes d'auto-structuration lors du développement ne vont plus être appréhendés d'un point de vu purement spatial (espace phy-

7. Dans une lettre qu'il lui adressera.

sique) mais comme des relations entre des réseaux génétiques dans des états donnés. En 1969, L. WOLPERT introduit le concept d'information positionnelle [9] et son célèbre « *French Flag model* » qui permet d'expliquer l'apparition de structures distinctes (comme les bandes bleues, blanches et rouges du drapeau français) au sein d'un espace donné, et ce peu importe la taille effective de cet espace physique. En 1972, A. GIERER et H. MEINHARDT proposeront un modèle assez proche de celui de TURING mais tenant compte des aspects moléculaires et cellulaires à la base des phénomènes observés [10]. Cependant, ces modèles se heurtent à une limitation majeure, celle de ne pas connaître la nature moléculaire de leurs acteurs. C'est grâce à l'observation d'anomalies développementales qu'une partie des gènes à la base de la morphogenèse vont pouvoir être identifiés.

2.2 Transformations homéotiques : observations et naissance du concept.

William BATESON⁸ décrit pour la première fois, en 1894, des cas d'animaux dont une partie du corps a été remplacée par une autre (abeilles avec des pattes à la place des antennes, des écrevisses avec des oviductes supplémentaires, ou encore des cas de polydactylie, ou un nombre de côtes anormal chez l'Homme). Il nomme ce phénomène « *homeosis* » et caractérise ce genre de transformation par l'adjectif « *homéotique* » [11]. En 1915, Calvin B. BRIDGES décrit le premier cas d'un mutant homéotique chez la drosophile (qui s'avérera être le modèle de choix pour la découverte des gènes homéotiques). Ce mutant, qu'il nomme *bithorax* (*bx*), présente un troisième segment thoracique converti en second segment thoracique, et donne donc une mouche dont les haltères sont remplacées par une paire d'ailes. BRIDGES, qui « cartographie » la mutation *bx*, est le premier à établir un lien entre transformation homéotique et une mutation donnée [12]. Cependant, les mécanismes à l'œuvre derrière ces modifications du plan d'organisation restent non élucidés.

2.3 Du phénotype aux gènes, description des premiers gènes homéotiques.

En 1971, J. H. POSTLEHWAIT et H. A. SCHNEIDERMAN [13] décrivent la morphogenèse de l'antenne chez le mutant *antennapedia* de la drosophile, où les antennes sont remplacées par des pattes. Ils proposent que les transformations homéotiques proviennent d'un dérèglement de gènes de contrôle entraînant les cellules d'un programme développemental à un autre (ici de l'antenne vers la patte). C'est avec les travaux de E. B. LEWIS, qu'il résume en 1978 [14], que le premier lien direct entre un complexe génique et le développement d'une partie d'un organisme est établi. Il montre que le complexe polygénique *bithorax* (*BX-C*), localisé sur le chromosome 3, est responsable de la segmentation thoracique et abdominale de l'embryon de drosophile, via la modulation de l'état de répression des 8 gènes qui le compose (*bx*⁺, *pbx*⁺, *Ubx*⁺, *bx_d*⁺, *iab-2*⁺, *iab-3*⁺, *iab-5*⁺,

8. A qui on doit également l'introduction publique, en 1905, du terme « *génétique* », du grec *gennō*, γεννώ (« donner naissance »), utilisé en tant que nom pour désigner l'étude de l'hérédité et de la variation inter-individu.

iab-8⁺). Enfin il suggère qu'il existe une colinéarité entre l'expression antéro-postérieure et la situation proximo-distale de chaque gène au sein de BX-C. Un autre complexe de gènes homéotiques, le complexe Antennapedia (ANT-C), est décrit peu de temps après BX-C [15]. Des mutations au sein de ce complexe altèrent le développement de la partie antérieure (prothorax, proboscis, antennes, yeux) de l'embryon de drosophile. Dans les deux cas, il est proposé que c'est l'expression / répression combinatoire de l'ensemble des gènes de ces deux complexes qui permet aux différentes parties de l'embryon d'acquérir une identité positionnelle le long de l'axe antéro-postérieur de la larve. Du fait de la similarité d'organisation et de la relative proximité chromosomique de BX-C et ANT-C, les auteurs reprennent une hypothèse déjà formulée par E. B. LEWIS, suggérant une origine évolutive commune à ces deux complexes avec l'existence d'un probable complexe homéotique ancestral. La description chez le scarabée *Tribolium castaneum* d'un seul et unique complexe homéotique (HOM-C) regroupant les fonctions de ANT-C et BX-C [16] va confirmer cette idée. Par la suite, un tel complexe va être identifié dans la totalité des *phyla* bilatériens métazoaires. Chez les vertébrés, ce complexe HOM-C est retrouvé, à de rares exceptions près, en quatre exemplaires (désignés HOXA à HOXD) localisés sur des chromosomes différents. A eux quatre ils comportent 39 paralogues des gènes d'ANT-C et de BX-C. Néanmoins cette conservation de la structure des complexes multigéniques homéotiques n'est, semble-t-il, qu'apparente, au vu des grandes disparités (tailles des régions intergéniques, orientations transcriptionnelles des membres du complexe, insertion ou non de gènes non-homéotiques, morcellement plus ou moins prononcé) existant dans l'organisation des complexes homéotiques dans les différentes lignées métazoaires [17]. Enfin, bien que l'identification des gènes homéotiques soient intimement liée à la découverte de ces complexes multigéniques, il est fondamental de noter que bon nombre des gènes homéotiques se situent en dehors de ces complexes, au niveau de régions diverses et variées du génomes (voir pour exemple [18]).

2.4 L'*homeobox*, séquence commune aux gènes homéotiques.

Le clonage des premiers gènes homéotiques [20, 21, 22, 23] représente une étape majeure dans la compréhension de leur structure et de leur fonctionnement. C'est en 1984 que les premiers travaux faisant état d'une séquence propre aux gènes homéotiques sont publiés. W. MCGINNIS et al. [24] sont les premiers à montrer une similarité de séquence entre différents gènes de BX-C et ANT-C en hybridant des sondes d'ADNc correspondant à diverses portions des gènes *Antennapedia* (*Antp*) et *fushi tarazu* (*ftz*) et de de l'ADN génomique. Ils découvrent ainsi qu'il existe une forte homologie de séquence entre les régions 3' de *Antp* et *ftz*, le « *H repeat* », et que ce *H repeat* se retrouve à d'autres endroits du génome de la drosophile, et notamment au niveau de BX-C, mais aussi de nouveaux *loci* présentant des caractéristiques compatibles avec une fonction homéotique (restriction spatiale stricte des transcrits au cours de l'embryogenèse, localisation cytogénétique au niveau de gènes homéotiques déjà décrits). Les auteurs en déduisent qu'il existe une séquence commune aux *loci* homéotiques, qu'ils nomment *homeobox*. Très vite, des *loci* contenant des *homeobox* sont trou-

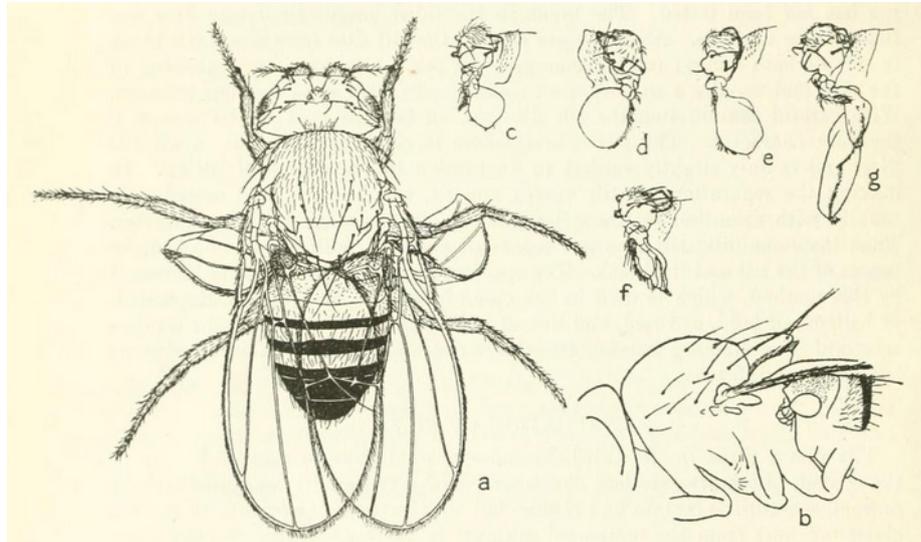


FIGURE 1 – Le mutant *bithorax* de *Drosophila melanogaster* tel qu'illustré par C. B. BRIDGES en 1923 dans *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster* [12].

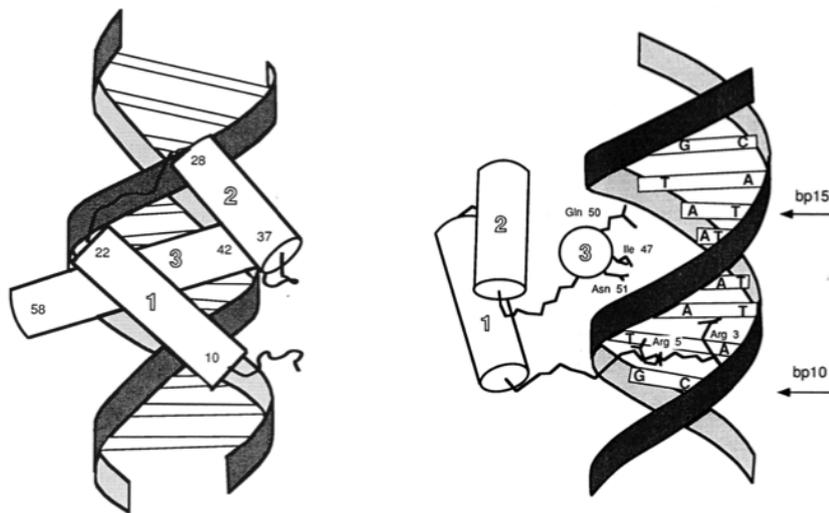


FIGURE 2 – Représentations schématiques de l'homéodomaine d'EN interagissant avec un duplex d'ADN. Tiré de [19].

vés chez le xénope [25], chez la souris [26, 27] ou chez l'Homme [28]. L'*homeobox* est donc une séquence conservée chez les métazoaires suggérant ainsi des mécanismes communs lors du développement. Dès la découverte de l'*homeobox*, la communauté scientifique à chercher à connaître la fonction de cette séquence. En alignant les produits protéiques potentiels des régions d'homologie entre les gènes *Antp*, *Ubx* et *ftz* M. P. SCOTT et al. [29] montre que la conservation de l'*homeobox* se retrouve potentiellement au niveau protéique, et qu'une homologie de séquence existe même avec des facteurs de régulation de conjugaison MAT $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la levure [30]. De part la forte présence de résidus basiques au sein de la séquence de ce domaine protéique putatif, qui est nommé homéodomaine [31], l'hypothèse que ce soit un motif de liaison à l'ADN est très vite formulée.

2.5 Structure et fonction de l'homéodomaine : l'homéoprotéine comme facteur de transcription.

2.5.1 Structure protéique de l'homéodomaine.

Avant même de connaître la structure de l'homéodomaine, le rôle de régulateur transcriptionnel du produit des gènes homéotiques a été étudié. L'auto-amplification du gène *ftz* via fixation de son produit sur une de ses propres régions activatrices va être montrée [32], et ensuite des travaux effectués *in vitro* vont illustrer les rôles à la fois d'activateurs et de répresseurs de la transcription des produits de nombreux gènes homéotiques [33, 34, 35, 36, 37]. Ensuite, c'est la structure même de l'homéodomaine qui va être élucidée, d'abord seul dans le cas d'ANTENNAPEPIA (ANTP) [38], puis interagissant avec un duplex d'ADN dans le cas d'ENGRAILED (EN)[19]. Il s'agit d'un domaine protéique d'une soixantaine d'acides aminés organisés en trois hélices α . Le contact entre l'homéodomaine et ADN se fait via l'insertion de la troisième hélice α , ou hélice de reconnaissance, dans le grand sillon de l'ADN, et également via le domaine N-terminal qui va interagir avec le petit sillon de la double hélice d'ADN. De manière intéressante, l'homéodomaine isolé garde sa capacité à se lier à l'ADN [39]. Déjà évoquée [29], l'homologie de structure entre l'homéodomaine et des facteurs de conjugaison de la levure est confirmée expérimentalement [40]. Par la suite, une classification des protéines à homéodomaine, ou homéoprotéines, a été proposée sur la base de la présence de séquences conservées, autres que l'homéodomaine [41, 18].

2.5.2 Sites de liaisons à l'ADN.

Les séquences précises d'ADN reconnues par les homéoprotéines on ensuite été identifiées [42, 43, 44]. Il est ainsi apparu que ces sites de liaison étaient très proches, une séquence consensus contenant la « boîte » ATTA pouvant même être établie (citation). Ceci peut s'expliquer par la conservation très importante des résidus de la troisième hélice α entre les différentes homéoprotéines [41, 18]. L'existence d'une telle séquence consensus pose cependant question quant à la spécificité de la liaison entre ADN et homéoprotéines, celles-ci ayant toutes la capacité, à peu de choses près, de se fixer sur les mêmes séquences

génomiques. Plusieurs éléments ont été apportés afin de tenter de comprendre d'où provenait la spécificité de fonction de chaque homéoprotéine. Un premier élément de réponse est la présence au sein de la troisième hélice de l'homéodomaine d'un résidu qui lorsqu'il est muté modifie la spécificité de liaison de l'homéoprotéine PAIRED (PRD) vers les séquences reconnues habituellement par FUSHI TARAZU (FTZ) ou BICOÏD (BCD) [45], suggérant que les résidus non-conservés de l'hélice de reconnaissance puissent être à la base d'une certaine sélectivité. Un autre élément fondamental à prendre en compte est la capacité des homéoprotéines à se multimériser (homo-, hétéro-dimères, trimères). Cette multimérisation induit de nombreux changements dans les propriétés des homéoprotéines comme la modification de la spécificité de liaison à des séquences d'ADN, une interversion entre les fonctions activateur et répresseur au niveau d'un site donné, ou encore une modification de la localisation sub-cellulaire (voir [46] pour revue). Enfin, il est également proposé que la partie N-terminale de l'homéodomaine, également en contact avec l'ADN, puisse aussi être à l'origine d'une certaine sélectivité de fixation à des séquences données.

2.5.3 Fonction physiologique.

Au cours du développement embryonnaire, les différentes homéoprotéines sont exprimées selon des patrons d'expression très bien définis, que ce soit spatialement ou temporellement. L'expression combinatoire de ces protéines assure la mise en place du plan d'organisation de l'organisme, en conférant aux cellules une identité positionnelle précise. Etant donnée leur capacité à réguler la transcription, une association donnée d'homéoprotéines va ainsi entraîner la mise en place de l'expression d'un répertoire de gènes donnés qui, à terme, conduira à la différenciation de la cellule, et permettra la formation d'un tissu fonctionnel. Leur implication au niveau de la morphogenèse a lieu à différents niveaux. Ainsi l'expression régionalisée des membres des complexes ANT-C, BX-C ou HOXs va permettre la mise en place des axes antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon. Les homéoprotéines ne sont pas seulement des protéines polarisantes lors du développement, mais elles sont également à la base de la formation de structures morphologiques distinctes suivant leurs domaines d'expression en regard de ces mêmes axes. De par la grande diversité d'homéoprotéines recensées⁹, le nombre potentiellement très important de leurs gènes cibles¹⁰, ainsi que la régulation complexe de leur activité de facteur de transcription (voir §3.3.1), il est difficile de dresser un état des lieux exhaustif de l'implication des homéoprotéines dans le développement. Cette complexité peut être illustrée dans le cas du développement de la rétine, où environ 25 homéoprotéines différentes sont requises pour la formation d'une rétine parfaitement fonctionnelle [48].

Historiquement, l'étude de la fonction des homéoprotéines a donc été centrée sur la compréhension de leur action en tant que facteurs de transcription nucléaires. L'observation plus précise du comportement de ces homéoprotéines à l'échelle cellulaire et non plus seulement à l'échelle de l'organisme, a cependant permis d'envisager un mode d'action nouveau pour celles-ci.

9. Selon la base de donnée UnitProtKB, rien que chez l'Homme, on dénombre près de 250 entrées vérifiées correspondant à des protéines contenant un homéodomaine.

10. Plus de 200 sites de liaisons génomiques ont été référencés pour EN [47].

Chapitre 3

Homéoprotéines, facteurs de transcription aux propriétés remarquables.

Dans un premier temps, les homéoprotéines sont donc décrites comme une famille de facteurs de transcription à l'action cellulaire-autonome. Leur action est donc vue comme restreinte à la cellule dans laquelle elles sont exprimées. Il est également admis que leur mode d'action ne passe que par la modulation de la transcription de gènes cibles. Des travaux menés par le groupe d'A. PROCHIANTZ vont cependant mettre la lumière sur des propriétés cellulaires insoupçonnées de ces homéoprotéines, ouvrant la voie à un possible rôle nouveau de cette famille protéique.

3.1 Internalisation d'ANTENNAPEDIA, premier indice d'un transfert intercellulaire des homéoprotéines.

Une première indication quant à un rôle dépassant le cadre du facteur de transcription pour les homéoprotéines va être apportée par A. JOLIOT et al. [49]. Le but de cette étude était de comprendre l'implication des homéogènes dans la morphogenèse cellulaire, et notamment dans le cas des neurones pour lesquels morphologie et fonction sont étroitement liés. Dans ce but, les auteurs ont tiré avantage de la capacité de l'homéodomaine isolé à conserver sa spécificité de liaison à l'ADN [39], pour s'en servir comme d'un inhibiteur compétitif¹¹ pour la fixation sur les sites génomiques des protéines homéotiques endogènes aux neurones. Ainsi, l'introduction artificielle de l'homéodomaine purifié d'ANTP (ANTP-HD) dans des neurones embryonnaires en culture entraîne une modification nette de leur morphologie. De manière beaucoup plus inattendue, cette étude montre également que lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture, ANTP-HD est capable de pénétrer à l'intérieur des neurones et de s'accumuler au sein

11. L'homéodomaine seul étant dépourvu des séquences trans-activatrices nécessaires à la régulation de la transcription.

du noyau. Dans ce second cas, une modification morphologique des neurones est aussi observée. Ces résultats impliquent donc : *i*) ANTP-HD est capable de pénétrer dans des neurones en franchissant des membranes biologiques intactes, *ii*) ANTP-HD conserve une activité biologique après son internalisation (qui passe effectivement par sa liaison à l'ADN [50]). Ces observations sont à la base d'un champs d'étude nouveau, l'observation des propriétés cellulaires des homéoprotéines, et notamment l'étude de leur éventuelle fonction non-cellulaire-autonome directe, comme nous allons le voir par la suite.

3.2 L'homéodomaine comme élément central de cette internalisation.

L'internalisation de ANTP-HD a lieu à 37°C comme à 4°C, suggérant qu'elle se base au moins en partie sur des mécanismes énergie-indépendants (à l'inverse de l'endocytose classique qui nécessite une hydrolyse d'ATP). Après son internalisation, ANTP-HD est retrouvé intact dans les cellules et n'est pas dirigé vers les compartiments de dégradation. Une région précise de l'homéodomaine, correspondant à la troisième hélice α , est nécessaire et suffisante pour son internalisation [51]. Au sein de cette séquence de 16 acides aminés, un doublet d'acides aminés aromatiques WF a une importance primordiale car lorsque ces deux résidus sont délétés, l'internalisation de l'homéodomaine est drastiquement réduite [50]. La capture de cette troisième hélice α , nommée *Penetratin*, par les cellules ne dépend pas d'un récepteur chiral de surface. En effet, des peptides composés de D-énantiomères ou dont la séquence a été inversée sont eux aussi internalisés aussi efficacement que le peptide « sauvage » à 4°C et 37°C [52], et la *Penetratin* est capable de se transloquer au travers de vésicules lipidiques artificielles dans certains modèles expérimentaux [53]. La structuration en hélice α de la *Penetratin* n'est pas un élément clé de ce processus, l'insertion de prolines en son sein n'empêchant pas son internalisation [52]. Sachant que la troisième hélice est la partie la plus conservée de l'homéodomaine parmi toutes les homéoprotéines, on peut s'attendre à ce que la capacité d'internalisation ne soit pas une capacité propre à ANTP mais commune à d'autres protéines de cette famille. Que ce soit dans le cas d'homéodomains seuls ou de protéines entières, on retrouve effectivement cette propriété chez d'autres homéoprotéines comme HOX5A [54], ENGRAILED-2 (EN-2) [55], HOXC8, HOXB4, EMX1, EMX2, OTX2 ou PAX6 [56]. Comme c'est le cas pour la *Penetratin*, le tryptophane en position 48 de l'homéodomaine est également très important pour l'internalisation de l'homéodomaine seul [50] ou de l'homéoprotéine entière [55]. Ceci suggère donc que certains des mécanismes à la base de l'internalisation sont similaires entre *Penetratin*, homéodomaine et homéoprotéines entières. Sur la base de travaux biophysiques, il est proposé que la *Penetratin* puisse traverser les membranes biologiques via la formation de structures lipidiques intermédiaires de type micelles inversées [57]. Plus récemment, un nouveau mécanisme impliquant une courbure de la membrane plasmique conduisant à des invaginations mimant un processus d'endocytose classique même en absence d'ATP a été proposé [58]. Persistent cependant de nombreuses zones d'ombre dans la compréhension de cette internalisation, et notamment en ce qui concerne les homéoprotéines entières.

La découverte de la capacité commune aux homéoprotéines d'être internalisées par des cellules vivantes a conduit à ne plus considérer cette famille protéique qu'uniquement comme une famille de facteurs de transcription au rôle cellulaire-autonome strict mais aussi comme des protéines à activité paracrine. Seul écueil à cette hypothèse, aucune homéoprotéine ne possède de peptide signal de sécrétion, le prérequis classique pour cette activité, la sécrétion de l'homéoprotéine devant alors être due à des mécanismes non décrits jusqu'alors.

3.3 Sécrétion des homéoprotéines : le cas ENGRAILED-2.

La capacité pour les homéoprotéines d'être transférées entre cellules va être démontrée par des travaux sur la protéine ENGRAILED (EN).

3.3.1 Brefs rappels des fonctions d'ENGRAILED.

Cette homéoprotéine, caractérisée chez la drosophile, joue de nombreux rôles durant le développement, en définissant par exemple les domaines postérieurs de chaque parasegment de l'embryon [59, 60], ou bien encore de l'aile [61]. Chez les vertébrés, on trouve deux gènes *Engrailed*, *En1* et *En2*. Les protéines EN-1 et EN-2 correspondantes possèdent des patrons d'expression assez similaires, se distinguant surtout par leur expression temporelle, durant le développement embryonnaire. On les retrouve ainsi exprimées dans le neuroépithélium antérieur à partir du stade 1 (EN-1) ou au stade 4-5 somites (EN-2), puis au niveau de la région mésencéphale/métencéphale en formation. EN-1 est également retrouvé transitoirement dans de nombreux autres domaines de l'embryon tels que la peau, la partie ventrale des bourgeons des membres ou encore certains neurones de la moelle épinière [62, 63]. Collectivement, EN-1 et EN-2 régulent la formation de la frontière entre diencéphale et mésencéphale [64], ainsi que la mise en place de l'axe rostro-caudal du tectum visuel [65]. Enfin, ces deux protéines sont également exprimées au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale. Leur expression n'est pas requise pour la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones dopaminergiques mais est essentielle pour la survie de ces derniers au cours du développement ainsi qu'à l'âge adulte [66].

D'un point de vue moléculaire EN a été initialement décrit comme un étant un répresseur transcriptionnel [67]. *In vivo*, l'activité de répresseur transcriptionnel actif d'EN est liée à la protéine GROUCHO ou ses orthologues chez les vertébrés, les protéines de la famille TLE (*Transducin-like Enhancer of Split*). L'interaction entre EN et son co-répresseur GROUCHO/TLEs, via le domaine EH1 d'EN, est une étape importante dans l'établissement d'une répression transcriptionnelle [68]. D'autres partenaires protéiques de EN, tels que les co-facteurs EXD/PBX, modulent son activité transcriptionnelle. L'interaction entre EN et PBX-1 ou son homologue chez la drosophile EXD, est en effet responsable d'un basculement du rôle de répresseur vers celui d'activateur de la transcription [69]. Ce changement dans l'activité d'EN peut s'expliquer par le fait que l'interaction avec EXD/PBX-1 entraîne une modification des sites spécifiques d'ADN reconnus par EN [70, 71, 72, 73]. La formation d'hétérodimères entre EN et

EXD/PBX-1 repose sur la présence d'un domaine conservée au sein de la protéine EN, l'hexapeptide, qui se situe juste en amont de l'homéodomaine [74]. Bien que beaucoup de cibles génomiques potentielles d'EN aient été identifiées [47], l'activité transcriptionnelle effective d'EN au niveau de ces sites n'a pu être vérifiée que dans un nombre restreint de cas. On pourra ainsi citer les gènes de la *β -tubuline 3* [75], du *fgf8* [69], de *map-1b* [76], de *bpag-1* [77] ou de *polyhomeotic* [78] dont l'expression dépend d'une régulation directe par EN. Dans les exemples précédents, EN a un rôle d'activateur dans les cas des gènes *polyhomeotic*, *fgf8* et *map-1b* (*ex vivo*).

3.3.2 Mise en évidence et mécanismes connus de la sécrétion d'ENGRAILED-2.

L'observation d'une localisation non-nucléaire, et plus précisément l'association des protéines EN-1 et EN-2 avec des compartiments membranaires *in vivo*, dans des tissus nerveux embryonnaires de rat et *ex vivo*, dans des cellules COS-7 exprimant un EN-2 de poulet, a été le premier indice concernant une sécrétion de ces protéines [80]. Plus précisément, une partie du EN-2 endogène est associée à des vésicules de faible densité non-solubilisées par le TritonX-100, enrichies en glycosphingolipides et en cholestérol. Les protéines EN-2 et *Caveolin-1* co-exprimées dans les cellules COS colocalisent dans des vésicules présentant les caractéristiques des cavéoles (absence de manteau de clathrine, taille réduite). Dans ce même article, les auteurs montrent également qu'une partie de la fraction de EN-2 associée à ce compartiment membranaire est protégée de l'action de la protéinase K, suggérant que la protéine a en partie accès au compartiment luminal de ces vésicules. L'ensemble de ces résultats démontre qu'une partie de l'EN-2 intracellulaire a accès un compartiment subcellulaire vésiculaire *a priori* compatible avec des mécanismes de sécrétion. La mise en évidence du transfert intercellulaire de EN-2, et donc implicitement de sa sécrétion, a été réalisée en utilisant un système de co-culture entre des cellules COS-7 exprimant la protéine EN-2 et des neurones ne l'exprimant pas. Après fixation et immunomarquage, la protéine est détectée à la fois dans les cellules COS-7 et les neurones, montrant qu'un transfert intercellulaire a bien eu lieu [55]. La délétion d'une séquence de 11 acides aminés situés au sein de l'homéodomaine, juste en amont du doublet WF évoqué plus tôt (voir §3.2), abolit la sécrétion de EN-2. La sensibilité à la protéinase K de la forme tronquée de EN-2 (appelée EN2 Δ 1) localisée dans le compartiment membranaire suggère que son défaut de sécrétion pourrait être lié à une localisation subcellulaire modifiée (pas d'accès au lumen de certaines vésicules par exemple). Il est intéressant de noter que la forme mutante de EN-2 dans laquelle le doublet WF est remplacé par un doublet SR (notée EN2SR) semble toujours sécrétée mais est internalisée beaucoup moins efficacement que la forme sauvage, montrant que sécrétion et internalisation nécessitent des séquences différentes, toutefois localisées dans les deux cas au sein de l'homéodomaine. La forte déstabilisation de la structure de l'homéodomaine engendrée par la délétion Δ 1 n'est pas la seule cause du défaut de sécrétion du mutant associé. La séquence *Sec*, qui correspond aux acides aminés délétés, est en effet capable de promouvoir la transcytose de la *Penetratin* au travers d'une monocouche cellulaire [81]. La sécrétion d'ENGRAILED est donc un processus actif.

En se basant sur la localisation subcellulaire de EN-2, il est possible de dis-

tinguer deux voies d'adressage distinctes, une menant au noyau et donc au rôle cellulaire-autonome, et une autre menant vers un compartiment de sécrétion et donc au rôle non-cellulaire-autonome. Dans les faits, la situation est différente car, bien qu'incompatibles de prime abord, localisation nucléaire et sécrétion d'ENGRAILED sont liées. En effet, *in vitro*, le mutant de sécrétion EN2 Δ 1 voit également son export nucléaire fortement réduit. L'identification d'une séquence d'export nucléaire de type « *Leucin-rich* » de 15 acides aminés chevauchant partiellement la séquence de sécrétion peut expliquer ces observations [82]. Une telle séquence d'export nucléaire est aussi retrouvée dans les homéoprotéines HOXC8 et HOXB4, renforçant ainsi l'idée d'une conservation de ces mécanismes au sein de cette famille protéiques. Abordant la conservation des mécanismes du transfert intercellulaire entre métaphytes et métazoaires, M. TASSETTO et al. [83] vont éclairer d'un jour nouveau la relation entre localisation nucléaire et sécrétion. L'homéoprotéine végétale KNOTTED-1(KN1) est capable de transfert intercellulaire *in vivo* chez les plantes, propriété abolie par la mutation de résidus basiques (M6) au sein de l'homéodomaine [84, 85]. Cette étude a montré que :

- i)* l'homéodomaine de KN1 est aussi transféré entre cellules animales, et donc qu'il existe une conservation forte des mécanismes du transfert intercellulaire au sein des organismes pluricellulaires.
- ii)* l'homéodomaine comportant la mutation M6 (KN1M6) est internalisé par des cellules animales en culture mais qu'il est incapable de transfert entre cellules dans un système de co-culture. Cette mutation qui empêche donc la sécrétion s'accompagne d'une redistribution de la protéine mutée du noyau vers le cytosol.
- iii)* l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire ectopique à l'homéodomaine muté restaure sa localisation nucléaire **et** sa capacité de transfert intercellulaire.

La localisation nucléaire semble donc être une étape préalable, nécessaire à la sécrétion ultérieure de la protéine.

Enfin, il est intéressant de noter que la sécrétion atypique des homéoprotéines est un processus sujet à une régulation. La phosphorylation d'une séquence riche en sérines (SRD) par la caséine kinase 2 (CK2) inhibe la sécrétion de EN-2 [86]. La séquence SRD se situant en dehors de l'homéodomaine, donc non conservée parmi les homéoprotéines, ce mécanisme de régulation est probablement propre à EN-2. On peut donc envisager la sécrétion des homéoprotéines comme reposant sur des mécanismes communs liés à des séquences contenues dans l'homéodomaine mais dont la régulation fine pourrait faire intervenir des partenaires/processus spécifiques à chaque protéine. Comme c'est le cas pour l'internalisation, plusieurs aspects de ce processus demeurent pour l'instant inconnus.

3.4 Une capacité de transfert intrinsèque aux homéoprotéines.

Nous avons déjà vu précédemment qu'une partie des mécanismes de transfert avaient été illustrés en utilisant de nombreuses homéoprotéines différentes

(ANTP, EN-2, HOX5A, HOXC8, HOXB4, KN-1). Une autre série d'études¹² a permis d'illustrer, *in vivo*, le transfert intercellulaire d'autres homéoprotéines telles que OTX2 [87, 88, 89], PAX6 [90, 91], VAX1[92] ou encore HOXD1 [93]. Bien que s'attardant plus sur les conséquences physiologiques de ce transfert plutôt que sur les mécanismes à l'œuvre derrière ce mode d'action paracrine, ces résultats renforcent l'hypothèse que le transfert intercellulaire est une propriété commune aux homéoprotéines. Il faut noter que les mécanismes de sécrétion et/ou d'internalisation alternatives, que l'on qualifiera désormais de non-conventionnelles, dépassent largement le seul cadre des homéoprotéines. Les travaux qui seront présentés par la suite dans ce manuscrit, et qui visent justement à mieux comprendre ces mécanismes, se basent en partie sur d'autres cas de sécrétions et d'internalisations non-conventionnelles qui vont être présentés dans le chapitre suivant.

12. Dont les implications seront discutées plus loin dans cette partie introductive.

3.4. UNE CAPACITÉ DE TRANSFERT INTRINSÈQUE AUX
HOMÉOPROTÉINES.

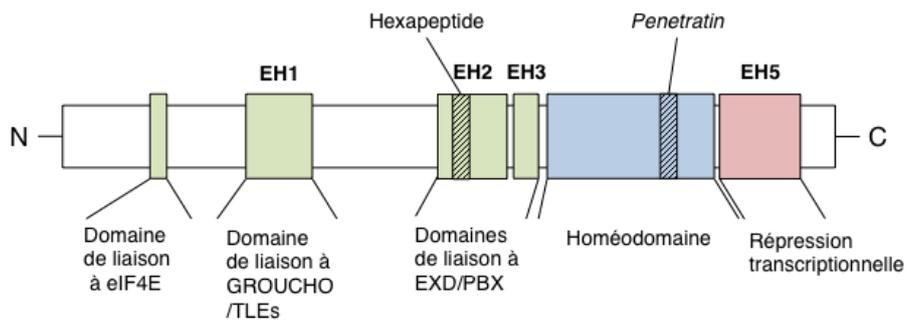


FIGURE 3 – Organisation générale de la protéine ENGRAILED. Les domaines EHs (pour *Engrailed Homology*) correspondent à des domaines très conservés entre les différents homologues des protéines ENs. Adapté de [79].

Chapitre 4

Bases cellulaires du transfert intercellulaire et conséquences fonctionnelles.

4.1 La sécrétion à la base de la communication cellulaire.

Comme évoqué précédemment (voir §1.3), tout organisme pluricellulaire peut être envisagé comme un regroupement de cellules, d'origine commune, ayant acquis au cours du développement des identités positionnelles et fonctionnelles diverses. Afin d'éviter un développement anarchique de cette « communauté », la communication entre chacun de ses éléments est une condition fondamentale. Cet échange d'informations entre cellules peut avoir lieu par des voies différentes :

- i)* La signalisation autocrine, dans laquelle, un messenger chimique (métabolite, protéine ...) produit par la cellule est libéré dans le milieu extracellulaire, puis va agir sur elle-même, par l'intermédiaire de récepteurs de surface par exemple.
- ii)* La signalisation paracrine, qui se distingue de la signalisation autocrine par le fait que le signal est transduit dans les cellules adjacentes (plus ou moins éloignées selon la capacité de diffusion du messenger dans le milieu extracellulaire) et non plus seulement dans la cellule productrice.
- iii)* La signalisation juxtacrine ou signalisation de contact, qui passe par l'interaction entre des macromolécules, le plus souvent transmembranaires, présentées à la surface des cellules.
- iv)* La signalisation via des jonctions cellulaires communicantes comme les jonctions GAP ou les plasmodesmes chez les plantes. Dans ce cas, les cytoplasmes de deux cellules sont mis directement en contact via la formation d'un canal traversant leur membrane plasmique.
- v)* La signalisation synaptique qui est un cas particulier de signalisation paracrine spécifique aux neurones. La propagation d'un potentiel d'action jusqu'aux extrémités synaptiques du neurones va entraîner la libération

de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique, neurotransmetteurs qui en se fixant sur des récepteurs situés à l'extrémité postsynaptique d'une cellule adjacente vont entraîner la génération d'un potentiel électrique postsynaptique.

Exceptée la signalisation via les jonctions communicantes, toutes ces voies de communications cellulaires nécessitent la libération dans le milieu extracellulaire de composants intracellulaires, autrement dit, leur sécrétion.

4.1.1 La voie reticulum endoplasmique / appareil de Golgi / vésicules de sécrétion : mode de sécrétion cano-nique.

La grande majorité des protéines solubles destinées à la sécrétion suivent une voie commune dont les mécanismes sont quasi-invariants d'une protéine à une autre. L'adressage vers cette voie de sécrétion se fait de manière cotraductionnelle. La reconnaissance par le complexe protéique SRP (*Signal Recognition Particle*) d'un peptide signal situé en N-terminal de la protéine en cours de traduction entraîne l'association du complexe ribosome/chaîne polypeptidique naissante/SRP avec la membrane du reticulum endoplasmique. En parallèle de sa traduction, la protéine est alors transférée vers le compartiment luminal du reticulum endoplasmique par l'intermédiaire d'un canal de translocation, le translocon (pour revue [94]). Le peptide signal de sécrétion est ensuite clivé, puis la protéine connaît une première étape de maturation (repliement, création de ponts disulfure, ajout du motif de base de la N-glycosylation) au contact d'enzymes et de protéines chaperonnes (pour revue [95]). La sortie du reticulum endoplasmique s'effectue par l'intermédiaire du bourgeonnement de vésicules, caractérisées par leurs protéines d'enveloppe, le complexe COPII. Ces vésicules COPII vont ensuite fusionner avec les saccules de l'appareil cis-golgien (pour revue [96]). Une fois au sein de l'appareil de Golgi, les protéines vont subir un second cycle de maturation (O-glycosylations par exemple), puis sont ensuite triées selon leur destination au niveau du réseau trans-golgien (TGN) (pour revue [97]). Des vésicules de sécrétion issues de l'appareil de Golgi sont orientées vers la membrane plasmique où la dernière étape du processus de sécrétion va avoir lieu, à savoir la formation d'un porosome issu d'une fusion partielle entre ces vésicules et la membrane, permettant la libération de leur contenu dans l'espace extracellulaire (pour revue [98]). Le bon déroulement de cette voie de sécrétion repose ainsi sur des échanges successifs de membranes (par des intermédiaires vésiculaires) entre compartiments donneurs et accepteurs. Ces événements de fusions dirigées entre organelles intracellulaires requièrent une famille de protéine centrale, les protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*). Par des jeux d'interactions complémentaires entre SNAREs exprimées au niveau des compartiments donneurs (v-SNAREs, pour *vesicular-SNARE*) et accepteurs (t-SNAREs, pour *target-SNARE*), ces protéines vont promouvoir une fusion contrôlée entre les compartiments membranaires de la voie de sécrétion standard (pour revue [99]) (Figs. 5 et 6).

CHAPITRE 4. BASES CELLULAIRES DU TRANSFERT INTERCELLULAIRE ET CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES.

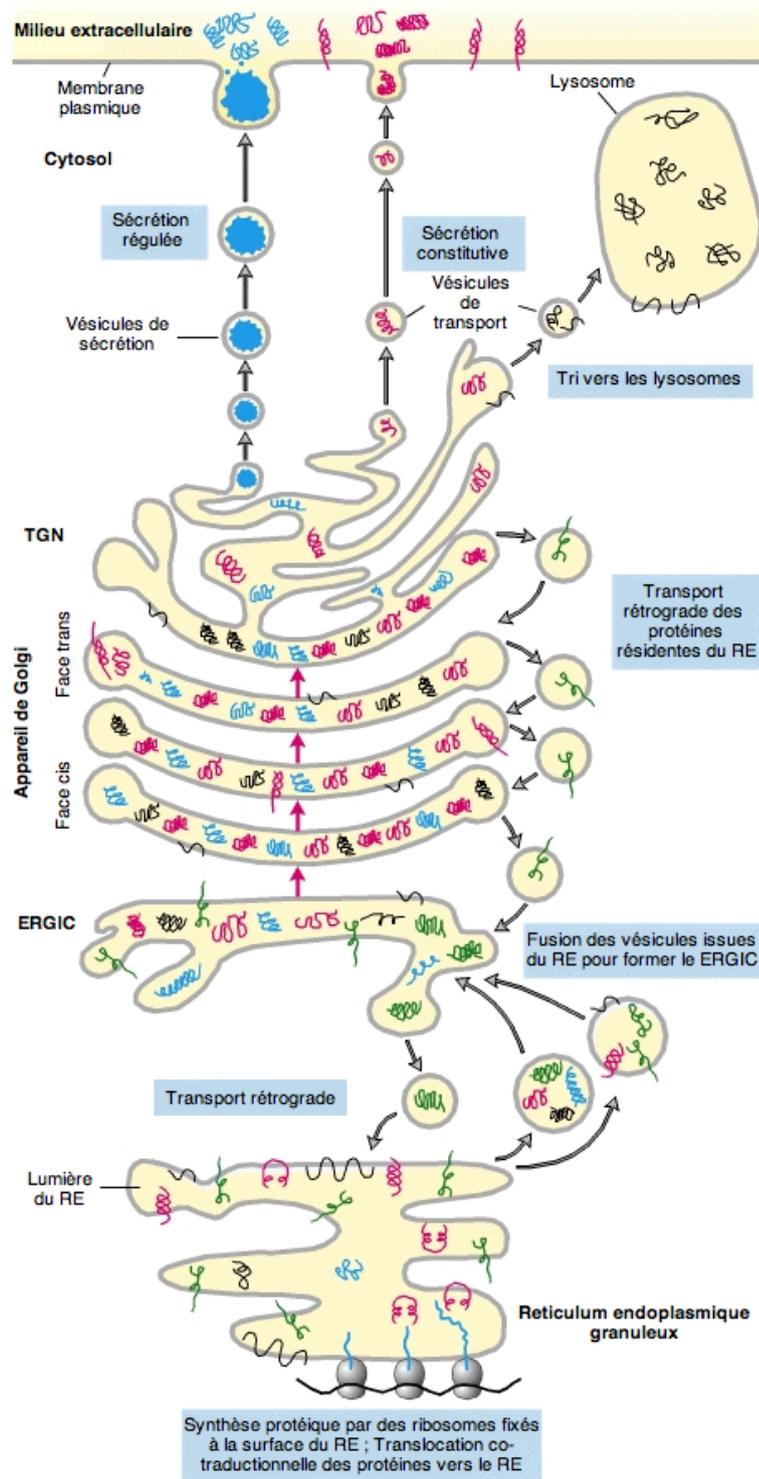


FIGURE 4 – Représentation schématique de la voie de sécrétion classique. Tiré et adapté de [100]. TGN : *Trans-Golgi Network* ; RE : Reticulum endoplasmique ; ERGIC : *ER-Golgi Intermediate compartment*.

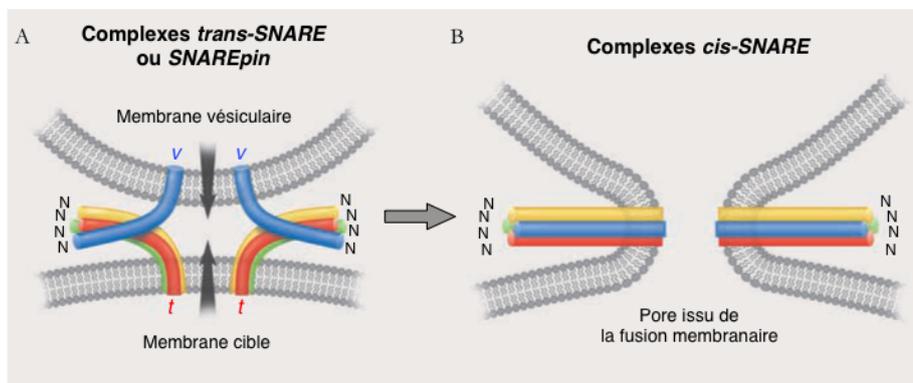


FIGURE 5 – Rôle des protéines SNAREs dans la fusion membranaire. Tiré et adapté de [99]. Trois protéines t-SNAREs (t) ancrées dans une membrane vont interagir avec une protéine v-SNARE (v), ancrée dans une autre membrane, pour former un complexe trans-SNARE ou « *SNAREpin* ». L'interaction entre ces deux types de SNAREs est initiée au niveau de leurs extrémités N-terminales et s'étend ensuite à leurs extrémités C-terminales. A la manière d'une fermeture à glissière, la propagation de cette interaction entraîne la création d'une force rapprochant les deux membranes (A). Ceci va ensuite entraîner la fusion des deux membranes. Tous les membres des complexes SNAREs, qu'on désigne après fusion comme complexes cis-SNAREs, se retrouvent ainsi au sein de la même membrane, ce qui a pour conséquence d'annihiler toute force de tension générée par l'interaction entre t- et v-SNAREs (B).

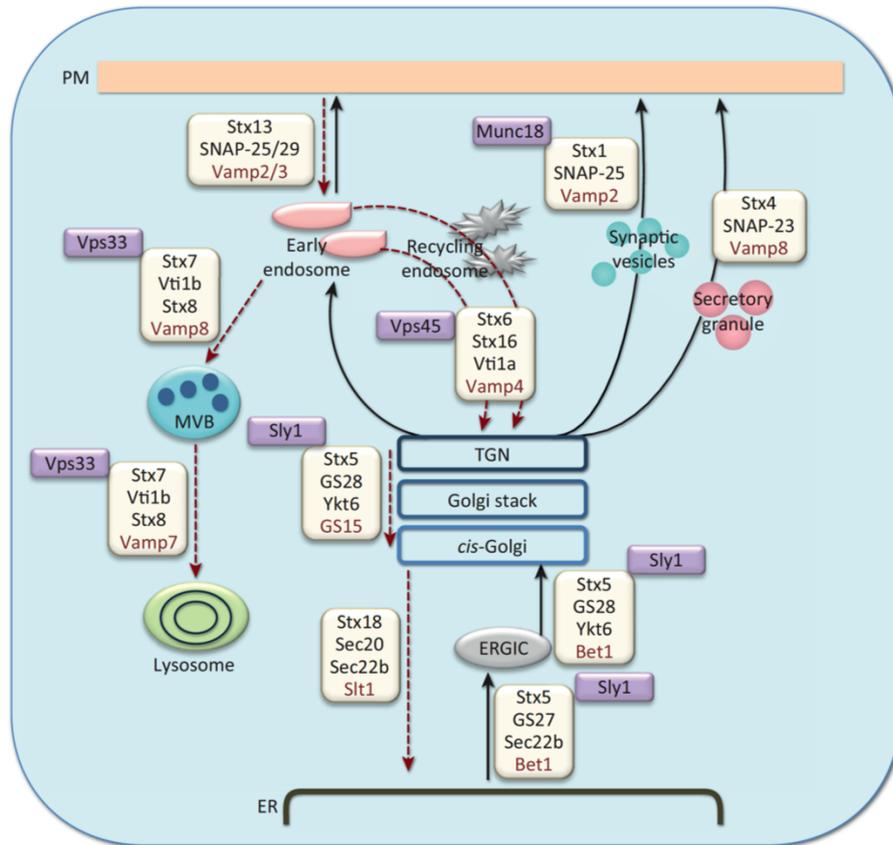


FIGURE 6 – Les différentes protéines SNAREs impliquées dans les voies endocytiques et de sécrétion chez les mammifères. Tiré de [101]. En rouge sont indiquées les v-SNAREs potentielles. En violet sont indiquées les protéines accessoires impliquées dans l'assemblage des complexes de protéines SNAREs. TGN : *Trans-Golgi Network* ; ER : Reticulum endoplasmique ; PM : Membrane plasmique ; ERGIC : *ER-Golgi Intermediate compartment* ; MVB : *Multivesicular body*.

4.1.2 En opposition à la voie canonique, les modes de sécrétion non-conventionnels.

Au fil des ans, un nombre croissant de protéines sécrétées ne suivant pas la voie évoquée dans le paragraphe précédent a été répertorié. L'ensemble de ces événements, que l'on regroupe sous l'appellation vague de sécrétion non-conventionnelle, concerne des protéines diverses et variées aux propriétés biochimiques et fonctionnelles hétérogènes. Dans leur vaste majorité, ces sécrétions non-conventionnelles ont comme point commun d'avoir comme substrat des protéines sans peptide signal de sécrétion, ainsi que d'avoir lieu de façon post-traductionnelle (plus ou moins vrai pour golgi bypass). De manière systématique, ces sécrétions non-conventionnelles sont insensibles à la Bréfeldine A (BFA), une substance pharmacologique qui bloque la sécrétion classique, en annihilant le transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant leur regroupement sous le terme générique de sécrétion non-conventionnelle ne doit pas laisser penser que l'ensemble de ces processus obéit aux mêmes mécanismes cellulaires, chaque protéine utilisant un mécanisme qui lui semble propre. Une classification des grands types de sécrétions non-conventionnelles a néanmoins été proposée [102], et c'est en se basant sur celle-ci et en l'adaptant que nous allons passer en revue différents exemples.

Détournement de la voie de sécrétion standard : le « *Golgi bypass* ».

Le premier type de sécrétion non-conventionnelle regroupe essentiellement des protéines transmembranaires qui sont dirigées vers la membrane plasmique par des voies alternatives mais dérivées de la voie de sécrétion standard. Après synthèse, ces protéines sont retrouvées au niveau du réticulum endoplasmique à partir duquel elles vont être adressées à la membrane plasmique, sans passer par l'appareil de Golgi (« *Golgi bypass* »). Une des caractéristiques communes à ces protéines est leur sensibilité à l'endoglycosidase H (EndoH), qui est capable de cliver le motif de base riche en mannose de la N-glycosylation spécifique au réticulum endoplasmique car perdu par la suite au niveau de l'appareil de Golgi après maturation de la chaîne glycosylée. Les formes matures devenant résistantes à l'action de l'enzyme, la sensibilité à l'EndoH peut être considérée comme un marqueur potentiel d'un « *Golgi bypass* » [103]. Un des exemples les mieux documentés d'un tel processus concerne le canal ionique *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), dont la forme mutante CFTR Δ F508, incapable de quitter le réticulum endoplasmique, est impliquée dans près de 70% des cas de mucoviscidose. L'export de CFTR du réticulum endoplasmique se fait par l'intermédiaire des vésicules COPII, comme pour la sécrétion standard, mais la protéine n'est pas retrouvée au sein de l'appareil de Golgi. De plus sa sécrétion est insensible à l'expression de mutants dominants négatifs des protéines ARF1, RAB1a/RAB2 ou Syntaxin5 décrits comme bloquant les échanges entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La fraction membranaire de CFTR présente cependant des glycosylations complexes caractéristiques de l'appareil de Golgi, et l'expression d'un mutant dominant négatif de la Syntaxin 13, qui régule les échanges vésiculaires au niveau du compartiment endosomal tardif et du réseau trans-golgien, abolit la sécrétion de CFTR [104]. CFTR serait donc transféré directement du réticulum endoplasmique vers un compartiment mixte endosome tardif / réseau trans-golgien

(où auraient lieu les glycosylations) puis ensuite vers la membrane plasmique. L'accumulation de CFTR dans un compartiment intermédiaire péri-centrosomal [105] suggère l'existence d'une ou plusieurs étapes entre la sortie du reticulum endoplasmique et la présentation à la membrane de CFTR.

On peut également citer les exemples de la protéine-tyrosine phosphatase transmembranaire CD45 et des connexines 26 (Cx26) et 30 (Cx30). Ainsi, dans les lymphocytes T, une partie de la fraction membranaire de CD45 est sensible à l'action de EndoH. Cette même fraction est présentée beaucoup plus rapidement à la membrane après synthèse (~ 5 minutes) que la fraction non-sensible à EndoH (~ 15 minutes) dont le répertoire de glycosylations est différent [106]. L'adressage à la membrane de CD45 pourrait résulter en partie du processus conventionnel et en partie d'un *Golgi bypass*, les mécanismes précis de ce dernier n'étant pour l'heure pas connus. En ce qui concerne Cx26 et Cx30, là aussi les mécanismes précis de leur adressage à la membrane ne sont pas connus, mais ils semblent impliquer le cytosquelette d'actine, ainsi que les microtubules dans le cas de Cx26 [107, 108].

Un autre cas de *Golgi bypass* concerne la sous-unité α PS1 de l'intégrine PS1 de drosophile. Cette protéine adressée à la membrane selon la voie conventionnelle connaît une modification de son trafic intracellulaire au cours du développement. Ainsi, au niveau de certaines cellules épithéliales de l'aile et des follicules ovariens, α PS1 adopte une voie alternative pour atteindre la membrane plasmique. Ce mode de sécrétion est insensible à une mutation de la dSyntaxin 5 et donc ne nécessite pas un transport reticulum endoplasmique / appareil de Golgi. La protéine dGRASP (pour *Golgi ReAssembly Stack Protein*, orthologue chez la drosophile des protéines GRASP55 et GRASP65 des vertébrés) et décrite pour son rôle dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi [109], est requise pour ce mode de sécrétion de α PS1, via la traduction locale de son ARN messager à proximité de la membrane plasmique [110]. L'apparition d'une tension mécanique au sein de l'épithélium du follicule ovarien due à la maturation des ovocytes pourrait induire un remodelage de la membrane plasmique, via le recrutement, par les intégrines de RhoA, ainsi qu'une hausse de la transcription du gène *dgrasp* suite à la relocalisation du régulateur transcriptionnel PINCH des points focaux d'adhésion vers le noyau. La sécrétion non-conventionnelle de la sous-unité α PS1 serait donc auto-induite par des intégrines déjà présentes à la membrane plasmique en réponse à un stress mécanique croissant, et donc de permettre le maintien de l'intégrité de l'épithélium du follicule ovarien [111]. Le mécanisme exact par lequel α PS1 quitte le reticulum endoplasmique pour atteindre la membrane plasmique n'est pour l'heure pas identifié clairement. Bien que ce soit pour un rôle différent, dGRASP et ses différents orthologues sont impliqués dans un autre grand mode de sécrétion non-conventionnelle que nous allons aborder par la suite.

Sécrétion non-conventionnelle vésiculaire.

Un deuxième mécanisme majeur de sécrétion non-conventionnelle regroupe des protéines cytosoliques emprisonnées dans des structures vésiculaires en cours de formation, qui sont libérées elles-mêmes dans le milieu extérieur.

Les exosomes. Les exosomes sont le premier type identifié de structures vésiculaires extracellulaires d'une taille comprise entre 50 et 100 nm de diamètre.

Elles dérivent de structures endosomales multivésiculaires, les MVBs (pour *Multivesicular Bodies*). Ces MVBs se forment à partir de l'invagination de la membrane de vésicules endosomales sous le contrôle de complexes multiprotéique de type ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) [112]. Les MVBs ont été décrits initialement comme des compartiments dont le contenu est destiné à la dégradation après fusion avec des lysosomes. Cependant, certains de ces MVBs ne fusionnent pas avec des lysosomes mais avec la membrane plasmique, libérant ainsi leurs vésicules intra-luminales, les exosomes, dans le milieu extracellulaire [113, 114, 115]. Parmi les très nombreuses protéines retrouvées au sein de ces exosomes, on peut citer la galectine-5 [116], les protéines de choc thermique HSP70 [117], HSP90 [118] et α B-crystallin [119], la métalloprotéinase MMP-14 [120] ou les peroxiredoxines 1 (PRDX1) et 2 (PRDX2) [121].

Il est également important de noter que les protéines ne sont pas les seules macromolécules transportées par ces exosomes, et qu'on y trouve aussi un nombre important d'acides nucléiques comme des ARNs messagers ou des microARNs régulateurs de la traduction [122]. De manière intéressante certains membres du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) sont aussi présents dans ces exosomes [123], suggérant que ces vésicules puissent être les médiateurs intercellulaires d'une interférence à ARN.

Les ectosomes. Plus récemment identifiés, les ectosomes constituent un deuxième type de structures vésiculaires extracellulaires, dont le diamètre varie entre 100 et 350 nm. A la différence des exosomes, les ectosomes sont issus d'un bourgeonnement direct de la membrane plasmique, à partir de microdomaines précis. L'accumulation, au sein de l'ectosome en formation, de protéines myristoylées ou palmitoylées ainsi que l'activation de scramblases induisant une redistribution des lipides entre les deux feuillettes de la membrane plasmique, accentuent la courbure de la membrane plasmique. Celle-ci s'accompagne d'un relâchement local du cytosquelette et de l'accumulation de matériel cytosolique dans le lumen de la vésicule en formation. Le recrutement de membres des complexes ESCRT-I et ESCRT-III induit la scission entre la membrane plasmique et l'ectosome, permettant sa libération dans le milieu extracellulaire [124, 115]. Peu d'exemples vérifiés de sécrétion via les ectosomes ont été rapportés mais on peut citer la protéine Tau [125] ou la galectine-3 [126, 127, 128]. Comme dans le cas des exosomes, les ectosomes peuvent aussi contenir bon nombre d'acides nucléiques de type ARN.

Nouveaux compartiments cellulaires sécrétoires liés à l'autophagie.

L'implication des protéines GRASP dans un autre processus de sécrétion non-conventionnelle est le fruit de travaux menés chez *Dictyostelium discoideum*. L'homologue de GRASP chez *D. discoideum*, GrpA, est indispensable à la sécrétion de la protéine cytosolique *acyl-CoA binding protein* (AcbA) [129]. D'autres études, menées sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, arrivent aux mêmes conclusions, à savoir que Grh1 (homologue de GRASP chez les levures) est requis pour la sécrétion de Acb1 (homologue de AcbA) [130, 131]. De plus, ces travaux montrent qu'un certain nombre de gènes (atg1, 6, 7, 8, 9, 12, 15 et 17) impliqués dans l'autophagie, le sont également dans ce processus de sécrétion et que celle-ci est induite par sevrage ou traitement à la rapamycine. A la différence des autophagosomes dont le contenu est destiné à la dégrada-

tion, les autophagosomes sécrétoires contenant Acb1 ne fusionnent pas avec la vacuole mais avec la membrane plasmique sous l'influence de la protéine de type t-SNARE, Sso1. La génération de ces autophagosomes de sécrétion se ferait à partir d'un nouveau compartiment cellulaire nommé CUPS (pour *Compartment for Unconventional Protein Secretion*). Le sevrage chez *S. cerevisiae* induit en effet l'accumulation de membranes contenant Grh1, à proximité des points de sortie du reticulum endoplasmique. Au sein de cette nouvelle structure intracellulaire, on retrouve la protéine de type ESCRT Vps23, les protéines liées au processus d'autophagie Atg8 et Atg9, ainsi qu'un enrichissement en phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P). L'absence au niveau de ce CUPS d'autres marqueurs d'endosomes (Tlg1 et Pep12) ou d'autophagosomes cataboliques (Ape1) laisse penser qu'il serait un tout nouveau compartiment cellulaire dédié à la sécrétion [132]. Une structure similaire à ce CUPS est également retrouvée dans les cellules mammifères après carence en acides aminés. Nommé omegasome, ce compartiment partage de nombreux points communs avec le CUPS, comme son enrichissement en PI3P, sa proximité avec les sites de sortie du reticulum endoplasmique ou la présence de LC3, orthologue mammifère de Atg8 [133, 134]. La présence de GRASP ou de Vps23 au niveau de l'omegasome n'ayant pas été testée, il est encore difficile d'affirmer qu'il s'agit de l'équivalent mammifère du CUPS de la levure.

Des cas de sécrétions non-conventionnelles liées à l'autophagie dans des cellules mammifères ont tout de même été rapportés. Un des exemples les plus documentés concerne l'interleukine 1 β (IL-1 β). L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire cytosolique dépourvue de peptide signal de sécrétion, présente sous deux formes, la proIL-1 β , inactive, et sa forme clivée, l'IL-1 β , active. Cette maturation protéolytique se fait via l'action de la caspase-1 [135, 136]. Plusieurs mécanismes, parfois contradictoires, expliquant la sécrétion de l'IL-1 β ont été proposés : une sécrétion via certains lysosomes [137] ou un bourgeonnement direct de la membrane plasmique [138], concomitante à la maturation de l'IL-1 β ; une libération passive due à la mort cellulaire induite par l'activation de la caspase-1 [139, 140]; une translocation directe au travers de la membrane plasmique [141] ou par l'intermédiaire du transporteur *ATP Binding Cassette*, ABC1 [142, 143]; une libération par l'intermédiaire d'exosomes suite à une stimulation des récepteurs P2X7 par de l'ATP extracellulaire [144]. La sécrétion de l'IL-1 β semble donc faire appel à différentes voies, parfois décrites comme incompatibles, et dont la réalité physiologique demande confirmation [145, 146]. Un premier exemple de mécanisme lié à l'autophagie de sécrétion a été rapporté dans un organisme pluricellulaire. Bien que dans des conditions standards, l'autophagie basale semble inhiber la sécrétion de l'IL-1 β [147, 148], l'induction de l'autophagie (carence en acides aminés ou induction pharmacologique via inhibition du complexe mTOR) dans des macrophages de souris en culture entraîne sa forte augmentation [149]. Cette hausse de la sécrétion de l'IL-1 β dépend de l'activation de l'inflammasome (complexes protéiques responsables de l'activation de la caspase-1) [150] et requiert les protéines RAB8a et GRASP55. De manière assez similaire à ce qui a été décrit pour Grh1 et la formation de CUPS chez la levure [132], GRASP55 joue un rôle dans l'initiation de l'autophagie de sécrétion, en permettant la génération d'autophagosomes sécrétoires contenant l'IL-1 β .

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un nouveau type d'autophagie dédié à la sécrétion de protéines dépourvues de peptide signal de sécrétion,

distinct de l'autophagie dégradative classique, et dont un des acteurs majeurs serait les protéines GRASPs.

Autres intermédiaires vésiculaires. Enfin, on peut également mentionner des protéines sécrétées qui utilisent d'autres intermédiaires vésiculaires dont la fonction première n'est pas la sécrétion ou dont la nature n'est pas encore clairement définie. La *tissue* Transglutaminase (tTG ou TG2) est une protéine majoritairement cytosolique qui a accès aux endosomes de recyclage via sa fixation à certains phosphoinositides (probablement PI3P ou PI4P) au niveau du compartiment de recyclage péri-nucléaire. Une fois à l'intérieur de ces vésicules (mécanisme de translocation inconnu), TG2 est redirigée vers la membrane plasmique en complexe avec des intégrines $\beta 1$ ou $\beta 2$ en cours de recyclage [151]. Cette sécrétion est régulée par le monoxyde d'azote dans les cellules vasculaires [152].

La protéine nucléaire *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) est elle aussi sécrétée de manière non-conventionnelle. HMGB1 est libérée dans le milieu extracellulaire selon deux voies distinctes : une voie passive résultant de la nécrose cellulaire [153]; une voie active, dans les monocytes, où une stimulation pro-inflammatoire entraîne la relocalisation de HMGB1 au niveau de structures endolysosomales cytoplasmiques [154]. De nombreux points communs entre la sécrétion de HMGB1 et celle de l'IL- 1β (implication de la caspase-1 après son activation par l'inflammasome [155, 156, 157], stimulation via l'induction de l'autophagie [149]) laissent penser que HMGB1 pourrait partager des mécanismes de sécrétion avec cette cytokine, et notamment le recours à l'autophagie sécrétoire.

Translocation directe au travers de la membrane plasmique.

La dernière grande classe de sécrétion non-conventionnelle regroupe des protéines capables de translocation directe au travers de la membrane plasmique. Ce mode de sécrétion concerne notamment la protéine virale Tat (pour *Trans-Activator of Transcription*) ainsi que les *Fibroblast Growth Factor 1* (FGF1 ou aFGF) et 2 (FGF2 ou bFGF).

Tat est une protéine virale encodée par le virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus*) qui joue un rôle prépondérant dans la transcription des protéines virales par les cellules infectées, et donc dans la réplication de HIV-1. Au-delà de son action au niveau nucléaire, la protéine Tat est également sécrétée de manière active (ou tout du moins indépendamment d'une quelconque lyse cellulaire) par des cellules infectées par le HIV-1, ou simplement transfectées avec le gène *tat* seul [158]. Plus récemment, il a été montré que la sécrétion de Tat est inhibée à basse température (en dessous de 20°C) provoquant l'accumulation de la protéine au niveau de la membrane plasmique et que dans un même temps elle est insensible à de nombreux inhibiteurs pharmacologiques du trafic endosomal (bafilomycin A1, nigericin, monencin) ou de perturbateurs du cytosquelette (taxol, nocodazole, cytochalasine D) [159]. La mise en évidence de l'interaction directe de Tat avec les membranes lipidiques soutient l'hypothèse d'une translocation de la protéine au travers de la membrane plasmique. Plus précisément, Tat est capable de se fixer de manière spécifique au phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), un phospholipide retrouvé principalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette interaction, observée uniquement dans un contexte membranaire, est nécessaire à l'accumulation de Tat au niveau de la

membrane ainsi qu'à sa sécrétion. La stimulation de l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par l'expression de phosphatases ectopiques (phosphoinositide 5-phosphatase IV, Ipn54, IpgD) induit en effet une relocalisation cytosolique de Tat s'accompagnant d'une diminution de sa sécrétion. D'un point de vue moléculaire, le tryptophane en position 11 de la protéine joue un rôle clé dans la reconnaissance entre Tat et PI(4,5)P₂, les mutations W11F ou W11Y entraînant des effets similaires à une hydrolyse des PI(4,5)P₂. Ce même tryptophane est également impliqué dans l'insertion de Tat dans les membranes lipidiques [160].

Le FGF1 a également recours à une voie de sécrétion non-conventionnelle. Ce facteur de croissance mitogène est libéré en réponse à un stress cellulaire comme un choc thermique [161, 162], en conditions d'hypoxie [163] ou en réponse à des traitements à la thrombine [164, 165]. La libération du FGF1 dans le milieu extracellulaire nécessite l'intervention de la protéine S100A13 [166], d'un fragment protéolytique de 40 kDa de la synaptogamine 1 (p40Syn1) [167] et de la sphingosine kinase 1 (SK1) [168]. Ces différentes protéines se regroupent dans un complexe multi-protéique dont l'assemblage dépend fortement de la présence d'ions cuivre Cu²⁺ [169]. En accord avec l'observation qu'une partie du FGF1 sécrétée se trouve sous la forme d'un homodimère [162], c'est également sous cette forme qu'on le retrouve dans ce complexe. Cette homodimérisation du FGF1 implique la cystéine en position 30 [170] et est catalysée directement par les ions Cu²⁺ [171], probablement présents au sein de S100A13 [172]. Il a été proposé que SK1 joue le rôle de donneur de Cu²⁺ (du fait de leur très forte toxicité cellulaire, les ions Cu²⁺ ne sont pas libres au sein de la cellule), cette protéine possédant une très forte affinité pour ces ions. De plus, la sur-expression de cette kinase restaure la sécrétion du FGF1 inhibée par un chélateur des ions cuivriques comme le tetrathiomolybdate [168]. Enfin le FGF1, S100A13 et p40Syn1 sont toutes trois capables de déstabiliser des membranes lipidiques, en se fixant à des phospholipides acides comme la phosphatidylsérine, les phosphatidylinositols ou le phosphatidylglycérol [173]. De manière intéressante, nombre de ces phospholipides acides s'accumulent au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique [174], mais sont aussi capables, notamment pour la phosphatidylsérine, de se retrouver au niveau de la face externe sous certaines conditions [175]. Sur la base des données précédentes, complétées par de nouvelles données structurales, S.MOHAN et al. ont proposé le modèle suivant pour la sécrétion du FGF1 [176] : *i*) formation de complexes tétramériques intermédiaires FGF1-S100A13 ou S100A13-p40Syn1, *ii*) fixation sur ces complexes intermédiaires de p40Syn1 ou FGF1 pour former des complexes hexamériques permettant la sécrétion du FGF1, *iii*) adressage de ce complexe hexamérique vers l'environnement acide que constitue le feuillet interne de la membrane plasmique, où il interagit avec des ions Cu²⁺ provenant de la SK1, *iv*) la fixation des ions cuivriques entraîne des changements de conformation du FGF1 et de la p40Syn1 renforçant la capacité de fixation aux lipides de ces deux protéines [177], *v*) la fixation du FGF1 aux lipides membranaires permet sa translocation, sous forme de dimère, au travers de la membrane plasmique. Une hypothèse alternative impliquant l'annexine 2 (ANX2) a été formulée pour expliquer ce franchissement de la membrane plasmique [178, 179]. ANX2 est une protéine qui se fixe aux phospholipides anioniques présents au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Sur des cellules endothéliales en culture, un traitement à la thrombine entraîne une relocalisation de l'ANX2 au niveau du feuillet externe. Enfin ANX2 interagit avec la protéine S100A10 [180], une autre protéine de la

famille S100 qui présente une forte similarité structurale avec S100A13 [181]. Sur ces bases, il a été proposé [178, 179] que l'annexine 2 puisse également interagir avec S100A13 présente dans le complexe de sécrétion et participer à sa translocation au travers de la membrane plasmique.

Le FGF2 est le dernier exemple d'une sécrétion non-conventionnelle impliquant le franchissement direct de la membrane plasmique, et probablement le mieux documenté. Le FGF2 est, comme le FGF1, un facteur mitogène, en plus d'être un facteur pro-angiogénique majeur. Dépourvu de peptide signal de sécrétion, sa sécrétion a longtemps été considérée comme la résultante d'une libération passive liée à une lyse cellulaire [182, 183], avant que ne soit proposée l'idée que le FGF2 emploie plutôt une voie de sécrétion distincte de la voie reticulum endoplasmique / appareil de Golgi [184]. Trois isoformes de 22.5, 21 et 18 kDa du FGF2 existent [185], mais seule la forme de 18 kDa est sécrétée [186]. Que ce soit *in vivo* (pour revue [187]) ou *in vitro* [188], le FGF2 sécrété ne se retrouve que très peu sous une forme libre dans le milieu extracellulaire, mais essentiellement en association avec la matrice extracellulaire ou avec les *heparan-sulfate proteoglycans* (HSPGs), un type spécifique de protéoglycanes présents à la surface des cellules. La translocation directe du FGF2 au travers de la membrane plasmique repose sur des propriétés intrinsèques à cette protéine, mais dépend aussi de l'asymétrie de la membrane [189]. L'interaction entre HSPGs extracellulaires et FGF2 joue un rôle déterminant dans cette sécrétion, un mutant du FGF2 incapable d'interagir avec les HSPGs n'étant pas exporté des cellules, tout comme une forme sauvage du FGF2 exprimée dans des cellules déficientes pour la synthèse de HSPGs [190]. Comme c'est le cas pour Tat, les PI(4,5)P₂ sont également impliqués dans la sécrétion du FGF2. En effet, le FGF2 interagit fortement et spécifiquement avec le PI(4,5)P₂ dans un contexte membranaire. Un traitement réduisant l'accessibilité des PI(4,5)P₂ (néomycine, antibiotique qui se fixe à ces lipides) ou une inactivation de l'expression des enzymes de synthèse des PI(4,5)P₂ (ARN interférents contre les PIP-kinase de type I α , β et γ) entraîne une baisse de l'export du FGF2 [191]. Enfin, contrairement au FGF1, la translocation du FGF2 au travers de la membrane plasmique ne nécessite pas un dépliement, ne serait-ce que partiel, de la protéine [192, 193]. Le modèle actuel proposé pour la sécrétion du FGF2 est le suivant [194] : le recrutement du FGF2 à la membrane plasmique est initié via son interaction avec le domaine cytoplasmique de la chaîne $\alpha 1$ de la Na/K-ATPase [195] ; une fois localisé à proximité de la membrane, il s'ancre à celle-ci en se fixant aux PI(4,5)P₂ puis est phosphorylé sur la tyrosine en position 82 par la Tec kinase [196] ; cette phosphorylation, ainsi que l'interaction avec les PI(4,5)P₂, promeut l'oligomérisation de cinq à six monomères de FGF2 formant une structure de type pore membranaire transitoire permettant la translocation de ces protéines au travers de la membrane [197] ; les HSPGs présents sur la surface externe de la cellule serviraient ensuite de sites extracellulaires nécessaires à la dissociation du FGF2 du feuillet membranaire [190]. Des résultats récents suggèrent que l'oligomérisation de la protéine aboutissant à la formation d'un pore membranaire transitoire pourrait être une étape commune à la sécrétion du FGF2 et de Tat [198].

4.1.3 Une classification arbitraire et non figée.

La classification des mécanismes de sécrétion non-conventionnelle proposée dans les paragraphes précédents est bien évidemment arbitraire et sûrement incomplète. Sur les cinq cents cas estimés de sécrétion non-conventionnelles [199], un très petit nombre est étudié de manière approfondie, quand beaucoup d'autres sont simplement abordés sans que les mécanismes à l'œuvre ne soient étudiés (TCTP [200], *coagulation factor XIII-A* [201], *visfatin* [202], α -*synuclein* [203], MIF [204], *Tubby* et *Tubby-like protein I* [205], ...).

Hormis les protéines ayant recours au *Golgi bypass*, qui se situe à la frontière entre sécrétion classique et non-conventionnelle, la diversité des mécanismes de sécrétion décrits dans la littérature ainsi que leur apparente spécificité vis à vis du substrat sécrété rendent difficile l'établissement d'une classification robuste. Dans des cas particuliers, comme celui de l'IL-1 β , plusieurs mécanismes distincts ont même été avancés. Ici, le critère que nous avons retenu pour notre classification est le mode franchissement direct ou indirect de la membrane plasmique, seul le premier permettant au substrat sécrété d'interagir directement avec le milieu extracellulaire. De nombreux autres critères de classification tout aussi pertinents auraient pu être choisis. On peut envisager cette présentation des différentes voies de sécrétion sur la base de la localisation subcellulaire préférentielle des substrats sécrétés (nucléaires, cytosoliques, associés aux membranes), la nature des partenaires impliqués (GRASP, PI(4,5)P₂, protéoglycanes, ...), les modalités de la sécrétion (constitutive, régulée par des stimuli extérieurs) ou bien la sensibilité à différents traitements pharmacologiques (BFA, monensin, nocodazole, cytochalasin D, ...).

4.2 Après la sécrétion : différents mode d'intégration du signal transmis.

D'un point de vue fonctionnel, la sécrétion n'est qu'une première étape dans l'action des protéines sécrétées, leur permettant d'interagir avec l'environnement extracellulaire et les cellules avoisinantes. Reprenant la classification utilisée dans le chapitre précédent, nous nous concentrerons sur le cas des protéines libres dans le milieu extracellulaire, ce qui notons le, englobe également les protéines sécrétées de manière conventionnelle. Deux grands modes d'intégration du signal extracellulaire par une cellule peuvent être proposés¹³ :

- i)* Pour le premier et le plus fréquent, le signal extracellulaire interagit avec un récepteur présent à la surface cellulaire, engendrant une cascade de signalisation intracellulaire déclenchée par le récepteur (génération d'un second messager, phosphorylations de substrats intracellulaires, influx/efflux ionique, ...).
- ii)* Le deuxième mode, plus atypique, repose sur l'action intracellulaire du signal extracellulaire proprement dit suite à son internalisation. Il convient ici de distinguer deux situations aux conséquences fonctionnelles bien distinctes. Si l'internalisation requiert un intermédiaire vésiculaire, la protéine, bien que formellement intracellulaire reste cantonnée au compartiment luminal des vésicules responsables de son internalisation, topologi-

13. Qui ne sont pas mutuellement exclusifs.

quement similaire au milieu extracellulaire. Dans la situation alternative, le signal extracellulaire a accès aux compartiments intracellulaires, cytosol ou le noyau, ce qui implique le franchissement direct de la membrane plasmique dans un sens opposé à la sécrétion. Ces deux situations ne sont cependant pas mutuellement exclusives car une même protéine peut être internalisée par différents mécanismes. De plus, une fois internalisée par des vésicules, certaines protéines peuvent s'échapper de ces structures et accéder au cytosol et au noyau.

Nous avons vu précédemment que les homéoprotéines étaient internalisées efficacement en l'absence de récepteur chirale de surface ou dans des conditions défavorables à l'endocytose (voir §3.1 et §3.2), s'accordant avec un franchissement direct de la membrane plasmique. Plusieurs voies d'internalisation pouvant coexister, nous avons choisi de décrire rapidement les différentes grandes voies endocytiques permettant l'internalisation de matériel extracellulaire puis de faire un tour d'horizon des cas où ce matériel a un accès direct aux compartiments intracellulaires non vésiculaires.

4.2.1 Les différentes voies endocytiques¹⁴.

L'endocytose est le processus majeur d'entrée dans la cellule par invagination de nouvelles structures membranaires intracellulaires à partir de la membrane plasmique. Elle se subdivise en un certain nombre de voies qui se distinguent les unes des autres sur la base de critères morphologiques et moléculaires.

L'endocytose dépendante de la clathrine.

L'endocytose dépendante de la clathrine (EDC) est une des voies endocytiques les mieux caractérisées. Elle tient son nom de la protéine d'enveloppe caractérisant ces vésicules, la clathrine. Une très grande variété de protéines est internalisée via cette voie, dont beaucoup de récepteurs membranaires. L'EDC se caractérise par la formation de structures particulières au niveau de la membrane plasmique, les *Clathrin-Coated Pits* (CCP) à partir desquelles vont se former des vésicules d'endocytose. La nucléation de la clathrine au niveau de ces CCPs nécessite l'intervention de protéines adaptatrices, comme les membres du complexe hétérotétramérique AP2 (*Adaptor Protein 2*). Ces dernières induisent la formation d'un réseau de clathrine polymérisée créant ainsi une déformation de la membrane plasmique, en partenariat avec d'autres protéines contrôlant spécifiquement la génération d'une courbure de la membrane (protéines de la famille des *epsins*, protéines à domaines BAR et N-BAR, ...). La scission entre la vésicule en formation et la membrane plasmique fait intervenir une GTPase, la dynamine, qui après hydrolyse de GTP induit la libération de la vésicule dans le cytoplasme. Le manteau de clathrine est ensuite désassemblé sous l'action de la protéine HSC70 et de l'*auxilin*, étape qui nécessite l'hydrolyse d'ATP. La vésicule débarrassée de son enveloppe protéique va ensuite fusionner avec le système endosomal où son contenu sera trié et redirigé vers la dégradation ou de nouveau présenté à la membrane plasmique.

14. Cette partie se base en grande partie sur la revue de G. DOHERTY et H. McMAHON publiée en 2009 [206].

L'endocytose liée aux cavéoles.

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique dont la formation est liée à l'expression des *Caveolins* 1, 2 et 3. Les cavéoles sont présentes dans tous les types cellulaires à l'exception des neurones et des leucocytes. L'expression de la *Caveolin3*, spécifique aux cellules musculaires, ou de la *Caveolin1* suffit à la formation de cavéoles. Ces dernières sont des structures enrichies en lipides spécifiques, comme le cholestérol ou certains glycosphingolipides, au niveau desquels s'accumule la *Caveolin1*. Bien que très peu dynamiques en apparence car en majorité (95%) accolées la membrane plasmique, les cavéoles sont impliquées entre autres l'internalisation du récepteur à l'insuline, de certains sphingolipides, certains enterovirus ou encore de la vitamine D3. Bien qu'initialement considérée comme étant également la voie d'entrée du virus SV40 (*Simian Virus 40*) [207, 208], il a été démontré que seule une très faible proportion de l'internalisation de SV40 résulte d'une endocytose dépendante des cavéoles [209]. A l'instar des sous-unités B de la toxine cholérique (CTxB) ou de la Shiga toxine (STxB), le virus SV40 est capable de déclencher sa propre voie endocytique à la suite de sa fixation à certains sphingolipides (GM1 pour SV40 et CTxB, Gb3 pour STxB) présents à la surface de la cellule, et notamment au niveau des cavéoles. Le devenir des vésicules formées suite à une endocytose dépendante des cavéoles reste cependant mal connu, faute de déterminants moléculaires formellement identifiés.

L'endocytose liée à la *Flotillin*.

Les *Flotillins* 1 et 2 sont des protéines s'associant avec des microdomaines membranaires par l'intermédiaire d'acylations (palmitoylations et myristoylations) et par fixation spécifique au cholestérol. L'expression des *Flotillins* 1 et 2 engendre la formation de structures membranaires très proches, d'un point de vue structural, de celles induites par les *Caveolins*. Leurs implications dans une voie d'endocytose nouvelle provient d'observations montrant l'association de la *Flotillin-1* avec des structures endocytiques dépourvues de tout marqueur d'EDC. De plus, dans des conditions où la formation de CCP est inhibée, des vésicules intracellulaires positives pour la *Flotillin-1* et CTxB sont observées, suggérant une voie alternative d'internalisation. Enfin, une déplétion en *Flotillin-1* entraîne une baisse de l'internalisation de la protéine liée à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) CD59. Néanmoins, l'existence d'une voie d'endocytose totalement dépendante de la *Flotillin* fait encore débat, certains suggérant plutôt un rôle de facilitation de l'EDC de certaines protéines comme APP (*Amyloid Precursor Protein*), le transporteur de la dopamine DAT ou le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), par une action en amont de la *Flotillin* qui permettrait le regroupement de ces protéines dans des domaines membranaires pré-endocytiques.

L'endocytose de type CLIC/GEEC.

Un certain nombre de glycosphingolipides et de protéines à ancre GPI sont internalisés par l'intermédiaire de structures tubulaires, nommées CLIC (pour *CLathrin-Independent Carrier*) dont la formation est régulée par les petites protéines à activité GTPase CDC42 et ARF1. La scission entre ces structures

tubulaires et la membrane plasmique est indépendante de la dynamine. La protéine GRAF1 (pour *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1*) est un marqueur identifié de ces CLICs, et une réduction de son expression induit une baisse de l'endocytose via cette voie. Les molécules internalisées via ces CLICs s'accumulent au niveau d'un compartiment endosomal précis, le GEEC (pour *GPI-AP-enriched Early Endosomal Compartment*) dont le devenir semble dépendre notamment du type cellulaire, avec un adressage vers les compartiments lysosomaux ou de recyclage pericentriolaires. Il est intéressant de noter que cette voie endocytique semble être impliquée dans une part non-négligeable de l'internalisation de phase fluide.

La macropinocytose.

La macropinocytose désigne l'absorption de matériel extracellulaire par l'intermédiaire de déformations de la membrane plasmique (appelées « *ruffles* »). A l'inverse des voies déjà évoquées, l'internalisation par macropinocytose n'est pas déclenchée directement par un récepteur de surface ou un signal extracellulaire, mais est liée au cytosquelette d'actine. L'activation de certaines petites protéines G comme CDC42 ou RAC1 par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine-kinase, comme l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ou le PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), induit une polymérisation accrue de l'actine au niveau sous-membranaire. Ces filaments d'actine nouvellement assemblés génèrent une extension de la membrane plasmique et la formation de larges protrusions planaires en direction de l'espace extracellulaire. La fusion entre l'extrémité de ces extensions et la membrane plasmique induit la formation de structures vésiculaires intracellulaires appelées macropinosomes, emprisonnant de larges volumes de fluide extracellulaire. Le devenir de ces macropinosomes reste incertain même s'il apparaît qu'une partie est incorporée dans le système endosomal/lysosomal tandis que d'autres macropinosomes fusionnent à nouveau avec la membrane plasmique.

La phagocytose.

La phagocytose se distingue des voies pinocytiques présentées ci-dessus car elle consiste en la capture par la cellule de particules solides¹⁵. Ce type particulier d'endocytose est surtout observée dans les cellules immunitaires comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques ou les neutrophiles, qui sont capables d'internaliser des pathogènes (bactéries, protozoaires, ...) et des débris cellulaires. La phagocytose participe à l'immunité innée en permettant la reconnaissance puis la destruction de nombreux pathogènes par les macrophages, et dans un deuxième temps, à l'immunité acquise permettant l'activation de certains lymphocytes après la présentation à la surface d'antigènes issus de la dégradation de pathogènes. Une phagocytose restreinte aux corps apoptotiques est aussi observée chez certains fibroblastes et cellules épithéliales ou endothéliales. Elle pourrait être impliquée dans le remodelage tissulaire, notamment en évitant des réactions inflammatoires liées à des événements apoptotiques programmés. D'un point de vue moléculaire, la phagocytose est dépendante de

15. Etymologiquement parlant, le terme pinocytose vient du grec $\pi\acute{\iota}\nu\omicron$, $\pi\acute{\iota}\nu\omicron$ (« boire ») et $\kappa\upsilon\tau\omicron\varsigma$, $\kappa\upsilon\tau\omicron\varsigma$ (« creux, cavité, cellule »), tandis que phagocytose vient du grec ancien $\phi\alpha\gamma\epsilon\acute{\iota}\nu$ (« manger, dévorer »).

différents récepteurs de surface capables de reconnaître des pathogènes opsonisés (anticorps ou facteurs du complément), des motifs présents à la surface de ces mêmes pathogènes (lipopolysaccharide, β 1,3-glucane, ...) ou encore les phosphatidylsérine exposées sur la surface externe des corps apoptotiques. L'activation de ces récepteurs déclenche des cascades de signalisation diverses qui aboutissent toutes à un remodelage de la membrane plasmique, notamment par des modifications locales de la composition en lipides ($PI(3,4)P_2$, $PI(4,5)P_2$, $PI(3,4,5)P_3$) et par une polymérisation locale de filaments d'actine. Des prolongements de la membrane plasmique (pseudopodes) vont ainsi venir « englober » la particule qui, après un événement de scission, va se retrouver internalisée au sein d'une structure vésiculaire, le phagosome. L'acidification progressive de ces phagosomes et leur fusion avec des lysosomes aboutit à la formation de phagolysosomes où sera dégradé le matériel phagocyté.

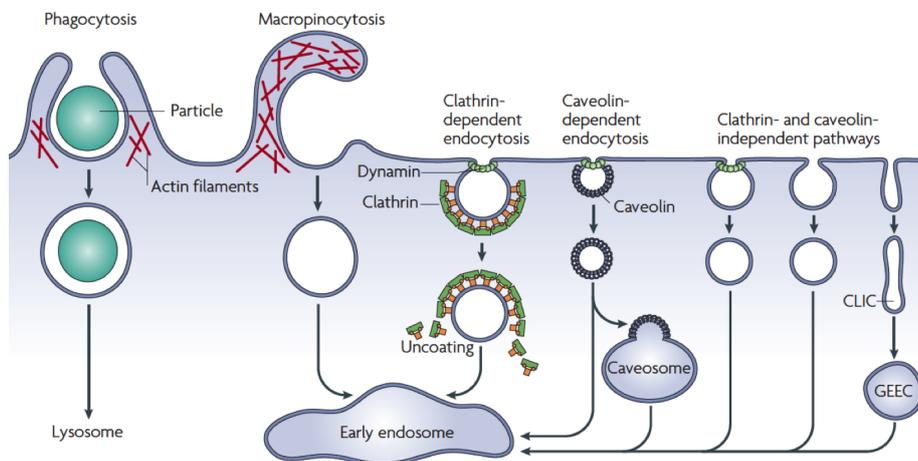


FIGURE 7 – Les principales voies endocytiques. Tiré de [210].

4.2.2 Détournement des voies endocytiques.

Les voies endocytiques présentées jusqu'ici ne permettent pas l'accès au cytosol du matériel internalisé, celui-ci se trouvant confiné à différents niveaux du réseau endosomal. Cependant un certain nombre d'exemples ont été rapportés pour lesquels on peut observer un détournement de la voie endocytique aboutissant à la libération des protéines dans le cytosol. Deux cas de figure se présentent, soit une translocation au travers de la membrane des endosomes, soit un transport rétrograde jusqu'au reticulum endoplasmique à partir duquel la protéine s'échappe ensuite. Parmi ces différentes protéines, on retrouve principalement des toxines bactériennes ou végétales ainsi que des protéines virales. Si une multitude de voies d'endocytose participe à l'internalisation de ces toxines, ces dernières se retrouvent toutes, une fois internalisées, au niveau du système endosomal.

4.2. APRÈS LA SÉCRÉTION : DIFFÉRENTS MODE D'INTÉGRATION DU SIGNAL TRANSMIS.

TABLEAU 1 – Les différentes grandes voies endocytiques. Adapté de [206].

Voies endocytiques	Morphologie	Protéines internalisées	Petite protéine G impliquée	Implication de la dynamine ?	Autres protéines impliquées
Dépendante de la clathrine	Vésiculaire	Récepteurs tyrosine kinase, récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G, récepteur de la transferrine, ...	RAB5, ARF6	oui	Clathrine, AP2, epsin, SNX9, synaptojanin, actine, amphiphysin, ...
Dépendante des cavéoles ^a	Vésiculaire / tubulaire	récepteur à l'insuline, protéines couplées à une ancre GPI	CDC42 éventuellement	possible	Caveolins, Cavins, Pacsin 2, PV-1, src, PKC, actine
Liée à la Flotillin ^b	Vésiculaire	CTxB, CD59, protéoglycanes	inconnue	débatue	Flotillin 1 et 2, kinases de la famille Src
CLIC/GEEC ^c	Tubulaire / en forme d'anneau	marqueurs de phase fluide, CTxB, protéines à ancre GPI	CDC42, ARF1	non	ARHGAP10, actine, GRAF1 et autres protéines GRAFs
Macropinocytose ^d	De type "ruffle"	Marqueurs de phase fluide, récepteurs tyrosine kinase	CDC42, RAC1	non	Actine, PAK1, PI3K, Ras, Src, HDAC6, Arp2/3
Phagocytose ^e	Dépendant du matériel internalisé	Pathogènes, débris apoptotiques	ARF6, CDC42, RAC1, RhoA	oui	Actine, Arp2/3, FcRs, récepteurs du complément, intégrines, ROCK, PI3K, SHIP, ...

^a. pour revue [211].

^b. pour revue [212].

^c. pour revue [213].

^d. pour revue [214].

^e. pour revue [215].

Transfert des endosomes vers le cytosol.

Le premier moyen pour ces toxines d'avoir accès au cytosol consiste à s'échapper du compartiment luminal des endosomes en traversant leur membrane. C'est le cas de la toxine diphtérique [216], de la toxine de l'anthrax [217], des neurotoxines clostridiales [218], du CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) [219], de la toxine C2 de *Clostridium botulinum* [220], de la toxine B de *Clostridium difficile* [221], de la toxine de *Pasteurella multocida* (PMT) [222], ou encore de l'exotoxine A de *Pseudomonas* (PE)[223]. Toutes ces toxines, regroupées sous le terme de toxines de type AB, présentent des structures relativement similaires avec un domaine catalytique responsable de la toxicité (désigné comme domaine A) et un domaine impliqué quant à lui dans la translocation à proprement parler de la protéine (désigné comme domaine B). Ces domaines peuvent être portés par des sous-unité différentes¹⁶ (toxine diphtérique, toxine de l'anthrax, PMT, toxine C2 de *Clostridium botulinum*, neurotoxines clostridiales) ou réunis sur une même chaîne polypeptidique (CNF1, toxine B de *Clostridium difficile*, PE). Dans l'ensemble de ces cas, l'environnement acide au sein des endosomes en cours de maturation est une condition *sine qua non* pour la translocation de la protéine au travers de la membrane. L'acidification du milieu entraîne une modification de la conformation de la sous-unité B puis son insertion dans la membrane endosomale, sous forme de pore, permettant ensuite le passage de la sous-unité catalytique vers le cytosol.

La protéine virale Tat déjà évoquée précédemment (voir §4.1.2, Translocation directe au travers de la membrane plasmique) est elle aussi transférée des endosomes au cytosol en réponse à une acidification [224]. De façon similaire aux toxines bactériennes, la baisse du pH endosomal induit un changement de conformation de Tat favorisant une exposition plus importante du tryptophane en position 11. L'accessibilité accrue de ce tryptophane dans des conditions acides va permettre son insertion dans les membranes lipidiques, et ainsi initier la translocation de Tat (des mutants W11A ou W11L étant incapables de s'insérer dans des membranes lipidiques). La région basique comprise entre les résidus 49 et 57 est aussi impliquée dans cette translocation en remplissant le rôle de senseur de pH (conjointement avec l'acide glutamique en position 2), mais aussi en permettant une stabilisation de l'interaction entre Tat et les membranes lipidiques [225]. Enfin, les protéoglycanes, et les HSPGs, sont essentiels pour l'internalisation de Tat, cette protéine n'étant plus internalisée dans des cellules dépourvues de HSPGs [226].

Transport rétrograde.

Un autre moyen mis en œuvre par certaines protéines pour avoir accès au cytosol après leur endocytose consiste à « remonter » la voie de sécrétion standard, du système endosomal jusqu'au reticulum endoplasmique, en passant par l'appareil de Golgi. Les deux exemples les mieux renseignés de transport rétrograde sont les toxines bactériennes de type Shiga (Stx1 et 2, Stx) produites respectivement par certaines souches d'*Escherichia coli* ou de *Shigella dysenteriae* et la ricine produite par l'arbrisseau *Ricinus communis*. Dans le cas des Stx (qui sont des toxines de type AB₅, c'est-à-dire une sous-unité de type A associée à 5

16. Suite à un clivage protéolytique d'un précurseur, ou via l'association de deux sous-unités distinctes dans le cas de la toxine C2 de *Clostridium botulinum* et de la toxine de l'anthrax.

sous-unités de type B), la protéine est transférée des endosomes précoces ou de recyclage vers le TGN [227]. Cette étape requiert l'implication de la clathrine [228] et du complexe hétéropentamérique *retromer* [229, 230]. Ensuite, la toxine est transférée du TGN vers le reticulum endoplasmique selon des mécanismes encore mal connus, mais qui ne dépendent pas de la voie classique d'échange entre l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique (voie COP-I) [231, 232]. Au cours de ce cheminement (probablement au niveau endosomal), le clivage protéolytique de la sous-unité A produit deux fragments StxA1 et StxA2 qui restent liés entre eux par l'intermédiaire d'un pont disulfure [233, 234]. Une fois au sein du reticulum endoplasmique, ce pont disulfure est réduit, libérant StxA1 qui va alors interagir avec des membres de la machinerie de dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (comme HEDJ, BiP ou GRP64). Le détournement cette voie de dégradation des protéines mal repliées va permettre à StxA1 d'être dirigée vers le translocon, conduisant à ainsi sa rétro-translocation dans le cytosol [235, 236].

4.3 Implications physiologiques du transfert intercellulaire des homéoprotéines.

Au-delà de la singularité de ce comportement à l'échelle cellulaire pour une famille de facteurs de transcriptions, le transfert intercellulaire des homéoprotéines offre à ces dernières un moyen d'action inédit. Comme évoqué précédemment (voir §3.4), le transfert *in vivo* des homéoprotéines a été rapporté dans plusieurs contextes. Dans chacun de ces cas, ce mode d'action paracrine s'est avéré indispensable à la fonction physiologique des homéoprotéines et être associé à des situations pathologiques.

4.3.1 Action paracrine de l'homéoprotéine OTX2.

Les protéines ENGRAILED et OTX2 représentent probablement les deux exemples les mieux documentés du rôle physiologique du transfert intercellulaire des homéoprotéines. OTX2 est notamment impliqué dans la régulation de la plasticité post-natale du cortex visuel chez la souris. La mise en place de la vision binoculaire dépend de la maturation de circuits neuronaux durant d'une fenêtre de temps donnée (appelée période critique), sous l'influence de stimuli visuels environnementaux. Il a ainsi été démontré que OTX2, qui n'est pas exprimé dans le cortex visuel, s'accumule pourtant dans une sous-population d'interneurones GABAergiques de la couche IV du cortex visuel, les neurones à parvalbumine (PV). Cette accumulation résulte donc d'un transfert intercellulaire d'OTX2. La stimulation visuelle déclenche l'ouverture de la période critique via la maturation des neurones PV et en particulier, l'induction chez ces neurones de l'expression d'un large répertoire de protéoglycanes formant un réseau dense nommé *PeriNeuronal Net* (PNN) [87]. Certains composants de ce PNN (des protéoglycanes à chaînes de type chondroïtine-sulfate) interagissent spécifiquement avec OTX2 présente dans le milieu extracellulaire via un domaine précis de la protéine (un doublet RK situé juste en amont de l'homéodomaine), induisant l'internalisation ciblée de la protéine dans ces cellules précisément [88]. Les sources principales de la protéine OTX2 extracellulaire sont les plexus choroïdes, des structures pseudo-épithéliales baignant dans le

liquide céphalo-rachidien qui expriment fortement OTX2. En effet, l'inactivation de l'expression d'OTX2 dans les plexus choroïdes entraîne une réduction drastique de l'accumulation de la protéine dans les neurones PV du cortex visuel [89]. OTX2 est également responsable de la fermeture de la période critique visuelle et du maintien, à l'âge adulte, d'un état non-plastique du cortex visuel (Fig. 8).

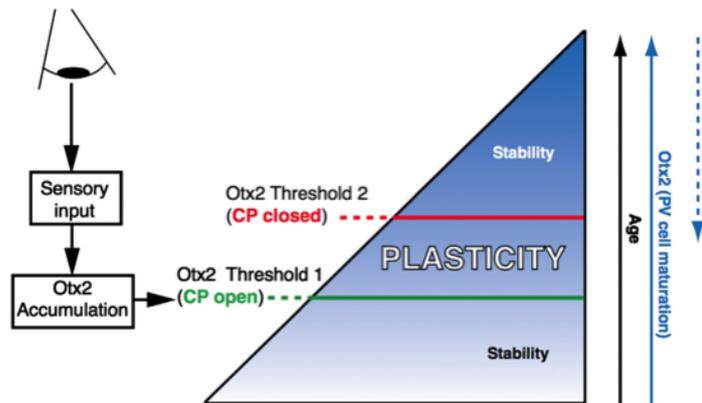


FIGURE 8 – **Modèle de régulation par OTX2 de la plasticité du cortex visuel.** Les 1^{er} stimuli visuels initient le transfert d'OTX2 dans les neurones PV, entraînant leur maturation fonctionnelle et l'ouverture d'une période de plasticité corticale (*Threshold 1*). Durant cette période critique (CP), la condensation des PNNs autour des neurones PV conduit à une accumulation grandissante d'OTX2 qui aboutit à la stabilisation des circuits neuronaux locaux (*Threshold 2*). Tiré de [89].

4.3.2 Action paracrine de l'homéoprotéine ENGRAILED.

Le transfert intercellulaire de EN-2 a lui aussi été impliqué dans plusieurs situations physiologiques. Des premières expériences menées *in vitro* ont permis d'illustrer un rôle de EN-2 dans le guidage axonal. En réponse à un gradient extracellulaire de EN-2, les axones des neurones ganglionnaires de la rétine (RGCs) modifient leur trajectoire en fonction de leur origine topologique. Ainsi, les axones des RGCs localisés dans la partie temporale de la rétine sont repoussés par des concentrations croissantes de EN-2 dans le milieu tandis que les axones des RGCs de la partie nasale sont eux attirés. Une version mutante de EN-2, EN2SR, incapable d'être internalisée (mutée au niveau du doublet WF, voir §3.3.2) n'a aucun effet sur le guidage de ces axones, confortant ainsi l'importance de l'internalisation de EN-2 dans la réponse des axones. La synthèse protéique locale au niveau du cône de croissance de ces axones est impliquée, l'internalisation de EN-2 provoquant la phosphorylation de facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E et 4E-BP1). De plus, une réponse de ces axones à EN-2 est observée dans des cônes de croissance isolés du corps cellulaire neuronal ainsi qu'après une inhibition de la transcription (α -amanitine), mais est fortement réduite après une inhibition de la traduction (anisomycine) [237]. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, où l'existence d'un gradient antéro-postérieur extracellu-

laire d'EN (EN-1 et EN-2 collectivement) a été mis en évidence dans le tectum optique du xénope (structure vers laquelle les RGCs projettent leurs axones). L'expression, au niveau du tectum optique, d'un anticorps simple chaîne sécrété dirigé contre EN perturbe l'établissement de la carte topographique normale de projection des RGCs (les RGCs nasaux projettent sur la partie la plus postérieure du tectum, et les RGCs temporaux sur une partie plus antérieure) [238]. L'analyse approfondie du mécanisme d'action paracrine de ENGRAILED a mis en lumière une forte synergie avec les voies de régulation classiques du guidage axonal de type ligand/récepteur (ici voie Eph/Ephrin), par le biais d'une signalisation purinergique [239].

L'action paracrine de EN est également impliquée dans la formation d'une structure précise de l'aile chez la drosophile. L'expression de EN délimite la partie postérieure du disque imaginal de l'aile chez la larve de drosophile. Il a pu être démontré que la protéine EN exprimée précisément dans une étroite bande de cellules situées dans la partie la plus antérieure de son domaine d'expression était impliquée dans la formation de la veine transverse antérieure (ACV, *Anterior Cross Vein*). Ici aussi, au niveau de cellules avoisinantes de la région antérieure, la protéine EN extracellulaire agit en synergie (directe ou indirecte) avec les voies de signalisation connues pour leur action dans la formation de l'aile (voie Dpp) [240].

Ces résultats nous ont incité à développer de nouveaux modèles d'étude de l'action paracrine de cette homéoprotéine, en bénéficiant des facilités expérimentales propres au modèle du poisson zèbre. Ils seront abordés dans la partie suivante de ce manuscrit.

4.3.3 Autres modèles d'action paracrine.

L'homéoprotéine VAX1 est capable de transfert intercellulaire *in vivo* au cours du développement du nerf optique. Ce transfert a lieu entre des cellules du noyau ventro-medial de l'hypothalamus et les axones des RGCs, au niveau du futur chiasma optique. La protéine VAX1 remplit ici un rôle de guidage axonal semblable à celui décrit initialement pour EN, mais régulant dans ce cas les projections des axones des RGCs vers les hémisphères cérébraux situés à l'opposé à leur rétine d'origine. Les protéoglycanes exprimés à la surface des RGCs, et notamment certains HSPGs, permettraient de restreindre l'internalisation de VAX1 à ces mêmes cellules (*ex vivo* en tout cas). Une fois internalisé au niveau des axones des RGCs, VAX1 modulerait la synthèse protéique locale, comme le suggère son association avec des protéines ribosomales ou des facteurs d'initiation de la traduction [92].

Le rôle du transfert intercellulaire de l'homéoprotéine PAX6 a été mis en évidence, dans deux contextes différents, respectivement le poisson zèbre et le poulet. Pour le premier, il a été démontré que l'activité paracrine de PAX6 était essentielle au développement de l'œil. La rétention dans le milieu extracellulaire de la protéine PAX6, par l'injection dans l'espace intercellulaire, au stade blastula, d'anticorps dirigés contre la protéine PAX6 ou l'expression par l'embryon lui-même, d'anticorps simple chaîne sécrétés dirigés contre PAX6, entraîne des défauts majeurs de développement de l'œil (dissymétrie des yeux, absence d'un ou des deux yeux). Ces phénotypes corrélaient avec la diminution de l'expression de l'ARN messager de PAX6 au niveau du territoire présomptif de l'œil [90]. La deuxième étude a mis en évidence l'activité paracrine de PAX6 au niveau

du tube neural, durant le développement embryonnaire du poulet. Dans cette structure, la protéine PAX6 extracellulaire favorise la migration des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC), *ex vivo*. Comme dans l'exemple précédent, l'expression par l'embryon d'un anticorps simple chaîne sécrété dirigé contre PAX6 diminue l'étendue de la migration des OPCs. Dans une stratégie opposée de gain de fonction, l'expression ectopique d'une version artificiellement sécrétée de PAX6, suite à une électroporation unilatérale *in ovo*, stimule une augmentation de la migration des OPCs du côté électroporé du tube neural. Dans ces mêmes conditions expérimentales, l'expression d'une version de PAX6 comportant une mutation du doublet WF requis pour l'internalisation des homéoprotéines (voir §3.2) n'entraîne aucun changement de migration des OPCs, corroborant le rôle du transfert intercellulaire de PAX6 dans le contrôle de la migration des OPCs [91].

Un autre cas de transfert intercellulaire a récemment été décrit *in vivo* chez l'embryon de xénope. L'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, durant la gastrulation, met en jeu un processus particulier, nommé signalisation verticale caractérisée par le transfert de l'identité positionnelle, selon l'axe antéro-postérieur, du mésoderme vers le neuroectoderme le recouvrant. L'expression des gènes de la famille *Hox* étant initiée au niveau du mésoderme au cours de la gastrulation puis étendue au neuroectoderme, N. BARDINE et al. [93] ont proposé qu'ils puissent être les vecteurs de ce transfert d'information positionnelle. Dans des expériences menées *ex vivo*, ils ont pu montrer que l'expression des gènes *Hoxd1*, *Hoxb4* et *Hoxb9* dans le mésoderme induisait leur propre expression dans le neuroectoderme adjacent. De plus l'expression ectopique de gènes *Hox* (*Hoxb4* et *Hoxc6*) au niveau du mésoderme induit également leur expression dans le neuroectoderme, ce qui permet de penser que ce comportement est commun aux gènes *Hox*. La visualisation dans ce système *ex vivo* du transfert, du mésoderme vers le neuroectoderme, de l'homéodomaine de HOXD1 couplé à la GFP, ainsi que de la protéine HOXD1 entière suggèrent fortement un rôle majeur du transfert intercellulaire des homéoprotéines de la famille HOX dans le processus de signalisation verticale.

4.3.4 Action paracrine des homéoprotéines et pathologies.

Récemment, le dérèglement de l'activité non-cellulaire-autonome directe d'une homéoprotéine a pu être mis en lien avec une situation pathologique. L'homéoprotéine NKX3.1 inhibe la prolifération des cellules épithéliales de la prostate et à ce titre, exerce une action anti-tumorale dans les cancers de la prostate. Cet effet anti-prolifératif peut être transmis de manière non-cellulaire-autonome par transfert direct de la protéine entre cellules. Une mutation ponctuelle au sein de la protéine NKX3.1 entraînant la substitution d'un seul acide aminé (T164A) et associée à des formes héréditaires de cancer de la prostate inhibe spécifiquement la sécrétion de la protéine sans altérer son activité transcriptionnelle. Plus intrigant encore, l'accumulation de NKX3.1 dans le milieu extracellulaire (fluide prostatique, urine) est inhibée dans des modèles animaux de tumeurs induites par la délétion du gène codant pour la phosphatase PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), enzyme impliquée dans le métabolisme des P(4,5)IP2 [241]. Ces observations peuvent être reliées à la détection de la protéine EN-2 dans les fluides urinaires après sécrétion par les cellules tumorales, qui pourrait être utilisé comme marqueur de certains cancers de la prostate ou de la vessie

4.3. IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES DU TRANSFERT INTERCELLULAIRE DES HOMÉOPROTÉINES.

[242, 243]. On peut donc facilement envisager d'autres situations où la dérégulation de l'activité paracrine des homéoprotéines pourraient être associée à des situations pathologiques.

Deuxième partie

Matériels et méthodes

Culture cellulaire. Les expériences de culture cellulaire présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur des cellules HEK293 Flp-InTM TrexTM (Life Technologies), CHO-K1 ou HeLa. HEK293 et HeLa ont été cultivées dans du DMEM (Gibco) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les CHO-K1 ont été cultivées dans du milieu F-12K (Gibco) contenant également 10 % de SVF.

Transfection transitoire. Les transfections transitoires ont été réalisées avec de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. Dans le cas de co-transfections, les deux plasmides d'intérêt sont inclus dans les mêmes proportions dans le mélange de transfection.

Western blot. Dans le cas d'extraits cellulaires totaux, 24 heures après transfection, les cellules sont lavées deux fois en PBS, puis lysées directement dans un tampon de Laemmli 1X. Les lysats cellulaires sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 10 minutes. Dans le cas d'un fractionnement cellulaire, le tampon de Laemmli est ajouté directement dans les différentes fractions (après traitement dans le cas des traitements à la néomycine, et après sonication pour les fractions nucléaires) à une concentration finale de 1X. Les différentes fractions sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 10 minutes. Les protéines présentes dans ces différents échantillons sont ensuite séparées par SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de type PVDF (Immobilon, Millipore). La membrane est ensuite saturée avec une solution de TBS, Tween-20 0,1 %, lait 5% (ou BSA 4% lorsque indiqué) pendant au moins 1 h à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées dans la même solution avec l'anticorps primaire d'intérêt sur la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées trois fois 15 minutes avec du TBS Tween-20 0,1%, puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la *Horseradish peroxidase* pendant 1 h à température ambiante. Après lavage avec une solution de TBS, Tween-20 0,1% (3 x 15 minutes), la révélation de l'activité peroxydase est réalisée en utilisant des réactifs luminescents (ECL Plus, GE Healthcare ; SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoFisher Scientific) et détectée avec imageur (Fuji LAS-4000).

Quantification de la sécrétion par cytométrie en flux. Sauf lorsque la température est indiquée, tout le protocole suivant est réalisé à 4°C. Pour chaque condition, 24 heures après l'induction de l'expression des protéines d'intérêt (après transfection transitoire ou lignées stables) avec de la doxycycline 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, les cellules, cultivées dans des plaques 12 puits (Nunc), sont lavées deux fois avec 2 ml de PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (PBS -/-). Les cellules sont ensuite décollées dans 2 ml de PBS -/-, EDTA 2 mM puis centrifugées à 145 rcf, 4°C durant 6 min en présence de SVF 10 %. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans 400 μl de PBS -/-, SVF 2 % puis répartis en deux fois 200 μl dans une plaque 96 puits à fonds coniques et centrifugés pendant 3 min à 145 rcf, 4°C. Après aspiration du surnageant, les cellules sont incubées dans 50 μl d'anticorps primaire(s) dilué(s) dans du PBS -/-, SVF 10 % pendant 45 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec 150 μl de PBS -/-, SVF 2% (centrifugation 145 rcf, 4°C, 3min, entre chaque lavage) puis incubées dans 50 μl d'anticorps secondaire(s) dilué(s) dans du PBS -/-, SVF 10 % comprenant un marqueur de mort cellulaire (TO-PRO 3, 1 :1000, Invitrogen) pendant 30 min à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées comme décrit précédemment puis resuspendues

dans 200 μ l de PBS -/-, SVF 2%. Les échantillons sont ensuite analysés avec un cytomètre FACSCalibur (BD Biosciences). L'acquisition et la quantification des données sont réalisées avec le logiciel BD CellQuest pro (BD Biosciences).

Internalisation. Pour les expériences d'internalisation, les cellules ont été déposées sur des plaques 8-puits μ -slide (Ibidi) pré-enduites avec de la poly-D,L-ornithine 1,5 μ g.ml⁻¹ pendant 1h à température ambiante (HEK293 et CHO-K1 à 2.10⁵ cellules par puit, HeLa à 10⁵ cellules par puit). Lorsque des lignées stables de HEK293 sont utilisées, l'expression de la protéine est induite 2 h après dépôt des cellules par l'ajout de doxycycline à une concentration finale de 0,5 μ g.ml⁻¹. Après 24 h de culture, le milieu est ôté, et les cellules sont incubées 1 h à 37°C dans 250 μ l de DMEM (HEK293 et HeLa) ou F-12K (CHO-K1) sans SVF, contenant la protéine fluorescente d'intérêt à une concentration finale de 500 nM. L'internalisation de la protéine fluorescente dans les cellules est ensuite visualisée directement (condition -BT) ou après ajout de bleu de trypan à une concentration finale de 0,1 % (condition +BT) absorbant la fluorescente associée à la protéine libre dans le milieu. Les images ont été acquises via l'utilisation d'un microscope de type *spinning-disk* couplé à une caméra EMCCD (Evolve).

Fractionnement subcellulaire. Pour le fractionnement subcellulaire, des cellules HEK293 sont cultivées dans des boîtes de culture de 150 cm² (TPP). Lorsque la culture atteint une confluence de 70 à 80 %, les cellules sont transfectées avec des vecteurs d'expression pour les protéines d'intérêt. Pour chaque condition, 24 heures après l'induction de l'expression des protéines d'intérêt avec de la doxycycline 0,5 μ g.ml⁻¹, les cellules sont lavées avec 5 ml de PBS -/- froid. Les cellules sont récoltées par grattage dans 10 ml de PBS -/- froid contenant des inhibiteurs de protéases (Complete protease inhibitor cocktail, Roche). Les cellules sont ensuite centrifugées 10 minutes à 100 rcf, 4°C et le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de tampon hypotonique de lyse ménagée (Hepes 10 mM, KCl 10 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3mM). Les cellules sont à nouveau centrifugées 10 minutes à 100 rcf, 4°C puis resuspendues dans 500 μ l de tampon de lyse ménagée. Après 5 minutes dans le tampon de lyse, les cellules sont lysées mécaniquement avec un homogénéisateur de Dounce (Wheaton) afin de préserver les noyaux intacts. Du sucrose 2 M est ajouté au lysat cellulaire à hauteur de 10 % du volume (0,2 M final). Le lysat cellulaire est centrifugé 10 minutes à 1000 rcf, 4°C, afin de séparer fraction nucléaire et non nucléaire (PNS). La fraction PNS est ensuite déposée sur un double coussin d'OptiPrep (OptiPrep density gradient medium, Sigma) 8 % / 25 %, puis centrifugée 2 h à 100 000 rcf, 4°C. La fraction cytosolique est prélevée au dessus du coussin d'OptiPrep. La fraction membranaire est prélevée à l'interface entre les deux phases d'OptiPrep de densités différentes. Dans les cas d'un traitement à la néomycine, le culot membranaire est ensuite resuspendu dans 500 μ l de tampon de lyse ménagée, sucrose 0,2 M, et séparé en deux parties égales dans une desquelles de la néomycine est ajoutée à une concentration finale de 10 mM. Après 30 minutes sur glace, les membranes traitées ou non sont centrifugées 30 minutes à 100 000 rcf, 4°C. Le surnageant (sn.) et le culot (cu.) sont ensuite préparés pour analyse par *western blot*. Dans le cas d'un traitement de la fraction nucléaire à la néomycine, il est procédé de la même manière, la centrifugation s'effectuant pendant 10 minutes à 10 000 rcf, 4°C.

Immunocytochimie. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre pré-enduite avec de la poly-D,L-ornithine $15 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pendant au moins 1 h. Après 24 h d'induction, les cellules sont fixées sont lavées deux fois à l'aide de PBS -/- puis fixées dans du PBS -/-, paraformaldéhyde 4 % (si perméabilisation) ou PBS -/-, paraformaldéhyde 1 % (si pas de perméabilisation) pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de PBS -/-, triton X-100 0,3 % pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes dans du PBS -/-, SVF 10 % afin de saturer les sites de liaison aspécifiques. Les lamelles sont ensuite incubées 1 h avec les anticorps primaires dans du PBS -/-, SVF 10 %, lavées 3 fois avec du PBS -/-, puis incubées avec les anticorps secondaires dans du PBS -/-, SVF 10 % pendant 1 h à l'obscurité. Les lamelles sont lavées 3 fois dans du PBS -/-, rincées à l'eau osmosée puis montées dans 10 μl de Dako fluorescent mounting medium (Dako) contenant du Hoechst 33342 $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Pour l'immunomarquage des phosphoinositides membranaires, le protocole utilisé est le même que celui décrit dans [244].

Production de protéines recombinantes. Les séquences codantes pour les protéines d'intérêt sont insérées en phase avec des étiquettes permettant leur purification (6his ou GST) séparées par un site de clivage à la protéase HRV3C (Prescission) dans un plasmide d'expression bactérien sous contrôle d'un promoteur T7. Après transformation avec le plasmide d'expression, les bactéries SE1 (Eurogentec) sont cultivées (24h, 28°C , 200 rpm) dans un milieu auto-inducteur (Magic Media, Life technologies). Le culot bactérien est lavé puis lysé par sonication (Bioruptor, Diagenode) en présence de nucléase (Pierce) et d'inhibiteurs de protéases (Complete protease inhibitor cocktail, Roche). Après centrifugation, la fraction soluble contenant la protéine recombinante est purifiée sur FPLC (AKTA-Prime) par chromatographie d'affinité (Colonne histidine ou glutathion) selon les recommandations du fournisseur. La protéine recombinante est clivée par la Prescission (3h, 4°C) et soumise à une deuxième étape de purification sur colonne d'héparine. Après élution (gradient linéaire NaCl 300-2000 mM), les fractions enrichies en protéine sont vérifiées sur SDS-PAGE et dialysées extensivement (tampon phosphate 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5; 24h, 4°C).

Préparation de la protéine fluorescente. La protéine purifiée et dialysée est ajustée à $100 \mu\text{M}$ et incubée avec une solution de fluorescéine isothiocyanate (concentration finale 150-200 μM) dans un tampon sodium carbonate (50 mM, pH 9,2) sous agitation douce (12h, 4°C). La fluorescéine libre est éliminée par dialyse (tampon phosphate 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5; 24h, 4°C) et la protéine marquée est vérifiée sur SDS-PAGE. Le profil caractéristique de la protéine EN-2 marquée, révélée par marquage en Bleu de Coomassie (1) ou directement par fluorescence (2) est montré figure 9.

Anticorps. Les anticorps utilisés dans les différentes expériences présentées comprennent un anticorps monoclonal de souris anti-FGF2 [clone bFM2, Millipore, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ en immunofluorescence (IF), $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ en *western blot* (WB)], un anticorps polyclonal de lapin anti-HA [561, MBL, 1/300 en cytométrie en flux (FACS)], un anticorps monoclonal de souris anti-PI(4,5)P₂ pour WB (clone KT10, Enzo Life Sciences, $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$), un anticorps monoclonal de

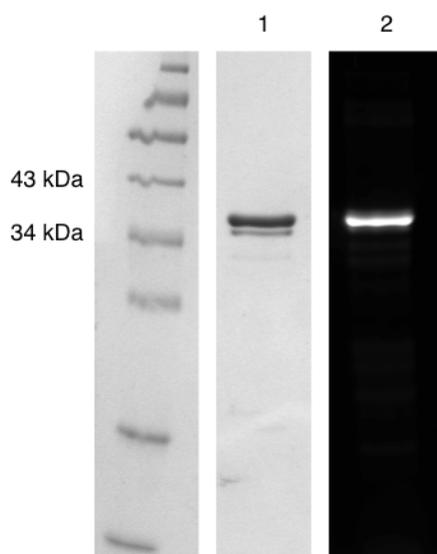


FIGURE 9 – Marquage fluorescent de la protéine EN-2 purifiée.

souris anti-PI(4,5)P₂ pour IF (clone 2C11, Santa Cruz, 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), un anticorps monoclonal de souris anti-PI(4)P pour IF (Z-P004, Echelon, 1/200), un anticorps monoclonal de souris anti-GM130 (clone 35/GM130, BD Transduction Laboratories, 1,25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), un anticorps monoclonal de souris anti-EEA1 (clone 14/EEA1, BD Transduction Laboratories, 1,25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), un anticorps monoclonal de souris anti-SERCA2 (clonne IID8, Santa Cruz, 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), un anticorps polyclonal de lapin anti-GRASP55 (10598-1-AP, Proteintech Europe, 1/400), un anticorps polyclonal de lapin anti-Caveolin1 (610060, BD Transduction Laboratories, 1,25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), un anticorps monoclonal de souris anti-EN-2 pour IF et FACS (clone 4G11, produit au laboratoire, 16 nM), un anticorps polyclonal de lapin anti-EN-2 pour WB (86.8, produit au laboratoire, 1/50 000), des anticorps secondaires anti-IgG de souris couplé à la *Horseradish peroxidase* (LNA931V/AG, GE Healthcare, 1/2000, WB), anti-IgG de lapin couplé à la *Horseradish peroxidase* (LNA934V/AG, GE Healthcare, 1/2000, WB), anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor-488 ou à l'AlexaFluor-561 (Life Technologies, 1,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), anti-IgG de lapin couplé l'AlexaFluor-488 (Life Technologies, 1,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Les réactifs utilisés dans ces expériences sont la *wheat germ agglutinin* couplée à l'AlexaFluor-555 (Invitrogen, 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), la néomycine (Sigma Aldrich).

Test statistique. Dans le cadre des expériences de cytométrie en flux, les résultats ont été analysés par comparaison entre la condition contrôle et une condition donnée à l'aide de *t*-test de Student. Dans le cas où les variances des deux échantillons analysés présentaient une différence significative suite à un test de Fisher, les échantillons ont été analysés en utilisant un *t*-test de Welch. Les valeurs présentées sur les graphes correspondent aux *p-value* à partir desquelles l'hypothèse nulle ne peut pas être rejetée.

Troisième partie

Résultats

En continuité avec les travaux menés au laboratoire [80, 55, 82, 86, 83, 81], cette thèse a eu pour but d’approfondir l’étude des mécanismes cellulaires impliqués dans le transfert des homéoprotéines, en conservant l’homéoprotéine EN-2 comme modèle d’étude. Comme rappelé dans l’introduction de ce document, le transfert intercellulaire des homéoprotéines fait appel à des voies de sécrétion et d’internalisation atypiques, potentiellement propres aux seules homéoprotéines. Néanmoins, en nous basant sur divers cas rapportés dans la littérature de sécrétion et d’internalisation atypiques et de leurs mécanismes associés, nous avons posé la question de l’existence de similitudes entre le transfert intercellulaire d’EN-2 et celui d’autres protéines. Parmi elles, le FGF2 a constitué un candidat de choix, sur la base de propriétés communes partagées avec EN-2. L’étude comparée de la sécrétion du FGF2 (étudiée de manière approfondie par le groupe de W. NICKEL) et d’EN2 a donc constitué le point de départ de ces études. L’émergence de similarités, mais aussi de différences, entre ces deux modes de sécrétion non-conventionnelle nous a permis de mieux cerner le rôle de partenaires impliqués dans le transfert intercellulaire d’EN2, notamment certains lipides comme les phosphatidylinositols (et dans une moindre mesure le cholestérol) et les protéoglycanes de surfaces comme les syndecans. L’étude du rôle de ces divers partenaires dans la sécrétion, mais aussi dans l’internalisation d’EN-2 représente la majeure partie des travaux présentés par la suite. Enfin, l’identification de séquences nouvelles au sein d’EN2 impliquées dans son mode d’action paracrine *in vivo* nous a permis d’élargir le cadre de ces travaux, largement centrés sur des expériences menées *ex vivo*.

Chapitre 5

Etude comparée de la sécrétion du FGF2 et d'EN-2.

Hormis leur sécrétion selon des voies non-conventionnelles, les protéines EN-2 et FGF2 partagent d'autres propriétés communes. C'est en se basant sur ces similarités que nous avons émis l'hypothèse que certains des mécanismes mis en œuvre par le FGF2 pour sa sécrétion pourraient également être utilisés par EN-2. L'étude comparée de la sécrétion de ces deux protéines constitue donc le point de départ dans l'identification de nouveaux partenaires impliqués dans le transfert intercellulaire d'EN-2.

5.1 Propriétés communes.

Bien que leurs fonctions soient assez éloignées, les similitudes entre FGF2 et EN-2 sont apparentes à plusieurs niveaux, moléculaires comme cellulaires. En premier lieu ces deux protéines sont fortement basiques (pI 9,28 pour FGF2 et 10,23 pour EN-2), favorisant ainsi les interactions électrostatiques avec des molécules chargées négativement. L'interaction de EN-2 avec l'ADN et du FGF2 avec l'héparine en sont les deux exemples les plus caractéristiques. A l'échelle cellulaire, notre équipe a mis en évidence des comportements étonnamment similaires des ces protéines. Bien que généralement considérée comme localisée dans le cytosol, la forme sécrétée du FGF2 (de faible poids moléculaire, 18 kDa) est souvent détectée majoritairement dans le noyau. Notre équipe a pu montrer que, similairement aux homéoprotéines, l'adressage nucléaire du FGF2 favorise sa sécrétion. Comme EN-2, le FGF2 est capable d'échanges nucléocytoplasmiques. Son accumulation forcée dans le cytosol induite par l'addition d'une séquence d'export nucléaire (nes) s'accompagne d'une baisse significative de sa sécrétion (Fig 10). Tout au long de cette étude, nous avons analysé en parallèle les comportements des deux protéines FGF-2 et EN-2, du moins lorsque cela était possible.

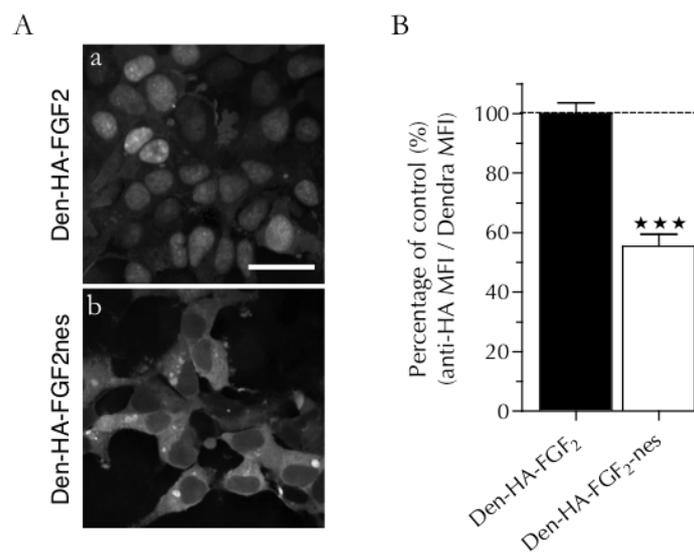


FIGURE 10 – **Effet de la relocalisation cytoplasmique du FGF2 sur sa sécrétion.** (A) Localisation de la protéine FGF2 couplée à la protéine fluorescente Dendra dans des cellules HEK293 exprimant stablement la protéine (a). L'ajout d'une séquence d'export nucléaire à cette protéine de fusion entraîne sa relocalisation quasi-complète dans le cytoplasme (b). La barre d'échelle représente 20 μm . (B) Après 24 h d'induction, l'accumulation à la surface des cellules HEK293 de ces deux protéines suite à leur sécrétion a été mesurée en cytométrie en flux. *** : *p-value* < 0,001.

5.2 Méthode de quantification de la sécrétion.

Tirant parti de la capacité du FGF2 à interagir avec les protéoglycanes de surface, une méthode de quantification de sa sécrétion utilisant la cytométrie en flux a été établie [245, 191]. En effet, la très grande majorité du FGF2 extracellulaire restant associée avec des protéoglycanes à la surface des cellules, ce *pool* extracellulaire de FGF2 peut être quantifié par marquage immunologique à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine sur des cellules non perméabilisées. Il est donc possible d'estimer indirectement la quantité de protéine sécrétée, en utilisant la cytométrie en flux. Cette technique présente de nombreux avantages, et permet notamment l'analyse rapide d'un très grand nombre de cellules vivantes individualisées, et ce avec une très grande sensibilité de détection. La résolution à l'échelle de la cellule permet également de distinguer et de comparer des sous-populations de cellules à partir d'une population hétérogène (par exemple dans le cas de co-cultures, ou de la transfection transitoire). Il faut cependant garder à l'esprit que la quantification de la sécrétion n'est pas absolue mais restreinte à la mesure de la fluorescence associée à la surface des cellules. Nous avons tout d'abord validé l'approche de cytométrie en flux à partir de cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) exprimant la protéine EN-2. Se basant sur l'expérience de l'équipe, les différentes lignées cellulaires testées sont toutes compétentes pour la sécrétion de EN-2, suggérant l'implication de mécanismes de sécrétion largement ubiquitaires et constitutifs. Le choix de cellules HEK est lié essentiellement à la disponibilité dans le commerce de lignées cellulaires modifiées permettant l'obtention aisée de clones stables où l'expression du gène d'intérêt est régulée par la doxycycline. Dans cette lignée, HEK293 Flp-InTM TrexTM, l'obtention de clones stables s'effectue par recombinaison homologue au niveau d'un site d'intégration unique dans le génome, amenant à une grande homogénéité d'expression du gène inséré indépendamment du clone, mais aussi entre des clones exprimant des gènes différents, car tous intégrés dans un contexte génomique identique. Sur des cellules fixées et en absence de perméabilisation, EN-2, tout comme le FGF2, sont détectés à la surface des cellules en immunocytochimie (Fig. 11). Comme illustré dans la figure 12, les deux protéines sont aussi détectées par cytométrie en flux. Afin de vérifier la spécificité du signal concernant EN-2, le mutant de sécrétion EN2Δ1 (voir §3.3.2) a été analysé selon le même protocole (Fig. 12B). La forte réduction du signal associé à ce mutant de sécrétion nous a conforté dans l'utilisation de la cytométrie en flux comme méthode fiable pour mesurer la sécrétion d'EN-2.

5.3 Altérations de la sécrétion après traitement à la néomycine.

La sécrétion du FGF2 repose sur son interaction spécifique avec les PI(4,5)P₂. Elle est altérée par un traitement à la néomycine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides se fixant de manière spécifique à la tête polaire du PI(4,5)P₂ [246, 247]. Nous avons cherché à savoir si ce lipide avait une influence sur la sécrétion d'EN-2. Conformément aux travaux du laboratoire de W. NICKEL, un traitement de 24h à la néomycine sur des cellules exprimant de manière stable le FGF2 induit une baisse de sa sécrétion de plus de 50 % (Fig. 13A). Nous avons observé un effet similaire sur la sécrétion d'EN-2 (Fig. 13B). Ce traitement s'ac-

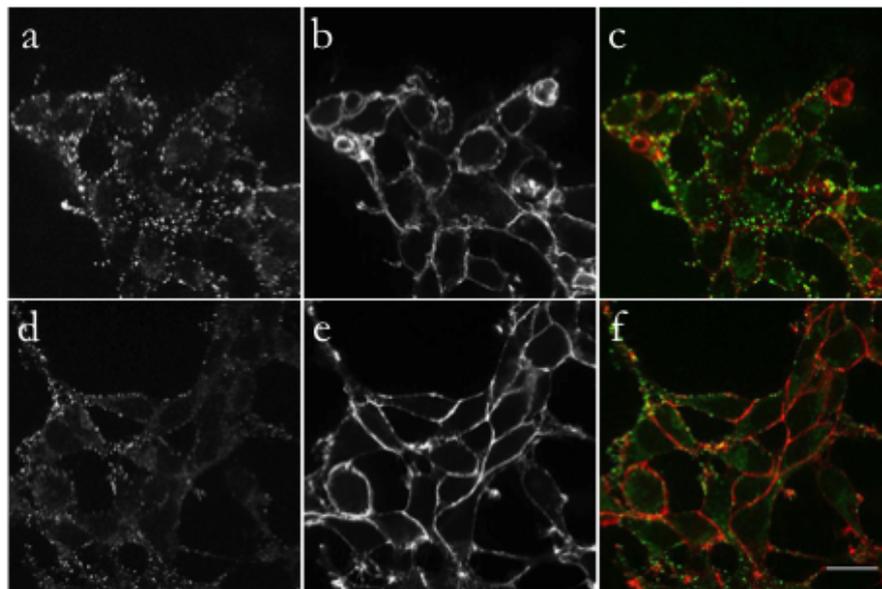


FIGURE 11 – **Visualisation d'EN-2 et du FGF2 à la surface des cellules.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec des plasmides codant pour EN-2 (a-c) ou FGF2 (d-f) sous le contrôle de la doxycycline. Après 24 heures de culture, les cellules ont été fixées, et un immunomarquage sans perméabilisation préalable a été réalisé avec des anticorps dirigés contre EN-2 (a) ou FGF2 (d). Dans les deux cas, la membrane des cellules a été marquée en utilisant de la *Wheat Germ Agglutinin* couplée à un fluorophore Alexa-555 (WGA-555, rouge) (b,e). La barre d'échelle représente 20 μm .

5.3. ALTÉRATIONS DE LA SÉCRÉTION APRÈS TRAITEMENT À LA NÉOMYCINE.

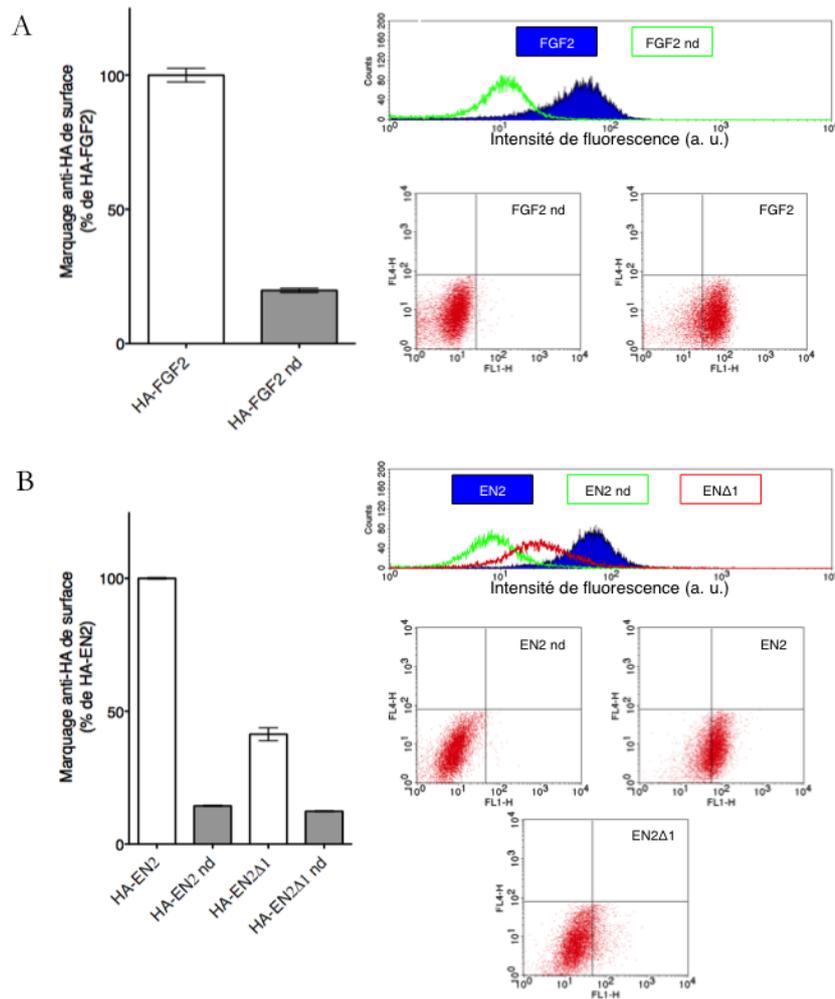


FIGURE 12 – **Quantification de la sécrétion par cytométrie en flux.** Des cellules HEK293 exprimant transitoirement une construction HA-FGF2 (A), HA-EN2 ou HA-EN2Δ1 (B), sous contrôle de la doxycycline, ont été cultivées 24 heures puis l'accumulation à leur surface de la protéine sécrétée a été mesurée par cytométrie en flux. Dans les deux cas, une condition sans induction par la doxycycline (nd) sert de contrôle négatif. Pour chaque condition, un exemple représentatif de profil de répartition des cellules en fonction de l'intensité de fluorescence est également représenté, sous forme d'histogrammes ou de nuages de points. Chaque valeur représente la moyenne de quatre mesures indépendantes de la moyenne d'intensité de fluorescence de 10^4 cellules. Les barres d'erreur représentent ici l'erreur type.

compagnant parfois d'une faible toxicité à 24 heures, nous avons analysé l'effet de traitements plus courts. De manière inattendue, des traitements de 15 minutes à 1 heure à la néomycine, bien que n'affectant pas la sécrétion du FGF2, induisent une hausse significative de la sécrétion d'EN-2 (Fig. 13A et B). Ces résultats suggéraient donc des rôles partiellement différents du PI(4,5)P₂ dans la sécrétion des protéines EN-2 et FGF2. Pour rendre compte des effets opposés du traitement néomycine en fonction de sa durée, nous avons émis l'hypothèse d'une sensibilité différente des PI(4,5)P₂ à ce traitement en fonction de leur localisation subcellulaire. Ainsi, un traitement court à la néomycine affecterait principalement les compartiments cellulaires les plus accessibles à partir du milieu extracellulaire (surface cellulaire, membrane plasmique) tandis qu'un traitement long pourrait affecter l'ensemble des compartiments cellulaires comme le noyau. Ces premiers résultats posaient aussi la question du mécanisme d'action des PI(4,5)P₂ dans la sécrétion d'EN-2, pouvant impliquer une interaction directe comme dans les cas du FGF2, ou une action indirecte mettant en jeu les cascades de signalisation couplées au métabolisme de ces lipides. L'étude approfondie du lien entre ces phosphoinositides et le transfert intercellulaire d'EN-2 (sécrétion comme internalisation) a donc constitué la suite de ces travaux.

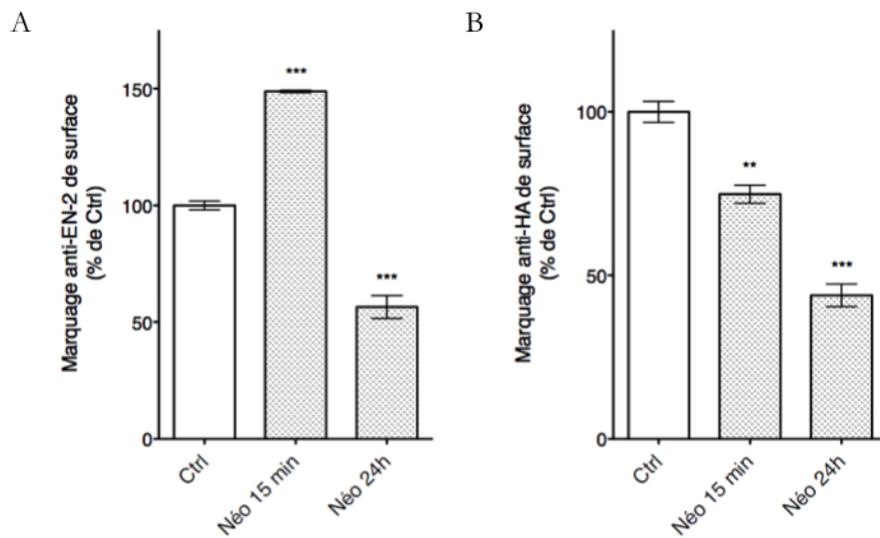


FIGURE 13 – **Effet de la néomycine sur la sécrétion d'EN-2 et du FGF2.** Des cellules HEK293 exprimant transitoirement EN-2 (A) ou HA-FGF2 (B) ont été cultivées 24 heures puis l'accumulation de la protéine sécrétée à la surface des cellules a été quantifiée par cytométrie en flux. Pour ces deux protéines, les cellules ont été traitées ou non avec de la néomycine 10 mM pour une durée de 15 minutes (Néo 15 min) ou de 24 heures (Néo 24h). Chaque condition représente la moyenne de quatre mesures indépendantes de la moyenne d'intensité de fluorescence de 10^4 cellules. Les barres d'erreur représentent l'erreur type. ** : p -value < 0,01; *** : p -value < 0,001.

Chapitre 6

Les phosphoinositides.

6.1 Brefs rappels des fonctions et rôles connus des phosphoinositides.

La classe des phosphoinositides regroupe un grand nombre de phospholipides chargés dont la structure dérive du phosphatidylinositol (PI). Ils sont tous composés d'un résidu inositol lié par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester à un groupement glycérol lui-même relié à deux acides carboxyliques à chaînes aliphatiques. C'est la combinaison de phosphorylations réversibles sur les positions 3, 4 ou 5 du groupement inositol qui va permettre la génération de phosphatidylinositol monophosphate [PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P], de phosphatidylinositol bisphosphate [PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂] ou de phosphatidylinositol trisphosphate [PI(3,4,5)P₃]. Ces phosphoinositides se distinguent donc par la nature de leur « tête » hydrophile. En terme d'abondance, ils sont des composants mineurs des membranes biologiques (quelques pourcents), et sont retrouvés spécifiquement au niveau des différents compartiments membranaires, mais aussi parfois au niveau du noyau (voir tableau 2). L'homéostasie de ces lipides fait appel à un nombre important de kinases et de phosphatases spécifiques qui permettent de moduler l'abondance relative des différents phosphoinositides par des phosphorylations et déphosphorylations sur chacun des 3 sites portés par le noyau inositol. Les phospholipides sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires allant de la régulation de l'endocytose à la régulation de la transcription par exemple (voir tableau 2). Bien que surtout décrits comme des composants des membranes biologiques, certains phosphoinositides sont retrouvés dans des structures intra-nucléaires non-membranaires ponctuées (*speckles*) où ils remplissent des fonctions spécifiques [255]. Le PI(4,5)P₂ a deux modes d'action distincts. Une part importante de ses fonctions cellulaires implique son hydrolyse, par la Phospholipase C (PLC), en deux seconds messagers que sont le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃) qui vont être à l'origine de réponses cellulaires diverses. Un deuxième mode d'action des PI(4,5)P₂ résulte de leur capacité d'interaction spécifique avec de nombreuses protéines cellulaires, induisant leur recrutement à la membrane plasmique et parfois même leur activation. Par comparaison de séquence, différents domaines protéiques capables d'interagir par eux même avec ces phospholipides ont été identifiés (domaines PH, ANTH, ENTH, FERM, PDZ, ...). Ces différents domaines pro-

6.1. BREFS RAPPELS DES FONCTIONS ET RÔLES CONNUS DES PHOSPHOINOSITIDES.

TABLEAU 2 – Localisations et fonctions des phosphoinositides.

Type	Localisations	Kinases associées	Phosphatases associées	Fonctions	Réf.
PI	Reticulum endoplasmique, noyau	PIKFYVE, PIK3C3, PIK3C2A, PIK3C2B, PI4K2A, PI4K2B, PI4KA, PI4KB	–	–	–
PI(3)P	Endosomes précoces et tardifs, MVBs, noyau	PIKFYVE	MTM1, MTMR2, MTMR4, MTMR8, MTMR14	Voie de signalisation TOR, autophagie, transport endosomal	[248]
PI(4)P	Appareil de Golgi, noyau	PIP5K1A, PIP5K1B, PIP5K1C, PIK3C2A	SACM1L	Morphologie de l'appareil de Golgi, Transport intra-golgien.	[249]
PI(5)P	Reticulum endoplasmique, appareil de Golgi, membrane plasmique, noyau	PIP4K2A, PIP4K2B	–	Activation de la voie Akt/PKB, trafic endosomal, réarrangement du cytosquelette d'actine, remodelage de la chromatine	[250]
PI(3,4)P ₂	Système vésiculaire, membrane plasmique	–	TPTE2, INPP4A, INPP4B	Migration cellulaire, endocytose, régulation de la voie Akt/PKB	[251]
PI(3,5)P ₂	Endosomes tardifs, MVBs	–	FIG4, MTM1, MTMR3, MTMR14	Autophagie, régulation de certains canaux ioniques, trafic endosomal, ...	[252]
PI(4,5)P ₂	Membrane plasmique, enveloppe nucléaire, noyau	PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, IMPK	TMEM55B, TPTE2, OCRL, INPP5B, INPP5E, INPPL1, SYNJ1	Endocytose, phagocytose, exocytose, migration cellulaire, assemblage du cytosquelette, trafic endosomal, régulation de la transcription, remodelage de la chromatine, ...	[253]
PI(3,4,5)P ₃	Membrane plasmique, noyau	–	PTEN, TPTE2, INPP5D, INPP5E, INPP5F, INPP5J, INPP5K, INPPL1	Recrutement d'effecteurs protéiques à la membrane plasmique (notamment Akt/PKB), Réparation des cassures de l'ADN	[254]

téiques font preuve d'une étonnante spécificité vis à vis de la nature de la tête polaire du lipide, suggérant un rôle prédominant des interactions électrostatiques. En effet, des domaines protéiques distincts sont recrutés en fonction de l'état de phosphorylation du phosphoinositide. Comme évoqué précédemment dans l'introduction (voir §4.1.2, Translocation directe au travers de la membrane plasmique.), le PI(4,5)P₂ est nécessaire à la sécrétion non-conventionnelle du FGF2 et de Tat, impliquant dans les deux cas une interaction directe entre ces molécules. Étonnamment, l'interaction ne repose sur la présence d'aucun des domaines protéiques identifiés à ce jour. La protéine EN-2 est elle aussi dépourvue de tels domaines, mais nous avons tout de même étudié sa capacité d'interaction avec les phosphoinositides.

6.2 Mise en évidence d'une interaction directe entre EN-2 et phosphoinositides.

6.2.1 Interaction avec des bicouches lipidiques artificielles.

Afin de tester l'interaction entre les PI(4,5)P₂ et EN-2, nous avons favorisé dans un premier temps des modèles simplifiés combinant protéines recombinantes purifiées et bicouches lipidiques artificielles. En collaboration avec les équipes de S. SAGAN et I. ALVES, nous avons mené des expériences de spectroscopie de type PWR (*Plasmon-waveguide Resonance*) sur des bicouches lipidiques de différentes compositions (Tab. 3). Ces expériences, réalisées en parallèle avec EN-2 et le FGF2, se sont révélées particulièrement instructives. Nous avons observé une forte affinité de EN-2 pour les bicouches lipidiques composée exclusivement de phosphatidylcholine (PC), avec une constante de dissociation (K_d) de l'ordre de 6 nM. L'incorporation de phosphoinositides (à hauteur de 10 % de la quantité totale de lipides) au sein de la bicouche entraîne une augmentation conséquente de cette affinité, tant dans le cas du PI(4)P (K_d de 0,3 nM) que dans celui du PI(4,5)P₂ (K_d de 0,1 nM). Par contraste, l'affinité du FGF2 pour les bicouches montre une très grande spécificité de la protéine envers les PI(4,5)P₂ [K_d de 0,1 nM contre 8 nM avec du PI(4)P, et 56 nM avec des PC seuls]. L'observation d'une telle spécificité s'accorde avec des études antérieures [191], et suggère des modes d'interaction différents pour le FGF2 et EN-2, fortement dépendant de la nature de la tête polaire du phosphoinositide pour le premier et impliquant la composante hydrophobe de la bicouche pour le dernier. Pour les deux protéines, l'ajout d'un lipide chargé négativement, ici un analogue de la phosphatidylsérine (DOPS), à hauteur de 30 % des lipides de la bicouche, n'entraîne qu'une hausse minimale de l'affinité, écartant l'hypothèse d'un rôle prédominant d'interactions électrostatiques non spécifiques entre les lipides acides et ces protéines basiques. Enfin il est intéressant de noter que dans les deux cas, l'ajout de cholestérol augmente encore l'affinité de la protéine pour une bicouche comportant déjà du PI(4,5)P₂, avec des K_d de l'ordre de la dizaine de pM (Tab. 3). Ce dernier élément est en accord avec l'observation d'une association *in vivo* entre EN-2 et des microdomaines membranaires riches en cholestérol décrite dans une étude précédente [80].

6.2.2 Interaction directe *in vitro*.

La forte affinité entre EN-2 et les PI(4,5)P₂ mesurée *in vitro* nous a amené de manière fortuite à proposer un nouveau test d'interaction entre les deux partenaires. L'interaction lipide/protéine ayant été décrite dans certains cas comme résistante aux conditions dénaturantes de migration sur gel de polyacrylamide-SDS [256], nous avons testé par *western blot* des extraits de cellules HEK293 surexprimant transitoirement EN-2 avec un anticorps dirigé contre les PI(4,5)P₂. L'anticorps détecte une bande caractéristique de la taille de la protéine EN-2, absente d'extraits de cellules naïves. Ce signal étant dépendant des conditions de saturation car uniquement observé avec le lait écrémé (Fig. 14A), nous en avons conclu que cette dernière solution était la source des phosphoinositides, ces lipides étant retrouvés de manière récurrente dans le lait d'origine naturelle ou dans les substituts industriels [257, 258].

Afin de conforter notre interprétation nous avons utilisé deux approches. Pour la première, nous avons vérifié la sensibilité du signal à un traitement néomycine ajouté à la solution de saturation (Fig. 14C). Dans une deuxième approche nous avons utilisé des protéines ou domaines protéiques connus pour interagir avec le PI(4,5)P₂ à la place de l'anticorps dirigé contre ce dernier. Après expression et purification de ces protéines recombinantes, le FGF2 ou le domaine PH de la PLC_δ (PHPLC) tous deux couplés à la Glutathion S-transférase (GST), sont incubés sur la membrane de *western blot* après saturation, puis révélés avec un anticorps dirigé contre cette étiquette GST. Similairement à l'anticorps anti-PI(4,5)P₂, ces protéines détectent la bande caractéristique à la taille de EN-2 (Fig. 14D). De manière intrigante, les PI(4,5)P₂ en complexe avec EN-2 sont capables d'interagir avec le FGF2 ou le domaine PHPLC. Il faut donc envisager que EN-2 et le FGF2 (ou le domaine PHPLC) reconnaissent des parties différentes de ces phosphoinositides. Ce résultat peut être mis en lien avec les études d'interaction *in vitro* présentées dans le précédent paragraphe, où le FGF2 cible avant tout la tête hydrophile du lipide et son motif de phosphorylation donné [d'où sa spécificité forte pour le PI(4,5)P₂]. La forte interaction de EN-2 avec les lipides indépendamment de la nature de leur tête polaire s'accorde avec l'implication de la partie commune hydrophobe de ces phosphoinositides [d'où une spécificité moins prononcée pour le PI(4,5)P₂, voir Tab. 3]. La nature exacte de l'interaction entre EN-2 et les phosphoinositides reste cependant à déterminer.

Cette technique nous a aussi permis de tester aisément les séquences requises pour l'interaction. En effet, les mutants EN2Δ1 et EN2SR (voir §3.3.2) dont l'homéodomaine est modifié ne sont plus capables d'interagir avec les PI(4,5)P₂ tandis que les mutants EN25A et EN25E (décrits dans [86]) présentant des mutations au niveau du domaine SRD situé hors de l'homéodomaine, sont eux toujours capables d'interagir avec ces phosphoinositides *in vitro* (Fig. 14C). L'homéodomaine semble donc jouer un rôle capital dans cette interaction, d'autant plus que l'utilisation de cette technique s'est montrée concluante avec deux autres homéoprotéines, PAX6 et OTX2 (Fig. 14B). En revanche, le FGF2 testé dans ces conditions n'est pas détecté, illustrant encore une fois des modes d'interaction différents.

L'ensemble de ces résultats confirment donc l'hypothèse d'une implication des PI(4,5)P₂ dans la sécrétion non-conventionnelle d'EN-2 via une interaction directe. La compréhension du rôle de cette interaction à l'échelle cellulaire représente la suite de ces travaux.

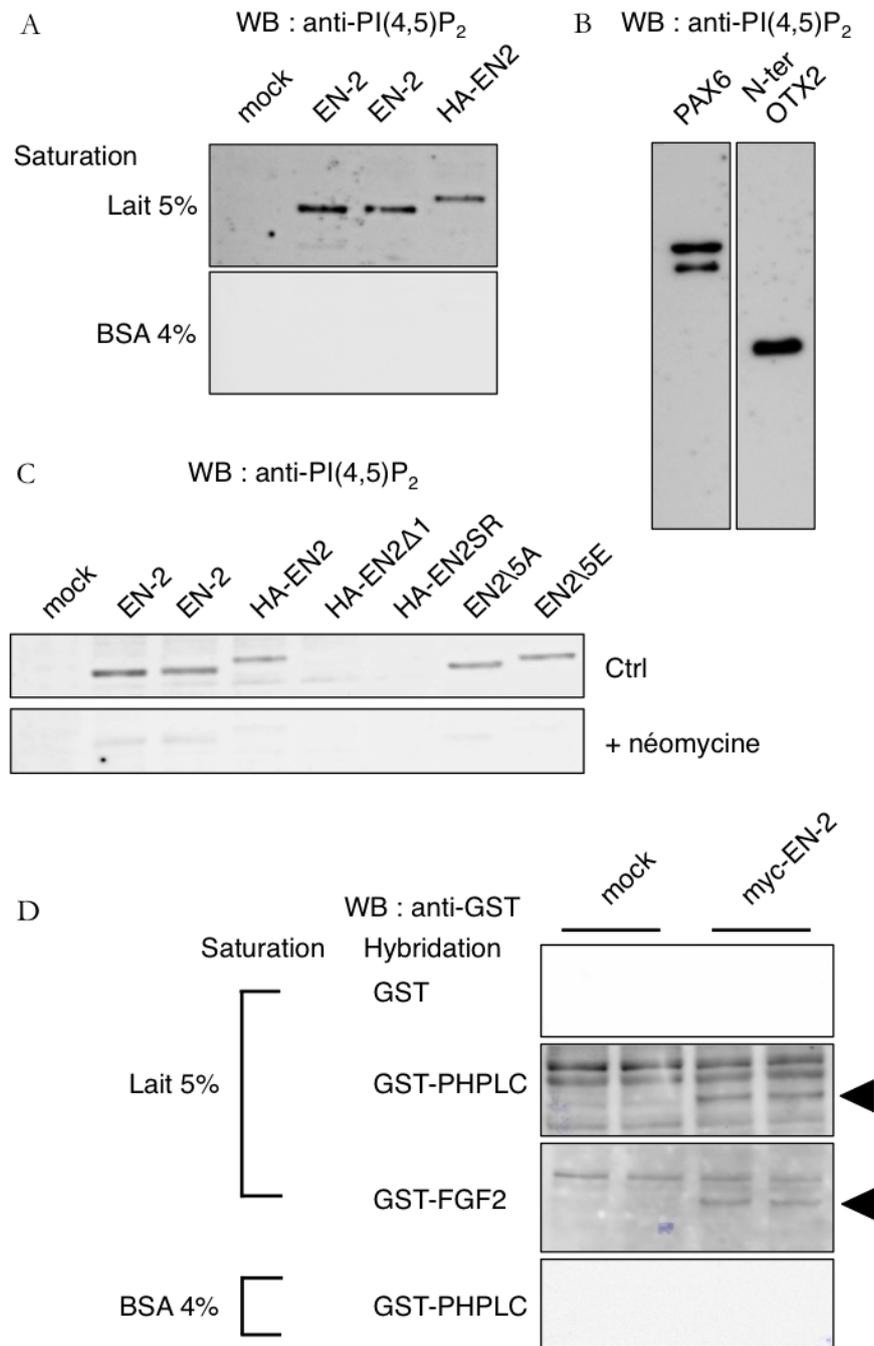


FIGURE 14 – Interaction directe entre EN-2 et le PI(4,5)P₂ *in vitro*.
 (A) La protéine EN-2 est détectée par *western blot* avec un anticorps dirigé contre les PI(4,5)P₂ dans des extraits de cellules HEK293 exprimant transitoirement différentes formes de EN-2, uniquement dans le cas d'une saturation de la membrane en présence de lait. (B) Les protéines recombinantes PAX6 et un fragment N-terminal de OTX2 contenant l'homéodomaine (N-ter OTX2) sont également reconnues par un anticorps anti-PI(4,5)P₂. (C) Seules les formes de EN-2 avec un homéodomaine non-muté sont détectées avec un anticorps anti-PI(4,5)P₂ dans des extraits cellulaires de HEK293 exprimant transitoirement ces différentes constructions. L'ajout de néomycine 10 mM dans le bain de saturation entraîne une disparition de ce signal (+néomycine). (D) La protéine EN-2 est aussi détectée après incubation de la membrane avec les protéines recombinantes GST-PHPLC ou GST-FGF2 et détection avec un anticorps anti-GST.

6.3 Localisation subcellulaire et phosphoinositides.

La localisation subcellulaire de EN-2 revêt une importance particulière dans sa sécrétion. Elle résulte de mécanismes d'adressage multiples dont seuls certains peuvent être directement associés à la sécrétion. Cependant ce seul critère ne permet pas de rendre compte des échanges incessants entre les différents compartiments. Par exemple l'accumulation préalable de la protéine dans le noyau stimule la sécrétion ultérieure de la protéine. Cet effet, initialement observé pour l'homéodomaine de la protéine KN-1, peut être étendu au cas de EN-2. En effet, l'addition d'une séquence d'export nucléaire à la protéine (nes) induit une forte relocalisation de la protéine dans le cytoplasme qui, bien que censée faciliter son accès à la membrane plasmique, réduit la capacité de sécrétion de la protéine (Fig. 15). Nous avons observé un comportement similaire du FGF2 (Fig. 10), lui aussi majoritairement nucléaire dans nos conditions de culture. La dynamique de l'adressage subcellulaire de EN-2 est donc une deuxième composante influant sur sa sécrétion. La répartition des phosphoinositides dans les différents compartiments cellulaires est elle aussi hétérogène (voir Tab. 2). Nous avons donc tenté de localiser au sein de la cellule les sites d'interaction entre EN-2 et le PI(4,5)P₂ et plus particulièrement dans les compartiments membranaires et nucléaires, tous deux impliqués dans la sécrétion de la protéine. Dans une première approche, nous avons analysé par *western blot* la répartition de EN-2 par fractionnement subcellulaire à partir de cellules HEK293 exprimant EN-2. La protéine EN-2 est majoritairement retrouvée dans la fraction nucléaire (entre 80 et 90 %) en accord avec les études précédentes, et une partie non négligeable est associée à la fraction membranaire (membrane plasmique et membranes intracellulaires confondues) comme le montre la figure 16A. Ensuite, nous avons soumis chacune des fractions à un traitement à la néomycine capable d'antagoniser les interactions entre EN-2 et les PI(4,5)P₂ libérant ainsi la protéine dans le milieu. Après séparation par centrifugation des fractions de EN-2 libérées de celles restant associées, nous avons observé que le traitement à la néomycine de la fraction membranaire entraîne une dissociation quasi-totale entre EN-2 et les membranes (Fig. 16B). L'interaction entre EN-2 et le PI(4,5)P₂ semble donc déterminante pour l'association avec les membranes cellulaires. Dans ces mêmes fractions, la distribution d'un marqueur intraluminal (calreguline) est insensible au traitement à la néomycine, excluant ainsi un effet de solubilisation des vésicules intracellulaires et montrant par la même occasion, que la sensibilité de la protéine EN-2 à la néomycine reflète son exclusion des compartiments intravésiculaires. Analysé en parallèle, le FGF2 présente un comportement similaire à EN-2. La même expérience menée sur des noyaux isolés entraîne aussi une libération de EN-2, dans des proportions moindres cependant (Fig. 16C), suggérant qu'une portion de EN-2 nucléaire pourrait être associée aux PI(4,5)P₂

6.4 Rôle des PI(4,5)P₂ dans la sécrétion d'EN-2 et du FGF2 : approche sub-cellulaire.

Comme nous venons de le voir, l'interaction entre EN-2 et le PI(4,5)P₂ pourrait être détectée au niveau membranaire mais aussi nucléaire, rappelant les effets différentiels de la néomycine sur la sécrétion de EN2 des traitements courts (accès limité aux compartiments proches de la surface cellulaire) ou longs (accès

		Composition de la bicouche lipidique				
		PC	PC / DOPS	PC / PI(4)P	PC / PI(4,5)P ₂	PC / PI(4,5)P ₂ / Cholestérol
Prot.	EN-2	6 nM	2 nM	0,3 nM	0,1 nM	10 pM
	FGF2	56 nM	42 nM	8 nM	0,1 nM	30 pM

TABLEAU 3 – Interaction directe entre EN-2 et les phosphoinositides. Constantes de dissociation (K_d) entre EN-2 ou le FGF2 et des bicouches lipidiques artificielles mesurées en spectroscopie de type PWR. La composition des différentes bicouches suit les rapports molaires suivants : PC / DOPS 7 : 3 ; PC / PI(4)P 9 : 1 ; PC / PI(4,5)P₂ 9 : 1 ; PC / PI(4,5)P₂ / cholestérol 8 : 1 : 1 .PC : phosphatidylcholine, DOPS : 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine, PI(4)P : phosphatidylinositol 4-phosphate, PI(4,5)P₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

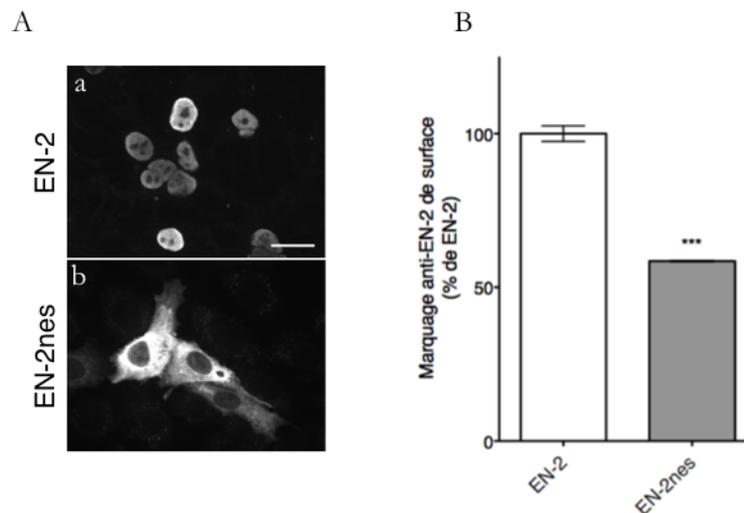


FIGURE 15 – La relocalisation cytosolique de EN-2 entraîne une diminution de sa sécrétion. (A) Localisation des protéines EN-2 (a) ou EN-2nes (b) dans des cellules HEK293 exprimant transitoirement ces deux protéines. L'ajout d'une séquence nucléaire à EN-2 entraîne sa relocalisation du noyau vers le cytoplasme. La barre d'échelle représente 20 μ m. (B) Dans ces mêmes cellules, après 24 h d'induction, l'accumulation à la surface des cellules de ces deux protéines suite à leur sécrétion a été mesurée en cytométrie en flux. *** : p -value < 0,001.

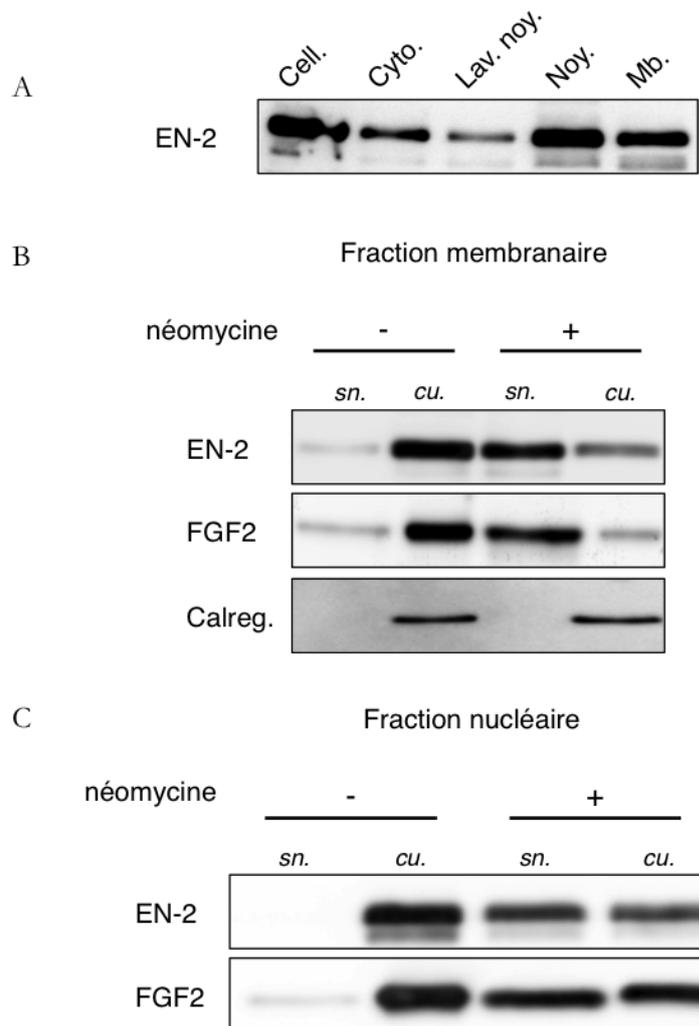


FIGURE 16 – **Effet de la néomycine sur l'association de EN-2 avec les membranes cellulaires.** (A) Répartition de la protéine EN-2 entre les différentes fractions cellulaires après fractionnement subcellulaire de cellules HEK293 exprimant transitoirement EN-2 (Cell. : cellules entières ; Cyto. : Cytosol ; Noy. : noyaux ; Mb. : membranes). La piste Lav. noy. correspond à la fraction résultante d'un lavage de la fraction nucléaire avec une solution de Triton X-100 0,5 %, NP-40 0,1 % afin de solubiliser des structures membranaires centrifugées avec les noyaux. Les dépôts correspondent ici à 1/1000 des fractions pour Cell., Cyto., Lav. noy. et Noy. ; à 1/20 de Mb. (B,C) Après fractionnement subcellulaire de cellules HEK293 exprimant transitoirement EN-2 ou le FGF2, les fractions membranaires (B) et nucléaires (C) ont été traitées avec de la néomycine 10 mM pendant 30 minutes puis centrifugées (à 100 000 rcf pour les fractions membranaires, à 10 000 rcf pour les fractions nucléaires). Suite à cette centrifugation, surnageants (*sn.*) et culots (*cu.*) ont été analysés en *western blot* en utilisant des anticorps dirigés contre EN-2 ou le FGF2. Dans le cas des fractions membranaires, le comportement de la calréguline a été suivi en parallèle afin de s'assurer que le traitement à la néomycine n'entraînait pas une libération aspécifique du contenu intraluminal des vésicules.

à l'ensemble de la cellule). Ceci nous a conduit à considérer la possibilité d'un rôle différent des *pools* nucléaires et membranaires de PI(4,5)P₂ dans la sécrétion non-conventionnelle de EN-2. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cherché des stratégies visant à modifier l'accessibilité ou la quantité de ce phospholipide de manière compartiment-spécifique pour en mesurer l'impact sur les sécrétions de EN-2 et du FGF-2.

6.4.1 Présentation des outils utilisés.

L'approche que nous avons favorisée est l'expression ectopique de protéines de deux types : des protéines à activité enzymatique, agissant directement ou indirectement sur les taux de PI(4,5)P₂ ; des domaines protéiques d'interaction directe avec les PI(4,5)P₂, réduisant la disponibilité de ces lipides pour une interaction avec d'autres protéines cellulaires. Dans le premier cas, notre choix s'est porté vers la phosphatase IpgD, enzyme du pathogène *Shigella flexneri* convertissant le PI(4,5)P₂ en PI(5)P. Cette enzyme induisant une toxicité significative dans nos conditions de culture, nous nous sommes tournés vers une autre phosphatase, OCRL (*Oculocerebrorenal syndrome of Lowe*). OCRL est une inositol polyphosphate 5-phosphatase qui convertit le PI(4,5)P₂ en PI(4)P. Elle possède une localisation cytoplasmique et son dysfonctionnement est associé à de nombreuses pathologies comme le syndrome de Lowe ou la maladie de Dent de type 2 [259]. Pour augmenter les taux de PI(4,5)P₂, nous avons choisi une petite protéine G, Arf6, protéine dont la fonction est centrale dans l'homéostasie cellulaire des PI(4,5)P₂ [260, 261, 262]. Ici, nous avons utilisé un mutant constitutivement actif de Arf6, Arf6Q67L, décrit comme responsable de la formation de larges vésicules intracellulaires très riches en PI(4,5)P₂ [263]. Pour la seconde stratégie, nous avons utilisé différents domaines protéiques, tous possédant une affinité intrinsèque pour les PI(4,5)P₂ mais se distinguant par leur spécificité subcellulaire. En plus du domaine PHPLC déjà évoqué ciblant la membrane plasmique, nous avons choisi un domaine issu de la *syntenin-2*, composé de 2 motifs PDZ et décrit comme ciblant préférentiellement les PI(4,5)P₂ nucléaires [264] et le domaine PH issu de la *kinesin 1A*, normalement localisée dans le cytoplasme [265]. Exprimés dans des cellules HEK293 ou HeLa ces domaines présentent des localisations attendues, membranaire pour le domaine PHPLC et nucléaire pour PDZ2. En revanche, nous n'avons pas conservé le domaine PH de KIF1A pour notre étude en raison de sa faible expression. Dans le but de moduler l'accessibilité ou les taux de PI(4,5)P₂, de manière compartiment-spécifique, nous avons également modifié artificiellement les localisations subcellulaires d'OCRL et de PHPLC en forçant leur adressage nucléaire par l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire classique (SV40-NLS). Ainsi, l'ensemble de ces constructions devait nous permettre *a priori* de modifier les taux de PI(4,5)P₂ membranaires (OCRL, Arf6Q67L) ou nucléaires (nlsOCRL) et leur accessibilité au niveau de la membrane (PHPLC) ou du noyau (nlsPHPLC, PDZ2).

6.4.2 Validation biologique des constructions mises au point.

Une fois l'ensemble de ces constructions obtenues par les techniques classiques de biologie moléculaire, la première étape suivant l'obtention de ces constructions a été de vérifier leurs localisations cellulaires et, pour OCRL, la conservation de son activité enzymatique. Afin de faciliter leur visualisation, la

plupart de ces protéines ont été exprimées sous forme de protéines de fusion avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*) ou la protéine fluorescente Cherry (Ch). Exprimé dans des cellules HEK293, le domaine PHPLC présente une localisation membranaire alors que la version nlsPHPLC est, elle, cantonnée au noyau (Fig. 17 a-f). Le domaine PDZ est quant à lui strictement nucléaire (Fig. 17 g-i). Conformément à ce qui a déjà décrit, l'expression du mutant constitutivement actif Arf6Q67L entraîne l'apparition d'un nombre important de vésicules cytosoliques, riches en PI(4,5)P₂, comme le confirme la colocalisation entre ces vésicules et le domaine PHPLC (Fig. 18C). La protéine OCRL est elle complètement cytoplasmique (Fig. 18A a,c). La version nlsOCRL présente une localisation hétérogène, avec la grande majorité de la phosphatase se trouvant dans le noyau mais aussi une fraction non négligeable encore détectée au niveau cytoplasmique (Fig. 18B g,j). Après avoir vérifié la localisation des ces différents outils, nous avons cherché à vérifier l'activité enzymatique d'OCRL. Avec des marquages immunocytochimiques utilisant des anticorps dirigés contre le PI(4,5)P₂, substrat d'OCRL, et le PI(4)P, son produit déphosphorylé, nous avons pu mettre en évidence dans les cellules exprimant OCRL, une réduction du marquage de la membrane plasmique avec l'anticorps anti-PI(4,5)P₂ concomitante à une augmentation du marquage anti-PI(4)P (Fig. 18A b,f). L'expression d'OCRL induit donc bien une baisse des taux de PI(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique. En revanche, cette diminution est également observée pour la forme nlsOCRL (Fig. 18B h,k), signifiant que l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire à cette phosphatase ne permet pas de restreindre son activité au noyau (comme le suggère sa localisation résiduelle au niveau cytoplasmique). Concernant les *pools* nucléaires de PI(4,5)P₂, nous n'avons pas été en mesure de reproduire les conditions expérimentales d'immunomarquage décrites pour leur visualisation [266]. Il nous a donc été difficile de vérifier la modification des niveaux de ceux-ci.

6.4.3 Analyse de la sécrétion de EN-2 et du FGF2.

Sur le plan expérimental, l'analyse quantitative de la sécrétion par cette approche s'est révélée beaucoup plus fastidieuse, due aux variations inhérentes à l'utilisation de conditions de transfection différentes et ce, en dépit de la forte reproductibilité observée pour une même condition. Après de nombreuses tentatives combinant lignées stables et expression transitoire, le modèle le plus satisfaisant a consisté en l'analyse comparative d'une même condition de cotransfection caractérisée par l'expression constitutive de EN-2 et l'expression régulée de la protéine ciblant les PI(4,5)P₂, en présence ou en absence d'inducteur. Nous avons ainsi pu démontrer que la sécrétion de EN-2 est diminuée en présence du domaine PH de la PLC mais peu sensible à l'expression d'OCRL (Fig. 19A). L'accessibilité des PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique apparaît donc nécessaire à la sécrétion de EN-2, mais leur conversion en PI(4)P est sans effet sur ce processus. La mesure des interactions *in vitro* utilisant la protéine EN-2 recombinante et une bicouche lipidique artificielle indique que l'affinité de la protéine pour le PI(4)P n'est diminuée que d'un facteur 4 comparée à celle pour le PI(4,5)P₂. Dans les mêmes conditions, l'affinité du FGF2 dont la sécrétion nécessite aussi l'interaction avec les PI(4,5)P₂ est quand à elle diminuée d'un facteur 80. Nous avons pu observer que la sécrétion du FGF2 est affectée non seulement par l'expression du domaine PHPLC mais également par

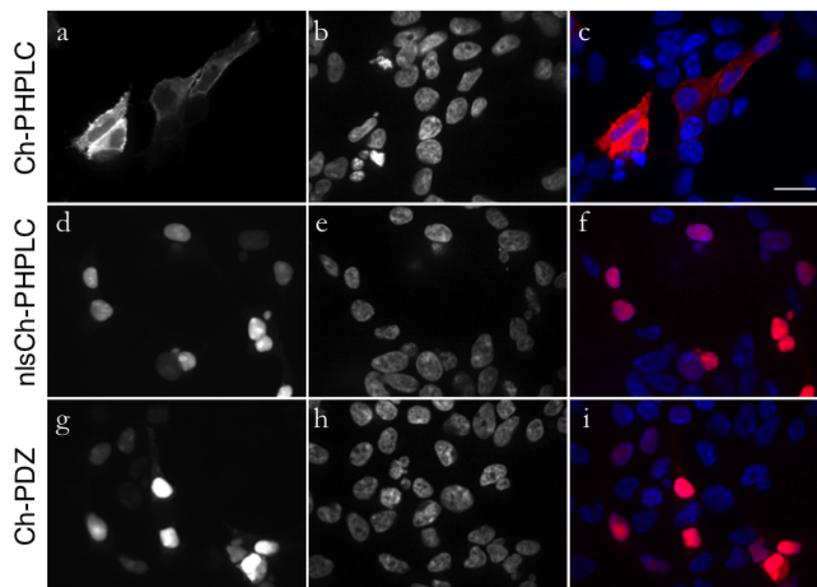


FIGURE 17 – Localisations intracellulaires de domaines protéiques interagissant avec le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Des cellules HEK293 exprimant transitoirement les domaines protéiques PHPLC (a-c), nlsPHPLC (d-f) ou PDZ (g-i) couplés à la fluorescente Cherry ont été cultivées pendant 24 h, puis fixées et perméabilisées, et les noyaux ont été marqués à l'aide de Hoechst 33342 présent dans le milieu de montage. La barre d'échelle représente 20 μm .

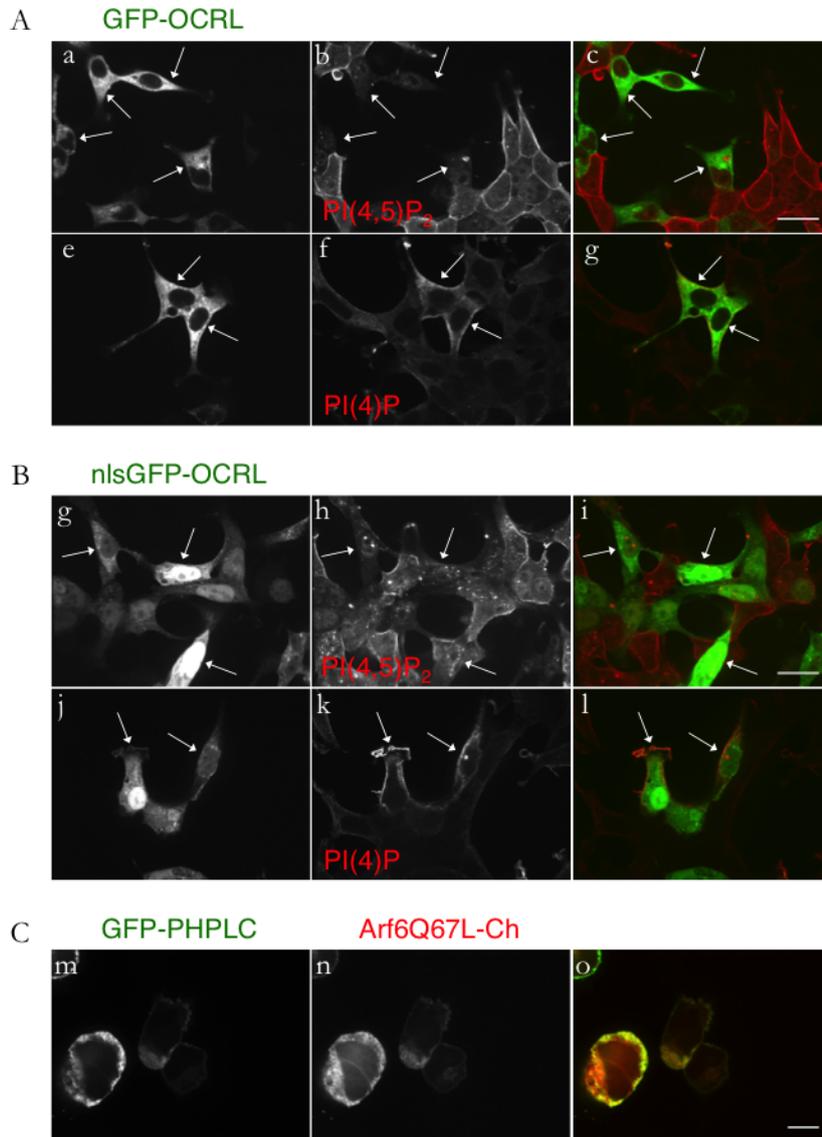


FIGURE 18 – Localisation et activité enzymatique d'OCRL et nlsOCRL.
(A,B) Des cellules HEK293 exprimant transitoirement la protéine OCRL (A) ou la version nlsOCRL (B), toutes deux couplées à la GFP ont été cultivées pendant 24 h, puis fixées et perméabilisées. Un marquage immunologique a ensuite été réalisé à l'aide d'anticorps anti-PI(4,5)P₂ (b,h) ou anti-PI(4)P (f,k). (C) Des cellules HEK293 co-exprimant transitoirement les protéines PHPLC et Arf6Q67L, fusionnées respectivement à la GFP ou à la Cherry, ont été cultivées 24 h puis fixées et observées directement sous le microscope. Les barres d'échelle représentent 20 μ m.

celle d'OCRL, indiquant que dans ce cas les PI(4)P ne peuvent se substituer aux PI(4,5)P₂ (fig 19B). L'effet de versions nucléaires du PHLPLC (nls-PHLPLC) est en cours d'analyse, mais les premiers résultats indiquent une diminution significative de la sécrétion de EN-2, suggérant une fois de plus, la contribution des compartiments nucléaires à la sécrétion de la protéine. Enfin, bien qu'il s'agit de résultats demandant à être confirmés, la transfection du mutant constitutivement actif de Arf6 dans des cellules HeLa exprimant de manière stable EN-2 entraîne une hausse significative de la sécrétion de EN-2 (Fig. 19C). Ce résultat suggère que l'interaction entre EN-2 et les PI(4,5)P₂ pourrait prendre place au niveau des larges vésicules générées par Arf6Q67L, et qu'à ce niveau cette interaction permettrait également la sécrétion de EN-2.

6.5 Rôle des PI(4,5)P₂ dans l'internalisation d'EN-2.

S'ajoutant aux cas du FGF2 et de Tat déjà décrits dans la littérature, nous avons démontré l'implication directe des PI(4,5)P₂ dans la sécrétion non-conventionnelle de EN-2. Une des particularités de cette dernière protéine est d'être internalisée, au moins en partie, par translocation au travers de la membrane plasmique. Nous avons cherché à savoir si les PI(4,5)P₂ ne pouvaient pas être également impliqués dans l'internalisation de EN-2.

6.5.1 Technique utilisée pour l'observation de l'internalisation.

Afin de rendre compte de l'internalisation de EN-2, qualitativement comme quantitativement, nous avons optimisé les techniques *in cellulo* utilisées dans l'équipe. Le protocole classique consiste à visualiser par microscopie l'internalisation d'une protéine recombinante ajoutée dans le milieu de culture et préalablement marquée à l'aide d'un fluorophore, dans notre cas la fluorescéine, directement sur cellule vivante ou après fixation. Un écueil de cette technique est la distinction entre marquage extracellulaire (de surface) et intracellulaire sans altérer l'intégrité de la cellule. Pour exemple, l'observation directe des cellules pendant l'incubation avec la protéine ne permet pas de distinguer aisément la fluorescence associée à la protéine libre dans le milieu de celle issue de la protéine internalisée (Fig. 20A a-c). Pour surmonter cet obstacle nous avons employé le bleu de trypan, qui est une substance capable d'absorber la fluorescence sur un large spectre de longueurs d'ondes. Le bleu de trypan n'étant pas une substance cellule-perméante, son addition dans le milieu de culture permet d'éteindre la fluorescence présente dans le milieu sans affecter la fluorescence intracellulaire (Fig. 20A d-f). Deux autres avantages associés à l'utilisation du bleu de trypan sont, (i) sa capacité d'interaction avec la surface des cellules vivantes permettant de visualiser les contours cellulaires grâce à la fluorescence intrinsèque de la molécule, (ii) sa forte accumulation dans les cellules mortes, permettant de s'assurer de l'intégrité des cellules internalisant la protéine (dépourvues de bleu trypan).

L'internalisation de EN-2 a été analysée dans différentes lignées cellulaires telles que les cellules HEK293, CHO (*Chinese Hamster Ovary*) ou HeLa (Fig.

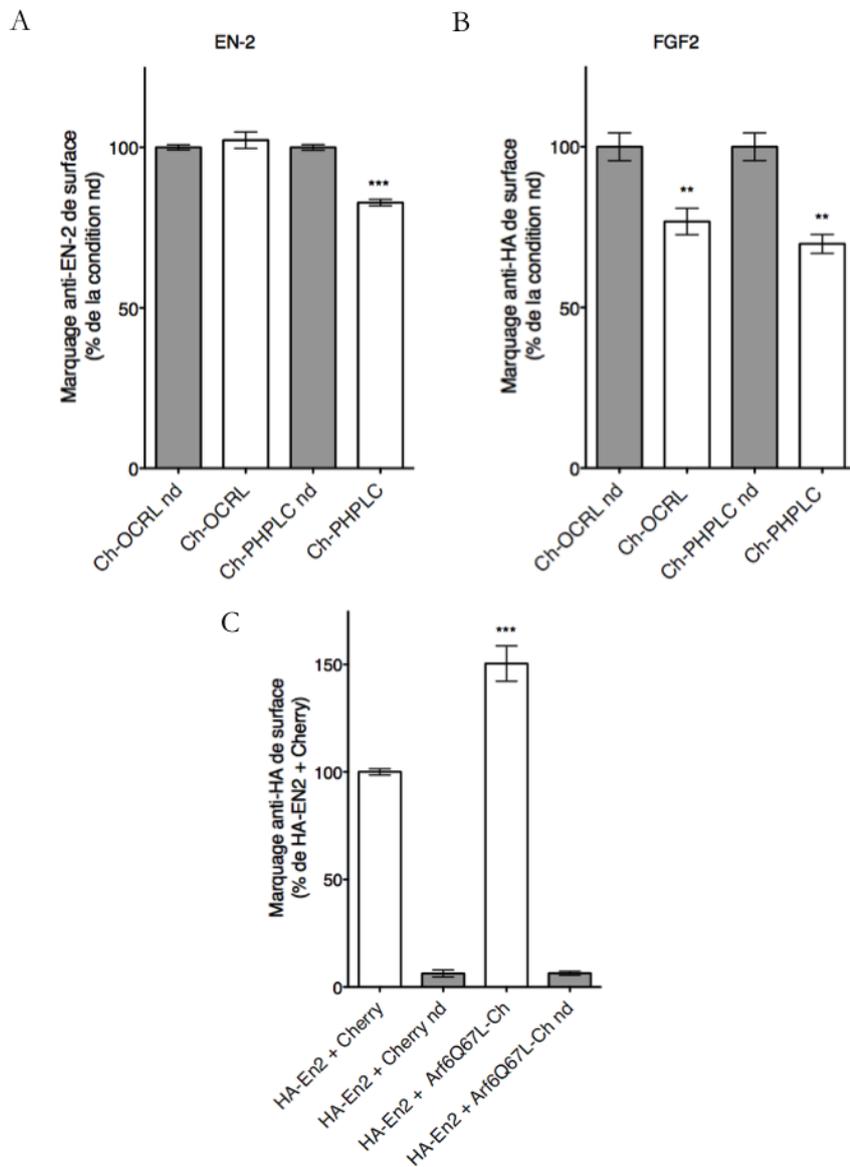


FIGURE 19 – **Influence de l'expression de OCRL et PHPLC sur la sécrétion de EN-2 et du FGF2.** (A,B) Des cellules HEK293 co-exprimant transitoirement EN-2 (A) ou FGF2 (B), de manière constitutive, et OCRL ou PHPLC, sous contrôle de la doxycycline, ont été cultivées 24h avec ou sans doxycycline, puis l'accumulation à la surface des cellules de EN-2 ou du FGF2 sécrété a été mesurée par cytométrie en flux. Pour chaque protéine (OCRL ou PHPLC), la condition avec doxycycline est rapportée à la condition sans doxycycline (nd) qui sert de standard (100 %). (C) Des cellules HeLa exprimant de manière stable HA-EN2 ont été transfectées avec des plasmides codant, sous le contrôle de la doxycycline, pour la protéine fluorescente Cherry ou Arf6Q67L-Ch. Après 24 h de culture avec ou sans (nd) doxycycline, la sécrétion de HA-EN2 a été quantifiée par cytométrie en flux. Chaque condition représente la moyenne de quatre mesures indépendantes de la moyenne d'intensité de fluorescence de 10^4 cellules. Les barres d'erreur représentent l'erreur type. ** : p -value < 0,01 ; *** : p -value < 0,001

20B). Dans ces trois situations, la protéine EN-2 internalisée présente une localisation similaire caractérisée par un marquage cytosolique et nucléaire diffus accompagné d'un marquage cytoplasmique ponctué de plus forte intensité. En l'absence de bleu de trypan, il est également possible de distinguer un marquage ponctué de la surface des cellules, constituant donc le site d'accumulation majoritaire de la protéine (Fig. 20A a). Dans le but d'identifier la nature des structures ponctuées enrichies en protéine EN-2, nous avons réalisé des immunomarquages sur des cellules fixées après l'internalisation de EN-2. Alors que le marquage diffus ne semble pas résister à la fixation, le marquage ponctué est lui toujours observé (Fig. 21 a,e,i,m,q). Parmi les différents marqueurs utilisés, le seul qui présente une colocalisation partielle avec EN-2 est *caveolin-1* (Fig. 21 u). La nature précise de ces structures reste donc à déterminer.

6.5.2 Un lien entre PI(4,5)P₂ membranaires et internalisation d'EN-2.

Pour tester le rôle des PI(4,5)P₂ dans l'internalisation de EN-2, nous avons utilisé les outils déjà mis en œuvre pour l'étude de la sécrétion et en premier lieu, les traitements à la néomycine. Nous avons regardé l'impact sur l'internalisation de EN-2 de l'ajout de néomycine dans le milieu de culture. Comme indiqué sur la figure 22A, un traitement des cellules, HEK293 comme CHO-K1, avec la néomycine durant l'incubation avec EN-2 entraîne un changement net du comportement de la protéine. Dans ces deux lignées cellulaires, la néomycine induit une disparition quasi-complète du signal diffus. Le marquage ponctué n'est lui que peu affecté. L'ajout d'un compétiteur pour la fixation aux PI(4,5)P₂ modifie donc l'internalisation d'EN-2. Cependant, une certaine proportion de la protéine est toujours internalisée, essentiellement au niveau de structures ponctuées de type vésiculaire. L'interaction entre ce phosphoinositide et EN-2 pourrait être une étape importante pour l'accumulation spécifique de la protéine dans le cytosol. Dans un deuxième temps nous avons testé l'effet de la surexpression de la phosphatase OCRL, capable de dépléter les PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique. Pour affiner notre analyse comparative, l'internalisation de EN-2 a été effectuée dans une co-culture de cellules exprimant ou non une protéine de fusion OCRL-Cherry. Une différence claire d'internalisation entre les deux types de cellules apparaît (Fig. 22B). Comme pour la néomycine, l'expression de la phosphatase OCRL induit une forte diminution du signal diffus, sans pour autant affecter le signal ponctué. La modulation des niveaux de phosphoinositides de la membrane plasmique apparaît être un régulateur majeur de l'adressage intracellulaire de la protéine internalisée et de son accès au cytosol, soit au niveau de la translocation directe de EN-2 au travers de la membrane plasmique, soit dans un deuxième temps, au niveau de la sortie des vésicules d'endocytose.

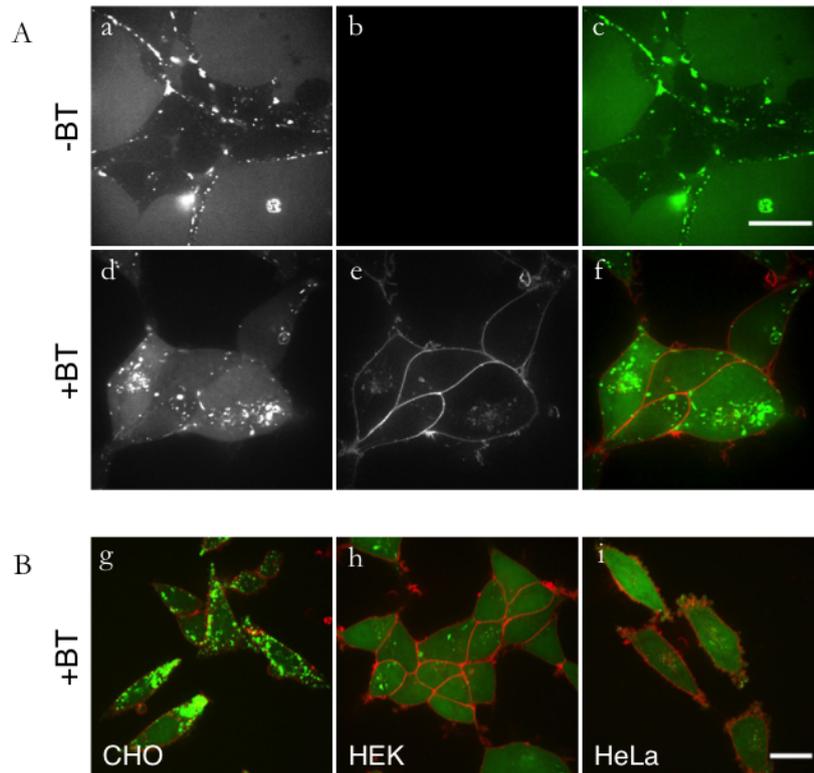


FIGURE 20 – **Visualisation de l'internalisation d'EN-2.** (A) Suite à une incubation de 1h à 37°C, l'internalisation de la protéine EN-2 couplée à la fluorescéine (a,d vert) a été visualisée sur des cellules HEK293 vivantes en absence (-BT) ou en présence (+BT) de bleu de trypan (b,e rouge) dans le milieu extracellulaire. (B) Visualisation de l'internalisation de EN-2 dans les différentes lignées cellulaires CHO (g), HEK293 (h) et HeLa (i), en présence de bleu de trypan. Les barres d'échelle représentent 20 μ m.

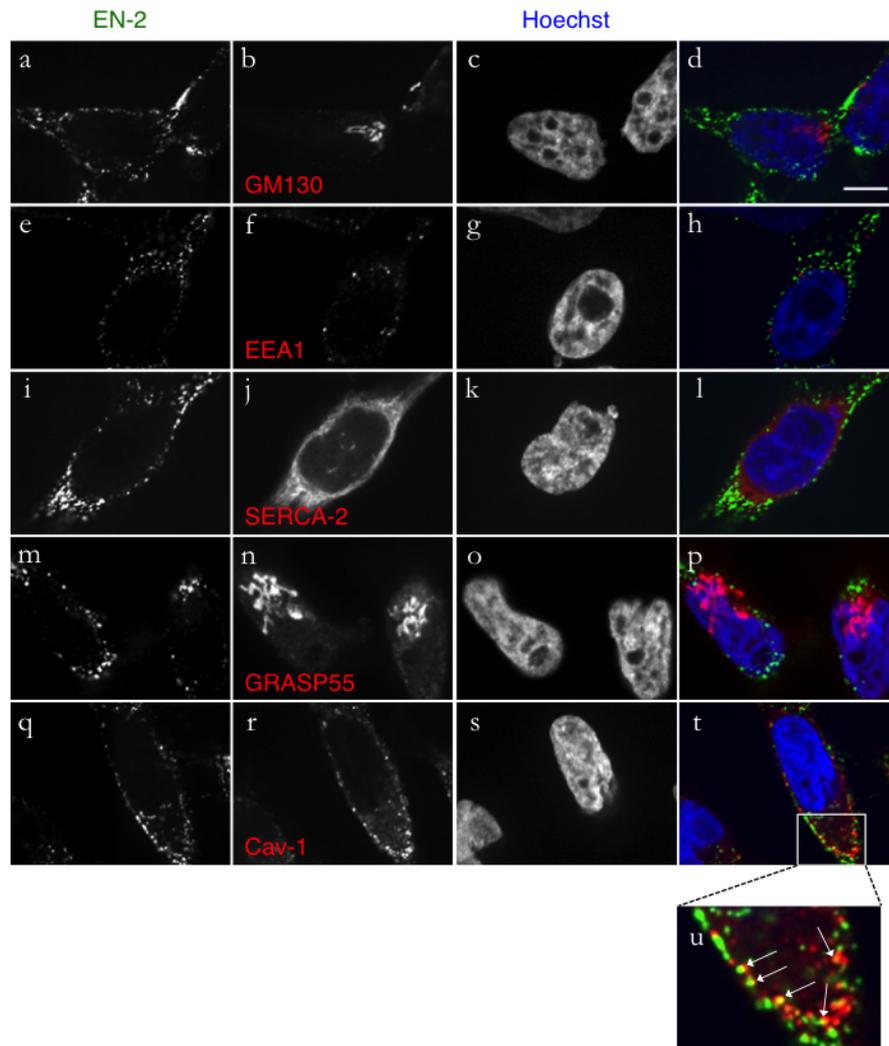


FIGURE 21 – La protéine EN-2 internalisée colocalise partiellement avec la *Caveolin-1*. Des cellules HEK293 ont été incubées avec la protéine EN-2 couplée à la fluorescéine 1h à 37°C, puis fixées avec un mélange formaldéhyde 4% glutaraldéhyde 0,2% et perméabilisées. Un marquage immuologique a ensuite été réalisé avec des anticorps anti-GM130 (b), anti-EEA1 (f), anti-SERCA2 (j), anti-GRASP55 (n) ou anti-*Caveolin1* (r). Du Hoechst 33342 a été ajouté dans le milieu de montage afin de visualiser les noyaux (bleu). La barre d'échelle représente 10 μm .

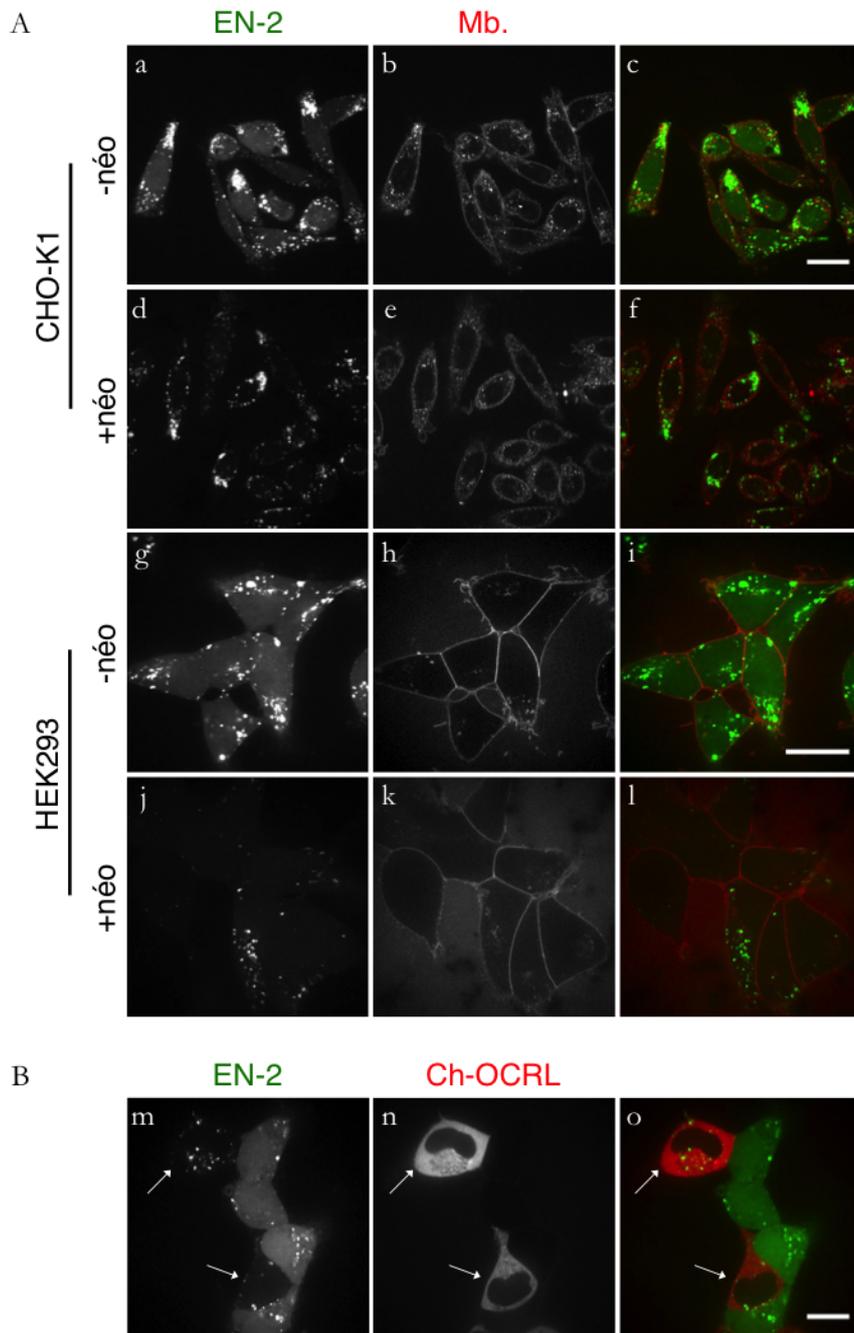


FIGURE 22 – Influences de la néomycine et d'OCRL sur l'internalisation d'EN-2. (A) Visualisation, après ajout de bleu de trypan dans le milieu, de l'internalisation de EN-2 dans des cellules CHO-K1 ou HEK293 après 1h d'incubation à 37°C en présence (+néo) ou en absence (-néo) de néomycine 10 mM. (B) Visualisation de l'internalisation de EN-2 sur une co-culture entre des HEK293 naïves ou exprimant OCRL en fusion avec la protéine fluorescente Cherry (flèches). Les barres d'échelle représentent 20 μ m.

Chapitre 7

Les protéoglycanes.

L'ensemble des résultats présentés dans cette première partie attribue à la membrane plasmique un rôle primordial dans le mécanisme de transfert intercellulaire des homéoprotéines, en accord avec sa localisation à l'interface entre milieu extra- et intracellulaire. Nous avons donc porté notre attention sur d'autres constituants de la membrane plasmique, les protéoglycanes, plusieurs fois impliqués dans le transfert des homéoprotéines, notamment à partir d'études *in vivo*.

7.1 Présentation des protéoglycanes.

L'appellation protéoglycanes désigne un ensemble de macromolécules biologiques se composant d'un cœur protéique sur lequel vient se greffer un grand nombre de chaînes polysaccharidiques, les glycosaminoglycanes (GAG). La famille des protéoglycanes regroupe ainsi un grand nombre de protéines aux structures hétérogènes et aux localisations variées : intracellulaire (*Serglycin*), transmembranaire (*Syndecans*, *NG2*, *Betaglycan*, *Phosphacan*) ou associé à la membrane plasmique par une ancre GPI (*Glypicans*), péricellulaire (*Perlecan*, *Agrin*, collagènes) ou extracellulaire (*Aggrecan*, *Decorin*, *Keratocan*, *Nyctalopin*, *Testicans* ...). De manière générale, chaque protéoglycane arbore un type de GAG particulier parmi les 4 grands types de GAGs recensés (qui diffèrent par la structure du disaccharide composant le motif de base de la chaîne polysaccharidique) : les héparanes sulfates, les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates et les kératanes sulfates (Fig. 23). A l'exception du kératane sulfate, ces chaînes polysaccharidiques sont liées covalamment au cœur protéique du protéoglycane par l'intermédiaire de la O-glycosylation de résidus sérine avec des molécules de xylose (réaction catalysée par les xylosyltransférases 1 et 2). A partir de ce xylose, différentes enzymes (β 1-3 et β 1-4 galactosyltransférases, β 1-3 glucuronosyltransférase) induisent la formation d'un tetrasaccharide composé d'un xylose, de deux galactoses et d'une molécule d'acide glucuronique. C'est à partir de ce motif tetrasaccharidique que la polymérisation des GAGs va ensuite avoir lieu [267, 268, 269].

7.2 Importance des protéoglycanes de surface dans l'internalisation d'EN-2.

A l'inverse des expériences menées sur les phosphoinositides, nous avons d'abord étudié l'implication des protéoglycanes dans le cadre de l'internalisation de EN-2, ces deux types de molécules pouvant interagir directement dans le milieu extracellulaire. Après avoir tiré parti de lignées cellulaires déficientes pour la synthèse de GAGs, nous avons par la suite utilisé une stratégie plus ciblée de surexpression de protéoglycanes, testées dans un premier temps avec les *syndecans*.

7.2.1 Lien entre expression de protéoglycanes fonctionnels et internalisation d'EN-2.

Plusieurs lignées mutantes dérivées de cellules épithéliales de hamster (CHO) sont disponibles dont une déficiente pour l'activité xylosyltransférase [271]. Ainsi, dans ces cellules, l'ajout de GAGs de type héparane, dermatane ou chondroïtine sulfate sur la partie protéique des protéoglycanes n'est plus possible car le motif tetrasaccharidique de base requis n'est plus synthétisé (voir §7.1). Ces cellules, nommées CHO-745, expriment donc toujours la partie protéique des protéoglycanes, mais celle-ci est dépourvue de toute chaîne polysaccharidique (exception faite des GAGs de type kératane sulfate). La comparaison entre CHO-K1 et CHO-745 nous a permis de mettre en évidence le rôle des GAGs sur l'internalisation d'EN-2. Par rapport aux CHO-K1, la protéine n'est quasiment pas internalisée dans les CHO-745 (Fig. 24). Cependant, la perte de l'activité xylosyltransférase affectant la quasi-totalité des protéoglycanes, nous avons initié en parallèle une approche plus sélective quant à la nature du protéoglycane étudié.

7.2.2 L'expression de *syndecans* favorise l'accumulation d'EN-2 à la surface des cellules.

Les protéoglycanes se répartissent en deux catégories suivant leur localisation une fois sécrétés, une première associée à la membrane par un domaine transmembranaire ou une ancre GPI et la deuxième libre dans le milieu extracellulaire. Compte tenu de la position charnière de la membrane plasmique pour les échanges intra- et extracellulaires, nous avons choisi les protéoglycanes membranaires. De plus les effets éventuels sur l'internalisation de EN-2 devaient être restreints aux seules cellules exprimant la protéine (à l'inverse des protéines libérées dans le milieu), facilitant ainsi leur analyse. Nous avons initié notre approche gain de fonction avec une famille de protéoglycanes transmembranaires, les *syndecans* (SDC). Cette famille de protéines regroupe 4 membres chez les mammifères (SDC-1, -2, -3 et -4) qui sont associés majoritairement avec des GAGs de type héparane sulfate (il arrive que les SDC-1 et -3 présentent en plus des GAGs de type chondroïtine sulfate). La partie protéique n'est que peu conservée entre ces différents *syndecans* à l'exception des domaines de fixation des GAGs au niveau de leur partie extracellulaire, et de deux domaines intracellulaires C1 et C2 retrouvés dans les 4 membres de cette famille protéique. Ces *syndecans* remplissent de nombreuses fonctions et sont impliqués par exemple dans la formation de points focaux d'adhésion ou dans la formation des den-

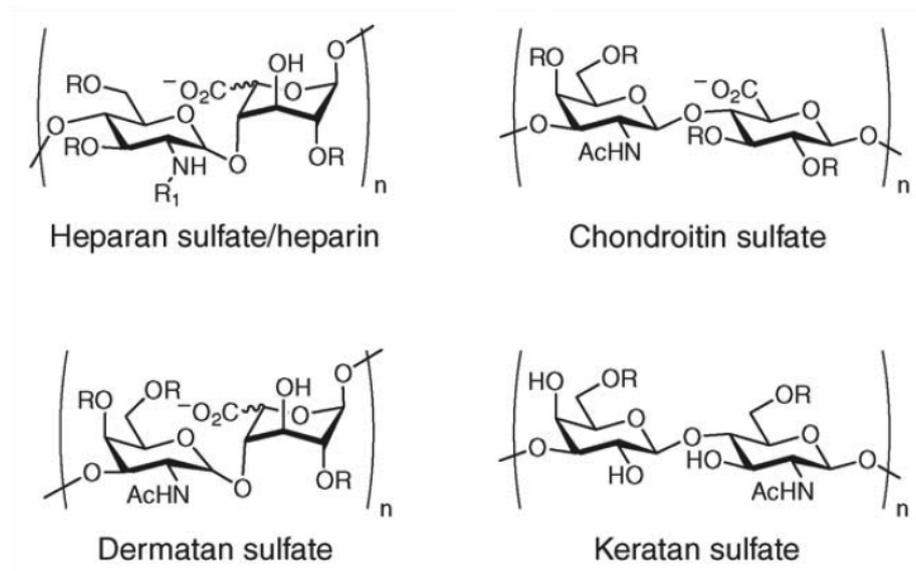


FIGURE 23 – Les différentes classes de glycosaminoglycanes. Tiré de [270]. Les différents sites potentiels de sulfatation sont indiqués par R, avec $R = \text{SO}_3^-$ ou H; $R_1 = \text{SO}_3^-$, H, COCH_3 (Ac). $n = \sim 10 - 100$.

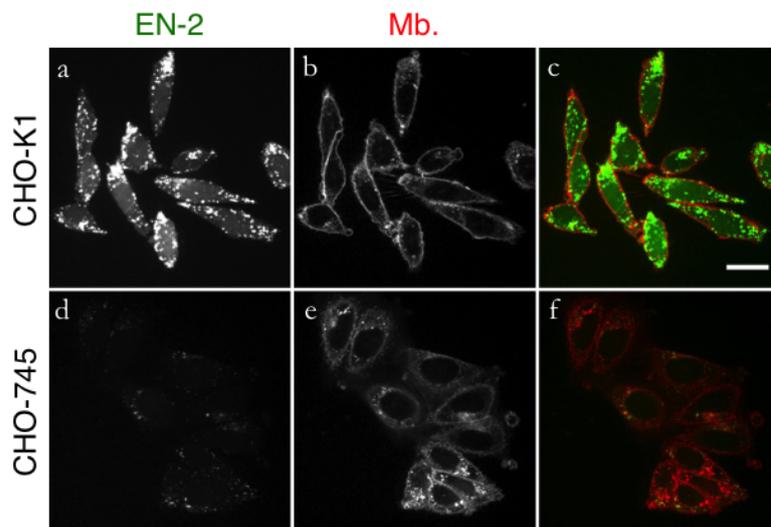


FIGURE 24 – La présence de GAGs à la surface cellulaire et requise pour l'internalisation de EN-2. Comparaison de l'internalisation de EN-2 entre la lignée de cellules CHO-K1(a-c) et la lignée mutante CHO-745 dépourvue de GAGs en surface (d-f). Après incubation des cellules avec la protéine EN-2 couplée à la fluorescéine 1h à 37°C, l'internalisation de la protéine est visualisée suite à l'ajout de bleu de trypan dans le milieu. La barre d'échelle représente 20 μm .

drites. Enfin, le clivage de leur partie extracellulaire par des metalloprotéinases matricielles semble jouer un rôle important dans certaines réponses immunitaires ou dans la progression tumorale [272, 273]. Nous avons donc cherché à savoir si la surexpression de deux de ces SDCs, SDC-1 ou SDC-2, modifiait ou non l'internalisation de EN-2. A partir de co-cultures entre HEK293 naïves et clones stables de HEK293 exprimant le SDC-1 couplé à la protéine fluorescente Cherry, nous avons observé que l'expression de ce protéoglycane entraîne une très forte augmentation de l'accumulation de EN-2 à la membrane plasmique (Fig. 25A -BT). Cette association semble dépendante de la nature du protéoglycane car en présence de cellules exprimant l'une ou l'autre des deux protéines, SDC1 ou SDC2, EN-2 s'associe de manière préférentielle aux SDC-2 (Fig. 25B). Le résultat le plus étonnant de cette étude est que la forte augmentation de l'accumulation de EN-2 à la surface des cellules ne s'accompagne d'aucune modification (hausse ou baisse) de son internalisation ou de sa distribution intracellulaire (Fig. 25A +BT). Ces résultats démontrent ainsi le découplage entre accumulation de surface et internalisation de EN-2. La conséquence majeure concernant le mécanisme d'internalisation est que, la nature de l'interaction entre la protéine et le protéoglycane (donc la spécificité) plus que la seule accumulation de la protéine à proximité de la membrane plasmique pourrait déterminer la capacité d'internalisation de la protéine. Ce résultat sera discuté plus en détail dans la dernière partie de ce manuscrit.

7.3 Impact de l'expression de *syndecans* sur la sécrétion d'EN-2.

Les *syndecans* se révélant être des sites de fixation efficaces pour la protéine EN-2 directement ajoutée dans le milieu, nous avons testé leur effet sur la sécrétion de EN-2, mesurée par la quantité de protéine associée à la surface. Comme cela a été rappelé dans l'introduction, la sécrétion du FGF2 dépend de l'expression par la cellule de protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate [190]. La transfection transitoire de l'un ou l'autre de ces *syndecans* dans une lignée stable de cellules HEK293 exprimant EN-2 entraîne une forte hausse de la quantité de protéine EN-2 détectée à la surface des cellules exprimant le *syndecan* (Fig. 26A). De même que pour l'internalisation, la protéine sécrétée est donc capable de s'associer à ces protéoglycanes, illustrant les caractéristiques identiques des formes sécrétées et internalisées de la protéine. Nous avons voulu alors vérifier si, contrairement à l'internalisation, l'expression du *syndecan* pouvait influencer sur le processus même de sécrétion, donc de manière cellule-autonome. A la différence du modèle précédent où le *syndecan* est toujours co-exprimé avec EN-2, nous avons mesuré la sécrétion de EN-2 dans une co-culture entre des cellules HEK293 exprimant soit EN-2 soit les protéines SDC-1 ou SDC-2. Comme précédemment, le signal anti-EN-2 de surface est fortement augmenté dans les cellules exprimant les SDCs (Fig. 26B), démontrant que la coexpression des deux protéines n'est pas requise, les *syndecans* n'interagissant avec la protéine qu'une fois sécrétée sans moduler l'efficacité de ce processus. On peut cependant noter que dans le cas du FGF2, l'action décrite des protéoglycanes sur le processus de sécrétion n'implique pas forcément la co-expression des deux protéines mais nécessite un contact physique entre les cellules exprimant chacune d'elles.

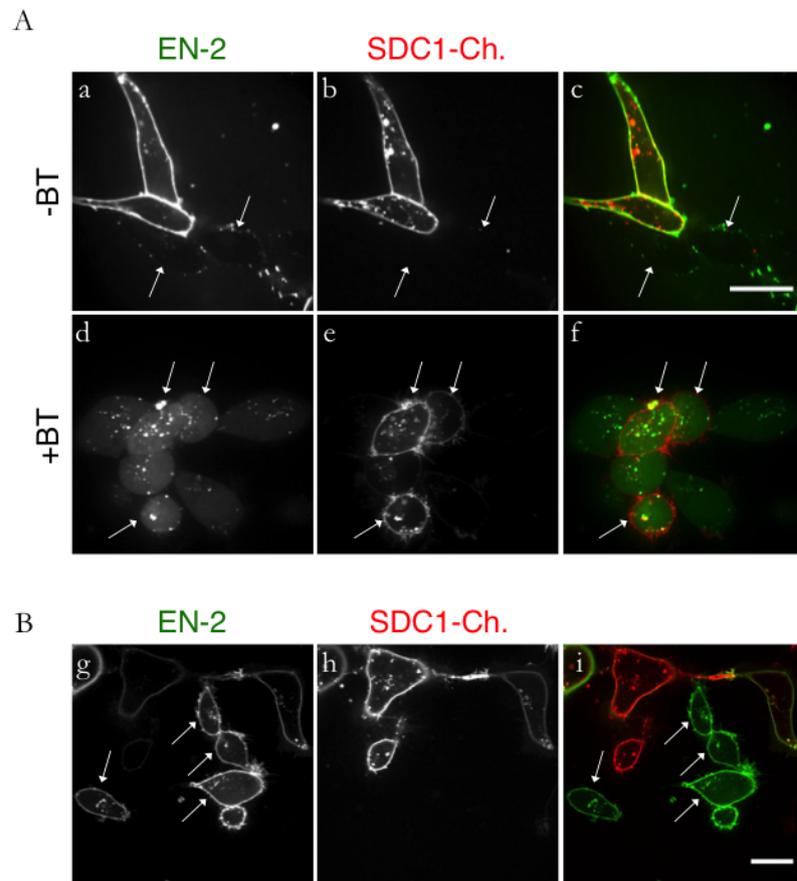


FIGURE 25 – L’expression des SDC-1 et SDC-2 favorise l’accumulation de EN-2 extracellulaire à la surface des cellules. (A) Visualisation de l’internalisation de EN-2 par une co-culture entre HEK293 naïves ou exprimant le SDC-1 couplé à la protéine fluorescente Cherry, en présence (+BT) ou en absence (-BT) de bleu de trypan. Dans la condition -BT (a-c), les cellules HEK naïves sont indiquées à l’aide des flèches blanches. Dans la condition +BT (d-f), ce sont les cellules exprimant le SDC-1 qui sont indiquées avec ces mêmes flèches. (B) Visualisation de l’internalisation de EN-2 en absence de bleu de trypan sur une co-culture entre des cellules HEK293 exprimant le SDC-1 couplé à la protéine fluorescente Cherry et HEK293 exprimant le SDC-2 (flèches blanches). Cette observation en absence de bleu de trypan permet de voir une accumulation préférentielle de EN-2 à la surface des cellules exprimant SDC-2. Les barres d’échelle représentent 20 μm .

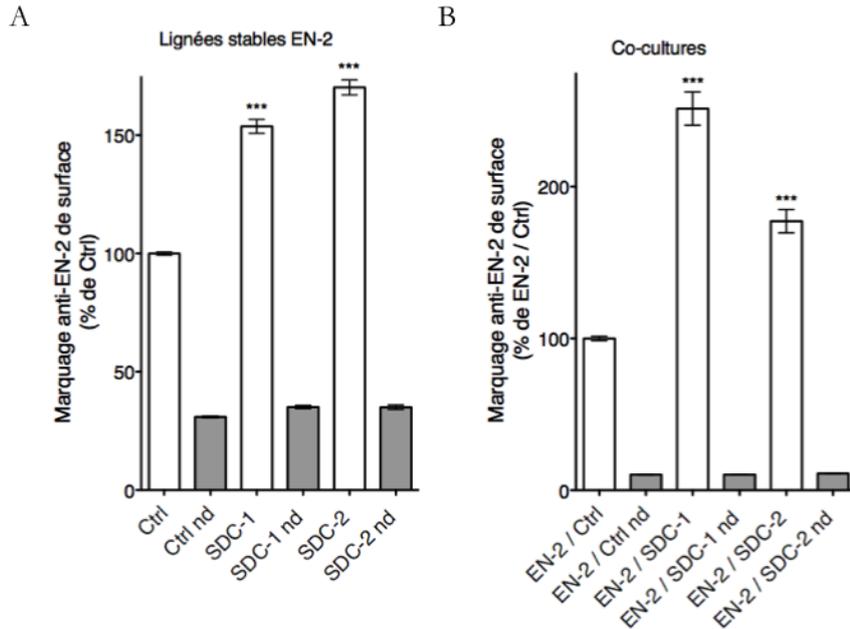


FIGURE 26 – L'expression des SDC-1 et SDC-2 n'influence pas directement le processus de sécrétion de EN-2. (A) Une lignée stable de HEK293 exprimant EN-2 sous contrôle de la doxycycline a été transfectée à l'aide de vecteurs d'expression codant, également sous le contrôle de la doxycycline, pour SDC-1, SDC-2 ou la *renilla* luciférase (Ctrl). Après 24h de culture en présence ou en absence (nd) de doxycycline, l'accumulation à la surface des cellules de la protéine EN-2 sécrétée a été mesurée en cytométrie en flux. (B) Quantification de l'accumulation à la surface des cellules de la protéine EN-2 sécrétée dans le cadre d'une co-culture entre des clones stables de HEK293 exprimant EN-2, sous contrôle de la doxycycline, et des HEK293 naïves (Ctrl) ou exprimant stablement SDC-1 ou SDC-2, là encore sous contrôle de la doxycycline. La mesure par cytométrie en flux a été réalisée après 24h de culture avec ou sans (nd) doxycycline. Chaque condition représente la moyenne de quatre mesures indépendantes de la moyenne d'intensité de fluorescence de 10^4 cellules. Les barres d'erreur représentent l'erreur type. *** : p -value < 0,001

Chapitre 8

Implication d'une nouvelle séquence dans le transfert intercellulaire d'EN-2.

Dans cette dernière partie, nous allons aborder un autre aspect des mécanismes du transfert intercellulaire de EN-2, en nous concentrant non plus sur des partenaires cellulaires mais sur l'identification de nouvelles séquences présentes au sein de EN-2 capables de moduler son mode d'action paracrine. Cette étude fait suite à la fusion entre notre équipe et celle de S. VRIZ, experte dans l'étude de la plasticité chez le poisson zèbre. Cette fusion nous a permis de combiner approches fonctionnelles et cellulaires.

8.1 Un nouveau rôle pour l'hexapeptide ?

Déjà abordée dans l'introduction, une caractéristique de la fonction physiologique des homéoprotéines est de reposer sur deux modes d'action distincts, le premier, intracrine, associé à l'activité transcriptionnelle de la protéine et le deuxième, paracrine, nécessitant son transfert entre cellules. Les contributions respectives de ces deux modes d'action constituent une question essentielle pour l'étude de ces protéines. Des stratégies basées sur l'analyse de mutants affectant spécifiquement l'une des deux voies peuvent s'avérer efficaces, pour peu que la spécificité de l'effet des mutations testées soit démontrée. Rappelons le rôle crucial de l'homéodomaine dans les deux modes d'action. Nous avons mis en évidence l'action paracrine de EN-2 dans la régionalisation du cerveau antérieur chez le poisson zèbre. Deux paralogues du gène *En-2* sont exprimés dans le poisson zèbre (*Eng2a* et *Eng2b*). Etonnamment, l'action paracrine d'un seul des deux (*Eng2b*) est requise pour cette fonction. Nous avons pu démontrer que ces deux protéines (*Eng2a* et *Eng2b*) avaient des capacités intrinsèques de transfert similaires entre cellules en culture, suggérant que leur capacité d'action paracrine est modulée par le contexte physiologique.

Il avait été reporté dans des études antérieures que l'activité transcriptionnelle (intracrine) de EN-2 était requise, se basant sur l'étude de protéines mutées pour un domaine appelé hexapeptide. Ce motif de 6 acides aminés situé en

amont de l'homéodomaine joue un rôle primordial dans l'interaction avec PBX, co-facteur capable de moduler l'activité transcriptionnelle de EN-2 (voir §3.3.1). Nous avons pu démontrer que la mutation de cet hexapeptide, et surtout de deux tryptophanes en son sein, altérerait la capacité de transfert intercellulaire de EN-2. Plus précisément, la mutation des deux tryptophanes entraîne une baisse significative de l'internalisation de EN-2 *in vitro* mais non de sa sécrétion. Inversement, l'addition d'un polypeptide comprenant l'hexapeptide à l'homéodomaine de EN-2 potentialise clairement son internalisation. L'interaction avec PBX ne semblant pas impliquée dans le transfert, du moins sur la base de nos premiers résultats, l'hexapeptide pourrait participer au processus même d'internalisation et donc, au mode d'action paracrine de EN-2. L'ensemble de ces résultats ainsi que la mise en évidence de l'action paracrine de la forme Eng2b dans la segmentation du cerveau chez le poisson zèbre sont présentés dans l'article qui suit.

Ma contribution dans cette étude a été d'analyser le comportement à l'échelle cellulaire des protéines Eng2a et Eng2b et de comparer leurs capacités respectives de sécrétion et d'internalisation, que ce soit entre-elles ou avec la protéine EN-2 de poulet. J'ai également analysé l'influence d'une mutation au sein de l'hexapeptide de EN-2 sur sa capacité de sécrétion et d'internalisation ainsi que l'impact de l'ajout de cet hexapeptide sur l'internalisation de l'homéodomaine de EN-2.

8.2. ARTICLE n° 1 ; CONTRÔLE DE LA SEGMENTATION DU CERVEAU EN DÉVELOPPEMENT PAR LE TRANSFERT PARACRINE D'ENGRAILED : UNE NOUVELLE FONCTION DU DOMAINE D'INTERACTION AVEC PBX.

8.2 Article n° 1 ; Contrôle de la segmentation du cerveau en développement par le transfert paracrine d'Engrailed : une nouvelle fonction du domaine d'interaction avec Pbx.

RESEARCH ARTICLE

Control of brain patterning by Engrailed paracrine transfer: a new function of the Pbx interaction domain

Christine Rampon^{1,2,*}, Carole Gauron^{2,*}, Thibault Lin², Francesca Meda^{2,3}, Edmond Dupont², Adrien Cosson², Eliane Ipendey^{2,3}, Alice Frerot², Isabelle Aujard⁴, Thomas Le Saux⁴, David Bensimon^{3,5,6}, Ludovic Jullien⁴, Michel Volovitch^{2,3}, Sophie Vríz^{1,2,‡} and Alain Joliot^{2,‡}

ABSTRACT

Homeoproteins of the Engrailed family are involved in the patterning of mesencephalic boundaries through a mechanism classically ascribed to their transcriptional functions. In light of recent reports on the paracrine activity of homeoproteins, including Engrailed, we asked whether Engrailed intercellular transfer was also involved in brain patterning and boundary formation. Using time-controlled activation of Engrailed combined with tools that block its transfer, we show that the positioning of the diencephalic-mesencephalic boundary (DMB) requires Engrailed paracrine activity. Both zebrafish Eng2a and Eng2b are competent for intercellular transfer *in vivo*, but only extracellular endogenous Eng2b, and not Eng2a, participates in DMB positioning. In addition, disruption of the Pbx-interacting motif in Engrailed, known to strongly reduce the gain-of-function phenotype, also downregulates Engrailed transfer, thus revealing an unsuspected participation of the Pbx interaction domain in this pathway.

KEY WORDS: Engrailed 2, Diencephalic-mesencephalic boundary, Homeoprotein signalling, Hexapeptide

INTRODUCTION

Engrailed proteins form a subclass of the homeoprotein transcription factor family that play multiple roles in the patterning of metazoan embryos. They specify the posterior identity in the developing fly wing (Hidalgo, 1996), control the midbrain-hindbrain development and are required to pattern the optic tectum in vertebrates (Logan et al., 1996; Araki and Nakamura, 1999; Liu and Joyner, 2001; Scholpp and Brand, 2001; Scholpp et al., 2003). Conserved domains in Engrailed proteins include the homeodomain (HD), the DNA-binding motif that defines homeoproteins; Gehring et al., 1994) and a hexapeptide shared with many homeoproteins, which is responsible for the interaction with cofactors of the PBC (exd and Pbx) family (Peltenburg and Murre, 1996). In addition to their cell-autonomous

action, homeoproteins can also transfer between cells through their secretion and internalisation, both relying on non-conventional routes (Volovitch et al., 1993; Prochiantz and Joliot, 2003; Spatazza et al., 2013a). The transfer property primarily resides within the HD itself, which contains two distinct peptide motifs involved in secretion and internalisation (Derossi et al., 1994; Dupont et al., 2007). This unusual behaviour for transcription factors endows several homeoproteins (which by definition all contain the HD motif) with paracrine signalling properties, as reported for Engrailed in fly crossvein development (Layalle et al., 2011) or vertebrate axonal retino-tectal projection (Brunet et al., 2005; Wizenmann et al., 2009), as well as for other homeoproteins in neuronal plasticity (Sugiyama et al., 2008; Beurdeley et al., 2012; Spatazza et al., 2013b), eye field development (Lesaffre et al., 2007), oligodendrocyte migration (Di Lullo et al., 2011) or cell proliferation (Zhou et al., 2012).

One of the best documented roles of Engrailed in vertebrates is its ability to regulate boundary formation during brain development (Joyner, 1996), classically referring to the (intracrine) transcriptional activity of the protein but without considering the possible contribution of its paracrine activity. To address this issue, we chose zebrafish because the formation of the diencephalic-mesencephalic boundary (DMB) has been elegantly analysed in this model by gain- and loss-of-function approaches. The two early expressed Engrailed proteins (Eng2a and Eng2b) are key determinants of forebrain identity at the DMB (Scholpp and Brand, 2001; Scholpp et al., 2003; Erickson et al., 2007). Because it has been shown that in mice, chicken and *Xenopus* axon guidance in the optic tectum is dependent on the paracrine activity of Engrailed (Brunet et al., 2005; Wizenmann et al., 2009), we asked whether diencephalon-mesencephalon patterning also depends on this activity. To study the role of Engrailed intercellular transfer in the establishment of the DMB, we took advantage of our ability to precisely control the temporal activity of proteins fused to the oestrogen receptor ligand-binding domain ER^{T2}. Upon photoactivation, a caged tamoxifen analogue (cyclofen) binds to the ER^{T2} domain (Sinha et al., 2010a,b), releasing the fusion proteins from the complex they form with cytoplasmic chaperones. This approach, combined with the use of antibodies that block intercellular protein transfer *in vivo*, allowed us to address the role of Engrailed paracrine activity in brain patterning.

RESULTS

Engrailed gain of function reduces diencephalon size by paracrine signalling

Injection of *eng2b* mRNA at the one-cell stage results in an anterior shift of the DMB (Scholpp et al., 2003). Given the multiple functions of Engrailed, we chose to perform inducible gain-of-function experiments by using the precisely controlled timing of Engrailed activation. Following injection of its mRNA at the one-cell stage, the protein of interest fused to ER^{T2} (Feil et al., 1997)

¹Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris 75205, Cedex 13, France.

²Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB) - CNRS UMR 7241, INSERM U1050, Labex MemoLife, PSL Research University, Collège de France, Paris F-75005, France. ³École Normale Supérieure, Institute of Biology at the École Normale Supérieure (IBENS), CNRS UMR8197, INSERM U1024, PSL Research University, Paris F-75005, France. ⁴École Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC PASTEUR, 24, rue Lhomond, Paris 75005, France. ⁵Laboratoire de Physique Statistique, UMR CNRS-ENS 8550, Paris F-75005, France. ⁶Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, CA 90095-1569, USA.

*These authors contributed equally to this work

‡Authors for correspondence (vriz@univ-paris-diderot.fr; Alain.joliot@college-de-france.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 13 June 2014; Accepted 2 March 2015

was activated upon UV illumination of caged cyclofen ligand, added in the water bath. We first used an orthologous chicken Engrailed 2 (En2), similar to the zebrafish Engrailed 2 proteins (Eng2a and Eng2b), because its photoactivation has been well characterised in a previous study (Fournier et al., 2013). The amount of injected RNA was calibrated to produce less than 10% of diencephalon malformation in the absence of En2-ER^{T2} activation (whatever the readout). En2-ER^{T2} expressed in zebrafish embryos was activated at various stages of development by photorelease of cyclofen. Reduction of the expression domain of the Pax6 diencephalic marker at 1 day post-fertilisation (dpf) (Scholpp et al., 2003) and reduction of eye size (up to total disappearance) at 2 dpf (Ando et al., 2001) are two reported hallmarks of the En gain-of-function phenotype at the DMB. To determine the optimal time window, we first concentrated on eye size for simplicity. En2-ER^{T2} photo-activation prior to gastrulation induced a widespread insult resulting in abnormal axis and heart development defects in 40% of the embryos, whereas En2-ER^{T2} photoactivation at 50% and 70% epiboly impaired eye formation without any sign of axis abnormality (Fig. 1A,B). Activation of En2-ER^{T2} at the beginning of somitogenesis (1-2 somites) induced almost no phenotype (Fig. 1B). Activation at the 50-70% epiboly time window was thus used for all of the following experiments unless specified.

We next performed a detailed quantitative analysis of the phenotype induced by En activation (the sample size of all experiments is summarised in supplementary material Table S1), by measuring for each embryo the size of the eye field (mean of the two eyes) and the size of the diencephalon, as revealed by the anterior expression domain of *pax6* (*pax6a*) at 1 dpf (Fig. 1C,D). The size of the diencephalon was significantly reduced ($P < 0.001$) upon En2 activation at 50-70% epiboly and strongly correlated

($R = 0.92$) with a corresponding reduction of the eye size (Fig. 1D). Visual scoring of the eye phenotype (performed in a double-blind manner), which perfectly fit with eye measurement (Fig. 1D), was used as readout of diencephalon shortening in subsequent experiments. Additional phenotypes associated with En2 gain of function were observed at other stages of development, from the inhibition of *pax6* expression at the 2-3 somite stage (Fig. 1E), to the selective loss of the pretectal (diencephalic) neural cluster of *ETvmat2:GFP* (*vmat2* is also known as *slc18a2* – ZFIN) neurons at 4 dpf (Wen et al., 2008) (Fig. 1F).

Specific motifs within Engrailed regulate the transfer of the protein, either through its secretion or its internalisation (Joliet et al., 1998; Maizel et al., 1999, 2002) (Fig. 2A), and En2 paracrine signalling activity is lost upon mutation of the internalisation motif (Brunet et al., 2005). A mutation preventing secretion, En2(5E)-ER^{T2} (Maizel et al., 2002), was introduced in the sequence of En2-ER^{T2}, and its impact on Engrailed activity was analysed in the gain-of-function assay described above (Fig. 1). Activation of either mutated protein at the dome stage induced abnormal heart and axis development in ~40% of the embryos (Fig. 2B), indicating that this widespread effect did not involve Engrailed 2 intercellular transfer. By contrast, En2(5E)-ER^{T2} was not able to induce an eye phenotype when photo-activated at 70% epiboly (Fig. 2B), suggesting that intercellular transfer of Engrailed 2 is involved in brain patterning. Besides the reported effect of this mutation on the transfer process, we could not exclude that other functions could be affected as well, including at the transcriptional level. To test this hypothesis, the transcriptional activities of Engrailed and of its mutated form were compared on the *Map1b* promoter fused to a luciferase reporter in HeLa cells (Fig. 2C). A 2 kilobase long fragment of the *Map1b* rat promoter is regulated by Engrailed in cell culture and *in vivo* in

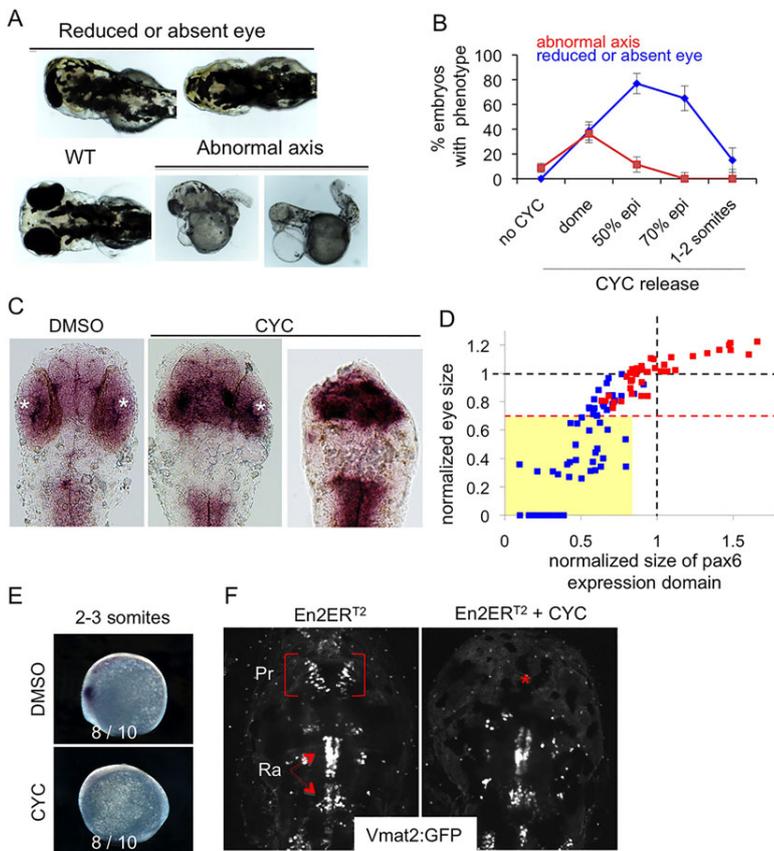
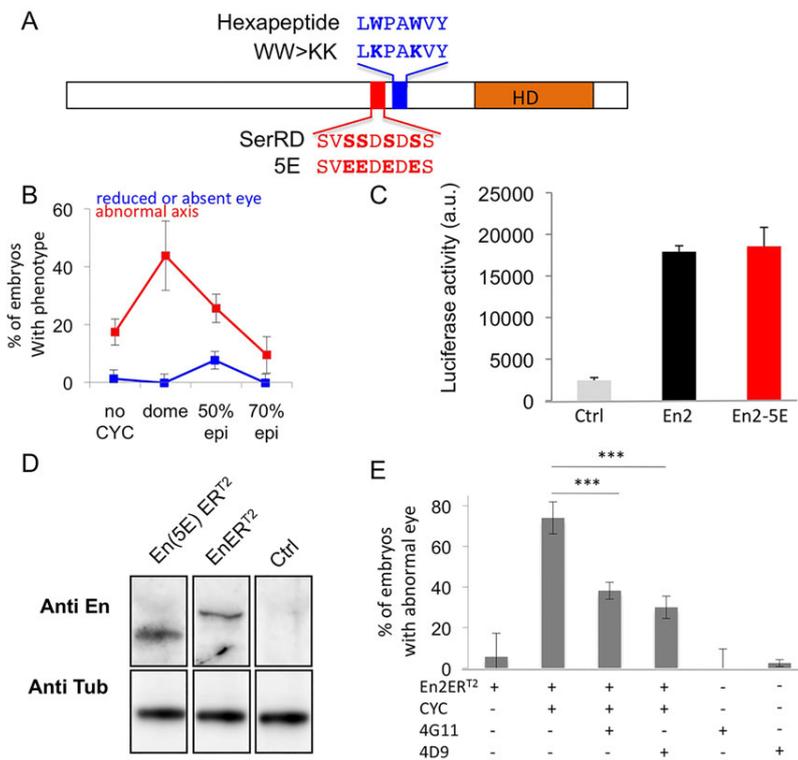


Fig. 1. Engrailed gain of function results in reduction in both *pax6* expression domain and eye size. (A-F) mRNA encoding En2ER^{T2} was injected at the one-cell stage and the protein was activated at different times of development. Eye size reduction (up to total disappearance) and axis abnormality phenotypes (A) were scored at different times of activation controlled by cyclofen release (B). WT, wild type; epi, epiboly. Diencephalons were measured on flat-mount embryos as the anterior *pax6* expression domain (C) and compared to the eye phenotype (mean of the two eye sizes) for each embryo (D), demonstrating the correlation between these two parameters. White asterisks, eye position; red squares, control; blue squares, activated Engrailed. The dashed red line indicates the limit below which eyes were scored as reduced (or absent). All the embryos of this class (yellow box) have a small anterior *pax6* expression domain. Additional effects of En2 activation were apparent at the 2-3 somite stage with the loss of the anterior *pax6* expression domain (E) and at 4 dpf with the selective loss of the pretectal *vmat2:GFP* neuronal cluster (red asterisk) (F). Pr, pretectal cluster; Ra, raphe.



vertebrates (Montesinos et al., 2001). En2 and En2(5E) were equally competent for MAP1B activation, increasing luciferase expression by sevenfold. We also verified the expression of the two proteins in zebrafish. Following RNA injection at the one-cell stage and cyclofen activation, cell extracts from injected embryos expressing En2-ER^{T2} or the mutant were analysed by western blotting with a polyclonal anti-Engrailed antibody (Fig. 2D). En2-ER^{T2} and En2(5E)-ER^{T2} were expressed at similar levels.

In zebrafish, Lesaffre et al. have originally demonstrated that extracellular injection of antibodies directed against homeoproteins is an efficient tool for blocking homeoprotein paracrine activity, leaving the intracrine activity intact (Lesaffre et al., 2007). We applied this strategy to rescue the gain-of-function phenotype induced by En2 ectopic expression. Zebrafish embryos were injected at the one-cell stage with *en2-ER^{T2}* mRNA followed at blastula stage by injection, in the intercellular space, of two different monoclonal antibodies directed against either the homeodomain (4D9) or an N-terminal motif (4G11) of Engrailed (Patel et al., 1989; Ericson et al., 1997). Cyclofen or buffer alone was added at 50% epiboly and eye phenotypes were scored at 2 dpf (Fig. 2E). Both 4D9 and 4G11 injections were able to rescue the eye phenotype induced by En2 gain of function, thus corroborating the requirement for En2 intercellular transfer and paracrine activity. Antibodies injected in the intercellular space at the blastula stage do not enter into cells, at least up to the shield stage (Lesaffre et al., 2007), and thus do not perturb homeoprotein intracrine actions. To confirm this observation in our own experimental set-up, which targets slightly later embryonic stages, FITC-labelled anti-Engrailed antibodies were injected using the same protocol and labelling was analysed up to the 90% epiboly stage in live animals. FITC staining remained almost exclusively sequestered in the intercellular space and could only be detected in few pinocytotic vesicles at the later time-point, but never within nuclei (supplementary material Fig. S1).

Fig. 2. Engrailed gain of function involves the paracrine signalling properties of En. (A) Description of the two En2 mutants defective for paracrine signalling. (B) Diencephalon shortening requires En2 transfer. Activation of the En2(5E) transfer-deficient mutant following mRNA injection did not affect the size of the diencephalon. epi, epiboly. (C) Transcriptional activity of wild-type En2 and En2(5E). MAP1B:luciferase reporter plasmid was transfected into HeLa cells with an empty vector (ctrl) or together with the indicated constructs and analysed for luciferase activity after 24 h. a.u., arbitrary units. (D) *In vivo* ectopic expression of En proteins. Zebrafish embryos were injected at the one-cell stage with the indicated constructs. Following CYC addition at 50% epiboly, cell extracts from 90% epiboly embryos were prepared and analysed by western blotting with polyclonal (anti-En) or monoclonal (anti-tub) antibodies. (E) Inhibition of En2 transfer rescued the phenotype of En2 activation. Zebrafish embryos were injected at the one-cell stage with mRNA encoding En2ER^{T2} and injected again in the extracellular space at the blastula stage with two different anti-En antibodies. CYC was added at 50% epiboly in the water bath to activate the protein. Eye phenotypes were scored at 2 dpf. The error bars represent statistical errors. ****P*<0.001.

Zebrafish Engrailed 2a and 2b are competent for intercellular transfer *ex vivo* and *in vivo*

Homeoprotein paracrine activity cannot be dissociated from its ability to transfer between cells, thus it was crucial to confirm the actual intercellular transfer of the inducible form of En2-ER^{T2} in the fish. We used two complementary approaches to directly visualise the transfer process *in vivo*. In the first one, En2-ER^{T2}-expressing cells were specifically labelled by tandem translation of mCherry from the same mRNA molecule (En2-ER^{T2}-P2A-mCherry). Injection of plasmid DNA at the one-cell stage led to mosaic expression of the injected construct (encoding both mCherry and En2-ER^{T2}), as classically reported. Embryos treated with cyclofen at 50% epiboly to activate En2-ER^{T2} were fixed at 90% epiboly and processed for immunodetection of En2-ER^{T2} and mCherry. En2-ER^{T2} was detected in non-expressing cells characterised by the absence of mCherry staining, suggesting En2-ER^{T2} intercellular transfer (Fig. 3A; supplementary material Fig. S2 for separate channels). In the same experimental set-up, following injection of a plasmid DNA expressing the mutated protein En2(5E)-ER^{T2}-P2A-mCherry, the *in vivo* intercellular transfer of the mutated form of En2 was drastically reduced (supplementary material Fig. S2). To unambiguously confirm *in vivo* intercellular transfer of En2 with the reverse strategy, mCherry-expressing cells were grafted into En2-ER^{T2}-expressing embryos (Fig. 3B). Cells co-labelled with mCherry and En2-ER^{T2} were detected (Fig. 3B). This unambiguously demonstrates the intercellular transfer of En2-ER^{T2} between 50% and 90% epiboly, at the time of its paracrine action on brain patterning.

Zebrafish Engrailed (Eng2a and Eng2b) differ to some extent from chicken Engrailed (En2) outside the highly conserved homeodomain. We asked whether they retained the intercellular transfer property. We compared the secretion and internalisation of the two zebrafish proteins to those of En2. Homeoprotein internalisation was directly visualised in cultured live cells,

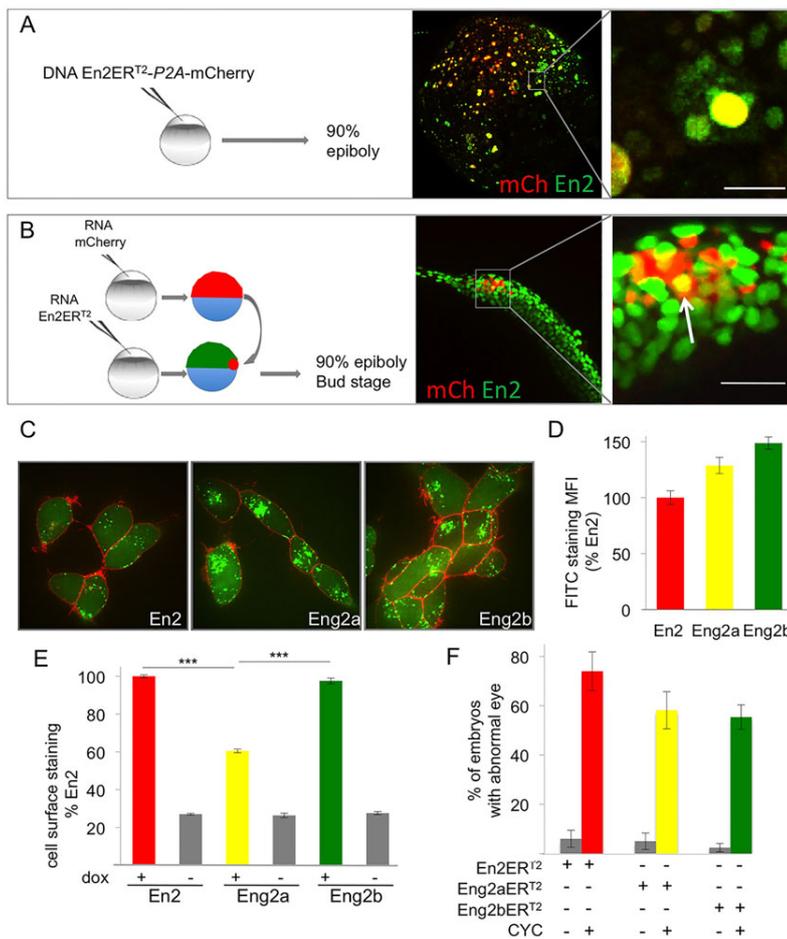


Fig. 3. Zebrafish Engrailed 2a and 2b are able to transfer between cells *in vivo* and *ex vivo*. (A,B) *In vivo* intercellular transfer of En2 protein. (A) The En2ER^{T2}-P2A-mCherry plasmid was injected at the one-cell stage (10 ng/μl). Embryos were fixed at 90% epiboly and immunostained for En2ER^{T2} (green) and mCherry (red). En2 transfer was visualised by the presence of En2ER^{T2} staining (green) in non-injected cells (negative for mCherry staining). (B) Cells expressing mCherry (red) were transplanted into 30% epiboly embryos ubiquitously expressing En2ER^{T2}. En2ER^{T2} transfer was revealed by the detection of En2ER^{T2} signal (green) in mCherry-positive cells (yellow cells, arrow). Scale bars: 20 μm. (C,D) Internalisation of Eng2a and 2b in HEK293 cells. Following extracellular addition, internalisation of fluorescein-labelled En2, Eng2a or Eng2b protein (green) was visualised (C) and quantified (D) after 1 h incubation at 37°C in the presence of 0.4% Trypan Blue (red) to quench extracellular fluorescence. MFI, mean fluorescence intensity. (E) Secretion of Eng2a and 2b. HEK293 cells expressing the indicated proteins under the control of doxycycline were cultured for 24 h and cell surface accumulation of the secreted protein was monitored by flow cytometry. ****P*<0.001. (F) Paracrine activity of Eng2a and Eng2b proteins. mRNA encoding En2ER^{T2}, Eng2aER^{T2} or Eng2bER^{T2} were injected at the one-cell stage, the protein was activated with CYC at 50% epiboly and eye defects were scored at 30 hpf. The error bars represent statistical errors (F) or s.e.m. (D,E).

following incubation of the fluorescently labelled recombinant proteins in the medium. Importantly, the cell-non-permeable fluorescence quencher Trypan Blue was added to the medium just prior to imaging in order to block extracellular fluorescence signal while leaving the intracellular one intact. As shown in Fig. 3C,D, all three proteins were similarly internalised, although internalisation was more efficient for Eng2b.

In cell culture, secreted homeoproteins mainly concentrate at the cell surface owing to strong electrostatic interactions with carbohydrates, and they can be detected on live cells with conventional flow cytometry techniques, as reported for FGF2 secretion (Engling et al., 2002). When expressed in the human embryonic kidney (HEK)293-FlpIn TREX cell line (which allows inducible expression upon doxycycline addition), all three proteins were detected at the cell surface (Fig. 3E), and thus were efficiently secreted, although at lower levels for Eng2a. These experiments demonstrate that *ex vivo*, intercellular transfer is a shared property of the three Engrailed proteins. To confirm these results *in vivo*, we verified that Eng2a and 2b behaved similarly to En2 in the transfer assay set-up in the fish (supplementary material Fig. S2).

We then compared the efficiency of Eng2a, Eng2b and En2 in inducing the eye phenotype described above. Following injection of mRNA encoding En2-ER^{T2}, Eng2a-ER^{T2} or Eng2b-ER^{T2} and activation by cyclofenolone, phenotypes were scored at 30 h post fertilisation (hpf) by counting the number of embryos with eye defects. All three proteins were able to induce an eye phenotype, with comparable efficiencies (Fig. 3F).

Intercellular transfer of Eng2b is required for normal brain patterning

In the course of the *ex vivo* experiments, we noticed that the two antibodies, 4D9 and 4G11, behaved differently on the two zebrafish Engrailed 2 proteins. Although 4D9 recognised both Eng2a and Eng2b, 4G11 recognised only Eng2a on western blots and by immunohistochemistry (Fig. 4A,B). This observation offered us the opportunity to address the role of the paracrine activity of each of the two endogenous Eng2 proteins in normal brain patterning. Zebrafish embryos were injected into the intercellular space at the blastula stage with either 4G11, 4D9 or control (anti-myc) antibodies. Embryos were fixed at 24 hpf, and the size of the mesencephalon was measured by *in situ* hybridisation against *pax6* or *wnt1*, which delineate the midbrain (Fig. 4C,D). Upon injection, 4D9 (recognising both Eng2a and Eng2b) reduced the size of the mesencephalon (Fig. 4E,F, in a dose-dependent manner; supplementary material Fig. S4), whereas 4G11 (recognising only Eng2a) had no effect (Fig. 4G,H). To confirm the specificity of action of 4D9, we verified that the effect induced by 4D9 injection was abolished upon pre-incubation with its cognate epitope peptide (Fig. 4E,F). It is worth noting that 4D9 in this assay had no effect on eye size (supplementary material Fig. S5), rhombomere formation or oligodendrocyte migration (supplementary material Fig. S6), corroborating the specificity of its action on anterior brain patterning. Given that 4D9 and 4G11 were both able to rescue the reduced eye phenotype induced by En2 activation (Fig. 2E), the absence of the phenotype in 4G11-treated embryos cannot be

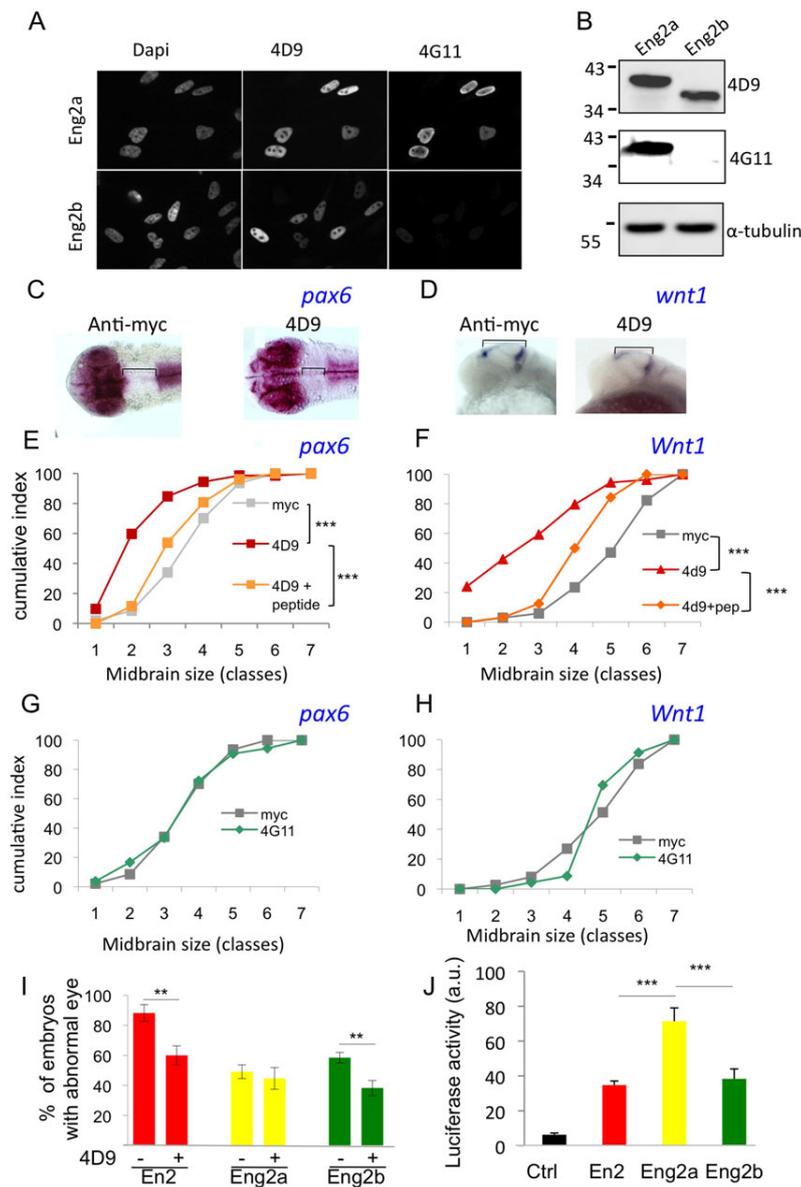


Fig. 4. Intercellular transfer of Eng2b but not 2a is involved in DMB positioning. (A,B) Co-detection of Eng2 proteins with FITC-labelled 4D9 and TRITC-labelled 4G11 antibodies by immunohistochemistry (A) or western blot analysis on HeLa cells (B). Using both techniques, 4D9 recognised Eng2a and Eng2b, whereas 4G11 recognised only Eng2a. (C-H) Paracrine activity of endogenous En2 proteins. Zebrafish embryos were injected in the intercellular space at blastula stage with anti-myc or anti-Engrailed (4G11 or 4D9) antibody. Mesencephalon length was quantified by *pax6* (C,E,G) or *wnt1* (D,F,H) *in situ* hybridisation. Representative *in situ* hybridisation staining of *pax6* (dorsal view) (C) and *wnt1* (lateral view) (D). Measurements were distributed into seven size classes (smallest size, class 1) and plotted as cumulative frequency index. 4D9 extracellular injection induced mesencephalon shortening (E,F) in a dose-dependent manner (supplementary material Fig. S4), which was the case for neither anti-myc (E-H) nor 4G11 injection (G,H). Co-injection of the 4D9 antibody with its epitope peptide (pep) significantly reduced this effect (E,F). *** $P < 0.0001$, Mann-Whitney tests. (I) Inhibition of homeoprotein transfer rescued the phenotype of Eng2b activation but not of Eng2a. Zebrafish embryos were injected at the one-cell stage with the indicated mRNAs and injected again in the extracellular space at the blastula stage with 4D9 anti-En antibody. CYC was added at 50% epiboly in the water bath to activate the protein. Eye phenotypes were scored at 2 dpf. The error bars represent statistical errors. (J) Transcriptional activity of En2 and the two zebrafish Eng2. The *MAP1B:luciferase* reporter plasmid was transfected into HeLa cells along with an empty vector (Ctrl) or together with the indicated constructs, and cells were analysed for luciferase activity after 24 h. a.u., arbitrary units. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

simply attributed to its inability to block intercellular transfer. Although both Eng2a and Eng2b have the capacity to transfer between cells, only Eng2b paracrine signalling activity is required for correct brain patterning. This result led us to reconsider the gain-of-function phenotypes induced by the two zebrafish Engrailed proteins and, more precisely, their sensitivity to blocking antibody treatment. Surprisingly, treatment with 4D9, which equally recognises Eng2a and b (Fig. 4A,B), decreased the frequency of eye phenotypes induced by Eng2b but not by Eng2a mRNA injection (Fig. 4I). If Eng2a paracrine action did not account for the eye phenotype, we asked whether the intracrine action of the protein differs from that of Eng2b or En2. The transcriptional activity of the Eng2a tested on the MAP promoter in HeLa cells was increased almost twofold compared with that of the other proteins (Fig. 4J), suggesting a more efficient intracrine action of Eng2a.

It has been proposed previously that Engrailed gain of function induced a transformation of forebrain tissue identity towards a mesencephalic fate rather than an intrinsic shortening of the diencephalon (Scholpp et al., 2003). We indeed observed that

activation of En2 at the appropriate time did not affect apoptosis during development (supplementary material Fig. S7), supporting an identity switch between the two adjacent structures. To confirm this hypothesis, we compared the relative size of the anterior *pax6*-positive (diencephalic) and adjacent *pax6*-negative (mesencephalic) domains in all control and treated animals (injected with 4D9 antibody) previously analysed in Fig. 4. Mesencephalon shortening induced by blocking En2 transfer with 4D9 (red squares) was correlated with a corresponding enlargement of the diencephalon (Fig. 5). To our surprise, the reverse effect in gain-of-function experiments was not as clear, the size of the mesencephalon being not statistically affected by En2 ectopic expression, despite the significant shortening of the diencephalon (blue squares) (Fig. 5).

The Pbx interaction domain regulates Engrailed 2 paracrine activity

The effect of Eng2a on DMB positioning requires its interaction with Pbx co-factors (Erickson et al., 2007). The two tryptophan residues located within the Pbx interaction domain of Eng2a (or

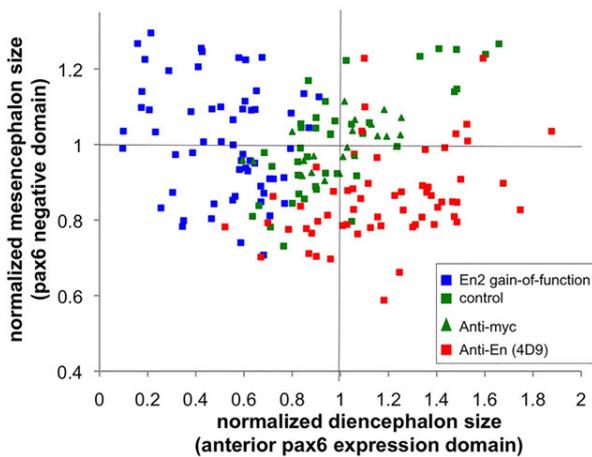


Fig. 5. Relative size of the anterior *pax6*-positive domain and *pax6*-negative domain. Sizes of the anterior *pax6* expression domain and of the *pax6*-negative domain were measured on flat-mount embryos stained for *pax6* expression by *in situ* hybridisation at 1 dpf. Green and blue squares, En2 mRNA was injected at the one-cell stage and CYC was added (blue) or not (green) at 50% epiboly. Green triangles (anti-myc control) and red squares (anti-Engrailed), antibodies were injected at the blastula stage to block Engrailed paracrine activity.

'hexapeptide', Fig. 2A) are mandatory in mediating the cooperative binding of the complex on DNA, and their mutation into lysine drastically reduces the gain-of-function phenotype induced by *Eng2a* overexpression (Erickson et al., 2007). These results were consistent with the cell-autonomous initial activation of *Eng2b* transcription by the *Eng2a*-Pbx complex (Scholpp and Brand, 2001; Erickson et al., 2007), but did not reveal the possible connection, if any, with the paracrine activity of Engrailed.

We first assessed the selectivity of the hexapeptide mutation towards *Eng2a* function by engineering equivalent WW>KK substitutions in the En2, *Eng2a* and *Eng2b* constructs. The mRNAs coding for the mutant forms of Engrailed-ER^{T2} were injected into zebrafish embryos at the one-cell stage, embryos were incubated in cyclofen at 50% epiboly, and eye defects were scored at 30 hpf. Introducing the WW>KK double mutation similarly decreased the occurrence of the eye phenotype for the three Engrailed 2 proteins (Fig. 6A). Although the mutation might appear to selectively affect the intracrine component of Engrailed action, we wondered whether the removal of two tryptophans near the homeodomain might also affect intercellular transfer, given the crucial role of such residues in the internalisation process (Le Roux et al., 1993; Derossi et al., 1994). We tested the ability of the mutant forms of En2 to exit and enter cells using the cell culture quantitative assays described above. When expressed in HEK cells, the mutant and wild-type proteins were secreted to similar extents (Fig. 6B), meaning that the integrity of the hexapeptide is not required for En2 secretion. By contrast, the internalisation of the mutated protein by HEK cells was significantly reduced compared with that of its wild-type counterpart (Fig. 6C,D). We reasoned that, conversely, the presence of the hexapeptide on its own might increase the uptake process. This would corroborate unpublished observations that in this experimental model, full-length En2 homeoprotein uptake was higher than that of an En2 homeodomain fragment (Fig. 6C,E). A 12 amino-acid long peptide bearing the hexapeptide was fused to the N-terminus of the En2 homeodomain and its uptake was evaluated. Addition of the hexapeptide restored the uptake of the En2 homeodomain to levels comparable to those of the full-length

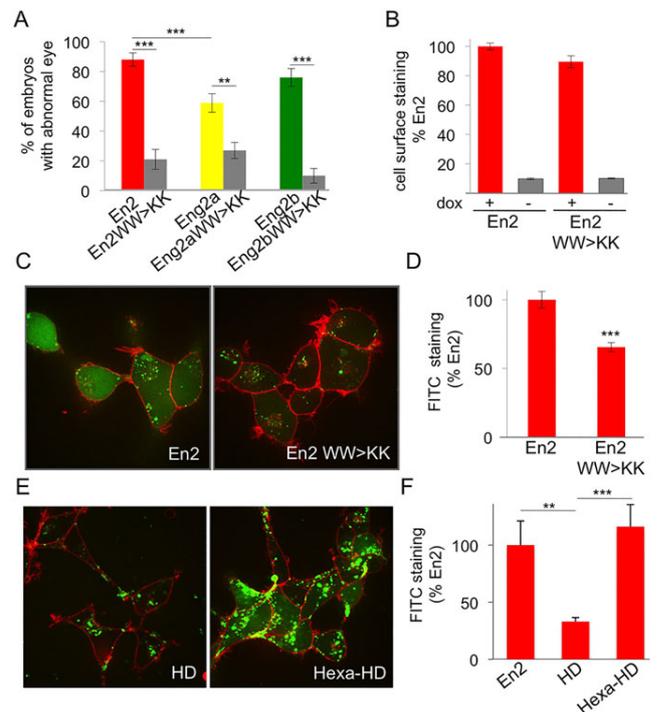


Fig. 6. Pbx interaction domain controls En paracrine activity.

(A) Phenotypic analysis of hexapeptide-mutated forms of En2 protein. Compared to their wild-type counterparts, the eye phenotype induced by the activation of hexapeptide mutants was drastically reduced. The error bars represent statistical errors. (B-D) Intercellular transfer of En2 hexapeptide mutant *ex vivo*. HEK293 cells expressing the indicated proteins under the control of doxycycline were cultured for 24 h and cell surface accumulation of the secreted protein was monitored by flow cytometry (B). Internalisation of fluorescein-labelled En2, or En2 WW>KK (green) was visualised (C) and quantified (D) after 1 h incubation at 37°C in the presence of 0.4% Trypan Blue (red) to quench extracellular fluorescence. (E,F) Internalisation of fluorescein-labelled En2, En2HD, Hexa-En2HD was visualised (E) and quantified (F) as described above. The error bars represent statistical errors (A) or the s.e.m. (B,D,F). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

homeoprotein (Fig. 6C,E,F). Overexpression of Pbx neither significantly alters En2 location nor interferes with its intercellular transfer (secretion and internalisation) properties (supplementary material Fig. S3), although internalisation was occasionally slightly reduced. We then conclude that the hexapeptide per se potentiates homeodomain uptake and, therefore, that the WW>KK mutation, known to disrupt Pbx-Engrailed transcriptional complexes, also impairs the paracrine component of Engrailed action, by lowering the efficacy of protein trafficking.

DISCUSSION

In this study, we show that ectopic En2 modifies brain patterning only when activated between dome and 1-2 somite stages, corroborating and refining the initial experiments performed with *Eng2a* (Ando et al., 2001) or *Eng2b* (Scholpp et al., 2003). It is worth noting that this coincides with the time that *Eng2a* and *b* are expressed (Scholpp et al., 2003), suggesting that the time window during which Engrailed controls anterior brain patterning is relatively narrow (90% epiboly to 1-2 somite stages). Most importantly, we demonstrate that the paracrine activity of En2 homeoprotein is required for this process, using two distinct but complementary strategies. First, brain patterning defects are not observed with the secretion-defective mutant En2(5E), although its

ability to regulate transcription remains unaffected. Secondly, these defects are reversed by the selective inhibition of En2 paracrine action through the extracellular injection of two different anti-En antibodies. By contrast, axis malformations resulting from early En2 activation are equally observed with wild-type and mutant proteins and are insensitive to antibody treatment. Indeed, these axis malformations are likely to rely on unspecific activity.

During zebrafish development, *eng2a* is expressed slightly before *eng2b* and activates *eng2b* expression (Scholpp and Brand, 2001). However, the two Eng2 proteins behave differently regarding their paracrine activity, although both are competent for secretion and internalisation. The function of endogenous Eng2a relies preferentially on its intracrine action, because treatment with the 4G11 antibody, which recognises only Eng2a, has no effect on brain patterning. Moreover, 4D9 antibody, which recognises an invariant epitope within the three tested Engrailed proteins (supplementary material Fig. S8), antagonises the action of Eng2b and En2, but not of Eng2a. Although both are competent for intercellular transfer *ex vivo*, Eng2a and b, arising from a recent duplication, might have retained distinct modes of action (intracrine or paracrine), supported by the increased transcriptional activity of Eng2a. This enhanced intracrine activity might account for the eye phenotype in the context of ectopic expression where the protein is expressed throughout the embryo.

It should be noted that at 90% epiboly (when the paracrine action is required) *eng2a* expression occurs within the *eng2b* domain (Lun and Brand, 1998; Postlethwait et al., 1998). The broader expression of *eng2b* over *eng2a*, meaning that *eng2b* extends closer to the DMB, might account for the preferential requirement of Eng2b paracrine activity. Indeed, we have previously shown that extracellular Engrailed in the *Drosophila* wing disc has a limited diffusion, restricted to a few cell rows (Layalle et al., 2011). Similarly, the source of extracellular Engrailed in zebrafish might be restricted to the Eng2b-positive but Eng2a-negative cell population. Alternatively, we cannot exclude that endogenous Eng2a exerts some paracrine activity, but its loss would be compensated for by Eng2b paracrine activity. Such functional redundancy between the two Eng2 proteins has been observed in loss-of-function experiments, where the downregulation of either Eng2a or 2b by morpholino injection induced little phenotype compared to the co-injection of the two morpholinos (Scholpp et al., 2003).

Homeoprotein expression is often endowed with positional information. The sharp spatial restriction of the extracellular secreted protein from the edges of these territories combined with the requirement for intracrine (transcriptional or translational) homeoprotein action might be the two crucial spatial determinants that convert this positional information into the formation of actual boundaries with unique properties. However, the careful quantification of gain- and loss-of-function phenotypes leads to intriguing observations. According to the classical view of DMB positioning, the DMB shift inversely affects the two structures (mesencephalon and diencephalon) located at either side of the boundary, the expansion of one structure occurring at the expense of the other one. Quantification of the lengths of diencephalic and mesencephalic structures for each embryo, measured with the anterior *pax6* expression domain and the posterior adjacent *pax6*-negative domain, respectively, highlighted an inverted correlation between the size of the two structures in loss-of-paracrine-function experiments, but not in gain-of-function experiments. However, even in the latter case, the diencephalic identity is clearly affected, illustrated by the loss of pretectal *vmat2* neurons. Our attempts to quantify cell proliferation (by phospho-H3 staining) in the presence or absence of En2 activation were not conclusive, owing to high spatial heterogeneity at the level of the

whole embryo and the fact that identification of the prospective anterior brain structures at this embryonic stage is still challenging. A likely hypothesis would be that, superimposed on DMB positioning, the relative growth of the two structures is regulated independently by other mechanisms, as proposed previously (Scholpp et al., 2003), which would be insensitive to Engrailed paracrine action.

In gain-of-function experiments, DMB positioning is sensitive to Engrailed paracrine activity, although one-cell stage Engrailed mRNA injection should lead to the broad expression of Engrailed, including in cells that respond to extracellular Engrailed. This suggests complementary functions of intracrine and paracrine activities displayed by the same homeoprotein. Such a situation appears to be a recurrent feature of homeoprotein dual activity, first described with the Ephrin signalling pathway in retinal ganglion cell (RGC) axonal guidance (Wizenmann et al., 2009), and more recently with the Dpp pathway in crossvein formation of the *Drosophila* wing (Layalle et al., 2011). In the latter case, the transcription of *dpp* is directly downregulated by Engrailed but, in the same cells, Engrailed transfer stimulates Dpp signalling (pMAD phosphorylation). The fact that ectopic expression of two analogous proteins (Eng2a and b) led to a similar eye phenotype through either intracrine or paracrine action reinforces the functional link between the two modes of homeoprotein action towards the same goal, a situation that has been reported for other proteins (Radisky et al., 2009).

The dual function of the hexapeptide is a new paradigm of the crosstalk between intracrine and paracrine homeoprotein action. This conserved motif is found in a subset of homeoproteins and governs the physical interaction with the PBC family of co-factors (Chang et al., 1995; Neuteboom et al., 1995; Phelan et al., 1995), although hexapeptide-independent complexes have been described recently (Hudry et al., 2012). Moreover, PBC proteins are crucial regulators of brain patterning at the DMB, acting in synergy with Eng proteins (Erickson et al., 2007). We found no evidence for a regulation of Engrailed transfer by PBC proteins. Pbx1 over-expression affected neither Engrailed secretion in HEK cells nor (or only slightly) Engrailed uptake. We propose that intracrine and paracrine actions of Engrailed cooperate for brain patterning and both actions depend on the hexapeptide through distinct mechanisms. The precise role of the hexapeptide in paracrine activity remains to be determined and, at this stage, we cannot formally exclude that En-Pbx interaction has some impact on Engrailed transfer. An extended mutation analysis encompassing the hexapeptide of Engrailed might help to discriminate between the two functions of this domain and evaluate the actual role of Pbx. It should be kept in mind that in addition to Engrailed proteins, all the Hox proteins of the paralog groups 1-8 contain the hexapeptide (Knoepfler and Kamps, 1995), mutation of which almost invariably leads to strong loss-of-function phenotype (Moens and Selleri, 2006). Our findings shed new light on the putative roles of this sequence as we show that its mutation impairs intercellular transfer, a shared property of many homeoproteins. This might lead to the revisiting of experiments in which mutation or lure (competing or decoy peptide) was assumed to act selectively on homeoprotein-PBC interactions without also considering paracrine homeoprotein signalling. This might be of importance in developmental processes and also in pathological contexts such as oncogenesis, given that the hexapeptide motif is the target of several therapeutic strategies (Morgan et al., 2007; Delval et al., 2011).

MATERIALS AND METHODS

Fish care

Zebrafish were maintained and staged according to Westerfield (1993). Experiments were performed using the standard Ab wild-type strain. The

following zebrafish transgenic line was used: Tg(*ETvmat2:GFP*) (Wen et al., 2008). This transgenic line was a gift from Shuo Lin (UCLA, CA, USA). The embryos were incubated at 28°C. Developmental stages were determined as hours post-fertilisation (hpf). The animal facility obtained a French agreement from the ministry of agriculture for all the experiments performed in this study (agreement number C 75-05-12).

Nucleic acids and antibody injection

Plasmids (10 ng/μl) were injected at the one-cell stage. *Engrailed-ER^{T2}* or *mCherry* mRNA synthesis was performed using the mMACHINE Transcription Kit from Ambion. Equivalent volumes of 30 ng/μl *engrailed-ER^{T2}* mRNA or 50 ng/μl *mCherry* mRNA were injected into one-cell stage embryos. Mouse monoclonal antibodies (anti-Engrailed 4D9, developed by C. Goodman, and anti-Engrailed 4G11, developed by T. Jessell, both obtained from DSHB, University of Iowa, and anti-myc 9E10, Roche Applied Science) were used for *in vivo* injection (100 ng/μl) at the blastula stage as described previously (Lesaffre et al., 2007).

Engrailed-ER^{T2} activation

Caged 4-OH cyclofen (cCYC) or 4-OH cyclofen (CYC) were prepared as described previously (Sinha et al., 2010a). Embryos injected with *engrailed-ER^{T2}* mRNA at the one-cell stage were incubated in 3 μM cCYC and illuminated at specific time-points to determine the time window for Engrailed involvement in DMB position. For all other experiments involving Engrailed-ER^{T2} activation, 1 μM CYC was added in water at 50% epiboly as described previously (Sinha et al., 2010b).

Immunohistochemistry

Whole-mount immunohistochemistry

Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Life Technologies) was diluted 1:500, mouse anti-myc antibody (9E10, Roche) was diluted 1:500 and mouse anti-mCherry (Clontech) was diluted 1:250.

Cell culture immunocytochemistry

Cells grown on coverslips were fixed with paraformaldehyde (4%, 10 min, room temperature) in PBS, permeabilised with Triton X-100 (0.3%, 5 min, room temperature) and saturated with PBS containing 10% sheep serum before incubation with primary antibodies (4D9 or 4G11 anti-Engrailed antibody at 5 μg/ml, 1 h, room temperature) and secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, 1:500, 1 h, room temperature).

In situ hybridisation and morphometric analysis

RNA probes and whole-mount *in situ* hybridisation were carried out using a robot (Intavis) according to standard procedure (Thisse and Thisse, 2008); details concerning the program used are available upon request. Morphometric analysis was performed on flat-mount 24 hpf embryos using Axiovision 4.8 software.

Embryo imaging

Images were obtained using a Nikon microscope with a spinning-disk (Roper) operated with Metamorph premier 7.6 software, a Leica SP5 confocal microscope driven by LAS AF software or a binocular Nikon SMZ 1500.

Grafting experiments

mCherry mRNA (50 ng/μl) was injected at the one-cell stage into donor embryos whereas host embryos were injected at the one-cell stage with *En2ER^{T2}* mRNA (30 ng/μl). At the dome stage, 5-20 donor (red) cells were grafted to the animal pole of host embryos (Ho and Kimmel, 1993). Embryos were then cultured in 0.5% methylcellulose with 10 U/ml penicillin and 10 μg/ml streptomycin.

Western blotting

Cell extracts

At 24 h after transfection, cells were washed three times (PBS), collected (PBS, 2 mM EDTA) and pelleted by centrifugation. The cell pellet was resuspended and sonicated before addition of Laemmli buffer and

SDS-PAGE separation. Proteins were transferred to an immobilon membrane (GE Healthcare) and processed for western blot detection using horseradish peroxidase (HRP)-labelled secondary antibodies, chemiluminescence (ECL Plus, GE Healthcare) and detection (Fuji LAS 4000).

Embryos

Embryos (20 per sample) were kept dried at -80°C before resuspension in PBS supplemented with protease inhibitors and nuclease. Each sample was sonicated (Bioruptor, Diagenode) twice (5 min, 50% cycle, high intensity) and subjected to acetone precipitation. Protein pellets were resuspended in Laemmli buffer, quantified and processed for western blotting.

Cell culture and transfection

Cell culture experiments were performed on COS, HeLa or HEK293 cells as specified in the text or legends, grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Transient transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cells were cultured for an additional 24 h before being processed for analysis by FACS, western blotting, immunocytochemistry or transcription assay. The HEK293 cell line constitutively expresses the tetracycline repressor (HEK293-FlpIN/TREX, Life Technologies) and doxycycline was needed to induce protein expression when tetracycline-sensitive expression plasmids were transfected.

For transcription assays, HeLa cells were co-transfected with luciferase reporter together with the expression plasmids encoding the indicated proteins at a 1:3 ratio. At 24 h after transfection, cells were washed with PBS and lysed in PLB buffer (Promega). Luciferase activity was measured in triplicate on a 96-well plate luminometer (Tristar, Berthold) with the luciferase reporter assay kit (Promega).

Internalisation

Cells (HEK293, 20,000 per well) were plated on μ-slide eight-well plates (Ibidi). After 24 h, the medium was removed and cells were incubated with the fluorescent protein (500 nM) diluted in DMEM without serum for 1 h at 37°C before visualisation on a spinning-disk microscope equipped with a EMCCD camera (Evolve). Cells were analysed either directly to visualise the cell-surface staining, or following addition of Trypan Blue (0.1% final concentration), an efficient quencher of all extracellular fluorescence (and that of permeabilised cells), to visualise the intracellular staining (supplementary material Fig. S9).

Flow cytometry

Cells were seeded at 3×10^5 cells per well and transfected 24 h later. After 6 h, expression was induced with 0.5 μg/ml doxycycline for 24 h. Cells were then washed and harvested as published previously (Engling et al., 2002) before incubation with primary antibody (rabbit polyclonal anti c-myc, Sigma-Aldrich, at 1.25 μg/ml) for 45 min at 4°C, then with secondary antibody (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, at 5 μg/ml) and a dye to detect cell death (TO-PRO 3, 1:1000, Invitrogen) for 30 min at 4°C. Samples were then analysed using a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences). Acquisition and quantification made use of CELLQuest pro software (BD Biosciences) (supplementary material Fig. S9).

DNA constructs and recombinant proteins

DNA constructs (details given in supplementary material Methods and Table S2) are derivatives of plasmids described previously (Maizel et al., 2002; Brunet et al., 2005; Sinha et al., 2010b; Fournier et al., 2013). His6-tagged recombinant proteins produced in bacteria were purified on HisTrap columns (GE Healthcare) and, following removal of the tag by PreScission protease cleavage, the protein was purified again on heparin columns (GE Healthcare). For protein labelling, 100 μM of purified proteins were dialysed for 2 days (20 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.5) prior to incubation with a twofold molar excess of fluorescein isothiocyanate (FITC) in carbonate buffer (50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 9.5, 100 mM NaCl) overnight at 4°C and free FITC was removed by dialysis (24 h, 4°C). The efficacy of FITC incorporation was controlled by SDS-PAGE and

spectral analysis. The FITC:protein molecular ratio is controlled and ranges between 1.5 and 2 for all proteins.

Statistical analysis

The size of the sample for each experiment is given in supplementary material Table S1. Values are expressed as means \pm s.e.m. or statistical errors were estimated as $\sqrt{p(1-p)/n}$, where p is the percentage of embryos exhibiting a phenotype and n is the total number of embryos investigated (or $\sqrt{1/n}$ when $p=0$ or 1). Comparisons between multiple groups were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Comparisons between the two groups were performed by a Student's t -test with Welch correction when variances were unequal. Quantification of anti-En effects was done with the Mann-Whitney test. $P<0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Acknowledgements

We thank Alain Prochiantz (College de France, Paris) for helpful discussions and constant support and Shuo Lin (UCLA, CA) for providing the vmat2:GFP transgenic fish.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

C.R., D.B., L.J., M.V., S.V. and A.J. designed experiments; C.R., C.G., T.L., F.M., E.D., A.C., E.I., A.F., I.A., T.L.S., S.V. and A.J. performed experiments; C.R., D.B., L.J., M.V., S.V. and A.J. prepared and edited the manuscript.

Funding

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche [grant number 08-PCV1-0019-04-PROTEOPHANE] and has received support under the program 'Investissements d'Avenir' launched by the French Government and implemented by the ANR [ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE - ANR-11-IDEX-0001-02 PSL * Research University]. Deposited in PMC for immediate release.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.114181/-/DC1>

References

- Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y. and Okamoto, H. (2001). Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **28**, 317-325.
- Araki, I. and Nakamura, H. (1999). Engrailed defines the position of dorsal diencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* **126**, 5127-5135.
- Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., Hensch, T. K. and Prochiantz, A. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J. Neurosci.* **32**, 9429-9437.
- Brunet, I., Weini, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A. and Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* **438**, 94-98.
- Chang, C. P., Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Largman, C. and Cleary, M. L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* **9**, 663-674.
- Delval, S., Taminiau, A., Lamy, J., Lallemand, C., Gilles, C., Noël, A. and Rezzohazy, R. (2011). The Pbx interaction motif of Hoxa1 is essential for its oncogenic activity. *PLoS ONE* **6**, e25247.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450.
- Di Lullo, E., Haton, C., Le Poupon, C., Volovitch, M., Joliot, A., Thomas, J.-L. and Prochiantz, A. (2011). Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* **138**, 4991-5001.
- Dupont, E., Prochiantz, A. and Joliot, A. (2007). Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *J. Biol. Chem.* **282**, 8994-9000.
- Engling, A., Backhaus, R., Stegmayer, C., Zehe, C., Seelenmeyer, C., Kehlenbach, A., Schwappach, B., Wegehngel, S. and Nickel, W. (2002). Biosynthetic FGF-2 is targeted to non-lipid raft microdomains following translocation to the extracellular surface of CHO cells. *J. Cell Sci.* **115**, 3619-3631.
- Erickson, T., Scholpp, S., Brand, M., Moens, C. B. and Waskiewicz, A. J. (2007). Pbx proteins cooperate with Engrailed to pattern the midbrain-hindbrain and diencephalic-mesencephalic boundaries. *Dev. Biol.* **301**, 504-517.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-180.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 752-757.
- Fournier, L., Gauron, C., Xu, L., Aujard, I., Le Saux, T., Gagey-Eilstein, N., Maurin, S., Dubrulle, S., Baudin, J.-B., Bensimon, D. et al. (2013). A blue-absorbing photolabile protecting group for in vivo chromatically orthogonal photoactivation. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1528-1536.
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- Hidalgo, A. (1996). The roles of engrailed. *Trends Genet.* **12**, 1-4.
- Ho, R. K. and Kimmel, C. B. (1993). Commitment of cell fate in the early zebrafish embryo. *Science* **261**, 109-111.
- Hudry, B., Remacle, S., Delfini, M.-C., Rezzohazy, R., Graba, Y. and Merabet, S. (2012). Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. *PLoS Biol.* **10**, e1001351.
- Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A. (1998). Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.* **8**, 856-863.
- Joyner, A. L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* **12**, 15-20.
- Knoepfler, P. S. and Kamps, M. P. (1995). The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5811-5819.
- Layalle, S., Volovitch, M., Mugat, B., Bonneaud, N., Parmentier, M.-L., Prochiantz, A., Joliot, A. and Maschat, F. (2011). Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development* **138**, 2315-2323.
- Le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A. and Volovitch, M. (1993). Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9120-9124.
- Lesaffre, B., Joliot, A., Prochiantz, A. and Volovitch, M. (2007). Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev.* **2**, 2.
- Liu, A. and Joyner, A. L. (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* **128**, 181-191.
- Logan, C., Wizenmann, A., Drescher, U., Monschau, B., Bonhoeffer, F. and Lumsden, A. (1996). Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic engrailed expression. *Curr. Biol.* **6**, 1006-1014.
- Lun, K. and Brand, M. (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **125**, 3049-3062.
- Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A. and Joliot, A. (1999). A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* **126**, 3183-3190.
- Maizel, A., Tassetto, M., Filhol, O., Cochet, C., Prochiantz, A. and Joliot, A. (2002). Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* **129**, 3545-3553.
- Moens, C. B. and Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* **291**, 193-206.
- Montesinos, M. L., Foucher, I., Conradt, M., Mainguy, G., Robel, L., Prochiantz, A. and Volovitch, M. (2001). The neuronal microtubule-associated protein 1B is under homeoprotein transcriptional control. *J. Neurosci.* **21**, 3350-3359.
- Morgan, R., Pirard, P. M., Shears, L., Sohal, J., Pettengell, R. and Pandha, H. S. (2007). Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer Res.* **67**, 5806-5813.
- Neuteboom, S. T., Peltenburg, L. T., van Dijk, M. A. and Murre, C. (1995). The hexapeptide LFPWWR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9166-9170.
- Patel, N. H., Martin-Bianco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S. (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Peltenburg, L. T. and Murre, C. (1996). Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO J.* **15**, 3385-3393.
- Phelan, M. L., Rambaldi, I. and Featherstone, M. S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3989-3997.
- Postlethwait, J. H., Yan, Y.-L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z. et al. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* **18**, 345-349.
- Prochiantz, A. and Joliot, A. (2003). Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 814-819.
- Radisky, D. C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y. and Bissell, M. J. (2009). Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 228-234.

- Scholpp, S. and Brand, M.** (2001). Morpholino-induced knockdown of zebrafish engrailed genes *eng2* and *eng3* reveals redundant and unique functions in midbrain-hindbrain boundary development. *Genesis* **30**, 129-133.
- Scholpp, S., Lohs, C. and Brand, M.** (2003). Engrailed and *Fgf8* act synergistically to maintain the boundary between diencephalon and mesencephalon. *Development* **130**, 4881-4893.
- Sinha, D. K., Neveu, P., Gagey, N., Aujard, I., Benbrahim-Bouzi, C., Le Saux, T., Rampon, C., Gauron, C., Goetz, B., Dubruille, S. et al.** (2010a). Photocontrol of protein activity in cultured cells and zebrafish with one- and two-photon illumination. *Chembiochem* **11**, 653-663.
- Sinha, D. K., Neveu, P., Gagey, N., Aujard, I., Le Saux, T., Rampon, C., Gauron, C., Kawakami, K., Leucht, C., Bally-Cuif, L. et al.** (2010b). Photoactivation of the CreER T2 recombinase for conditional site-specific recombination with high spatiotemporal resolution. *Zebrafish* **7**, 199-204.
- Spatazza, J., Di Lullo, E., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K. L. and Prochiantz, A.** (2013a). Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacol. Rev.* **65**, 90-104.
- Spatazza, J., Lee, H. H. C., Di Nardo, A. A., Tibaldi, L., Joliot, A., Hensch, T. K. and Prochiantz, A.** (2013b). Choroid-plexus-derived *Otx2* homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell Rep.* **3**, 1815-1823.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A. and Hensch, T. K.** (2008). Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* **134**, 508-520.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59-69.
- Volovitch, M., le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E. and Prochiantz, A.** (1993). Control of neuronal morphogenesis by homeoproteins: consequences for the making of neuronal networks. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1**, 133-138.
- Wen, L., Wei, W., Gu, W., Huang, P., Ren, X., Zhang, Z., Zhu, Z., Lin, S. and Zhang, B.** (2008). Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **314**, 84-92.
- Westerfield, M.** (1993). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio (Brachydanio rerio)*. Eugene, OR: University of Oregon Press.
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J. S. Y., Sonnier, L., Beurdeley, M., Zarbalis, K., Weisenhorn-Vogt, D., Weinl, C., Dwivedy, A., Joliot, A. et al.** (2009). Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* **64**, 355-366.
- Zhou, J., Qin, L., Tien, J. C.-Y., Gao, L., Chen, X., Wang, F., Hsieh, J.-T. and Xu, J.** (2012). *Nkx3.1* functions as para-transcription factor to regulate gene expression and cell proliferation in non-cell autonomous manner. *J. Biol. Chem.* **287**, 17248-17256.

Quatrième partie

Discussion

9.1 Rôle des PI(4,5)P₂ dans le transfert intercellulaire de EN-2.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux nous permettent de proposer un rôle important des PI(4,5)P₂ dans le transfert intercellulaire de EN-2, mais leur mode d'action soulève encore de nombreuses interrogations. Bien que très peu abondants les PI(4,5)P₂ sont des lipides majeurs sur le plan fonctionnel, comme substrat pour la production de messagers secondaires et comme partenaire spécifique pour de nombreuses protéines. Dans ce dernier cas, l'interaction avec les PI(4,5)P₂ constitue un mécanisme efficace d'adressage subcellulaire de ces protéines, en premier lieu mais pas exclusivement vers la membrane plasmique. Le rôle démontré des PI(4,5)P₂ dans la sécrétion non conventionnelle tant du FGF2 [191] que de la protéine Tat [160] en est peut être l'exemple le plus étonnant. Nous avons pu étendre cette observation à la sécrétion d'une autre famille de protéines, les homéoprotéines, se basant sur les effets de traitements à la néomycine et de la surexpression d'un domaine d'interaction avec les PI(4,5)P₂. La comparaison des deux protéines FGF2 et EN-2 révèle des capacités d'interaction similaire avec les PI(4,5)P₂, dans le contexte d'une bicouche lipidique artificielle ou celui de membranes biologiques. Cependant les modalités de cette interaction révèlent des divergences notables, en particulier une spécificité beaucoup plus prononcée du FGF2 pour les PI(4,5)P₂ comparé aux autres phosphoinositides [par exemple les PI(4)P]. A l'échelle cellulaire, l'hydrolyse massive des PI(4,5)P₂ en PI(4)P induite par l'expression de la phosphatase OCRL affecte la sécrétion du FGF2 mais pas celle de EN-2. Bien que cela demande confirmation, ces différences pourraient refléter un rôle quasi exclusif de la tête polaire du lipide pour l'interaction avec le FGF2 et une contribution plus importante de la portion acylée (hydrophobe) du lipide à l'interaction avec EN-2. Il serait intéressant d'inclure la protéine Tat à notre étude comparative. Malgré nos efforts, nous n'avons pu obtenir de conclusions robustes quant aux rôles des différents pools intracellulaires de PI(4,5)P₂ dans le processus de sécrétion, et en particulier du pool nucléaire. Selon une des hypothèses que nous voulions tester, si le noyau constituait un environnement propice à l'interaction entre EN-2 et les PI(4,5)P₂, celle ci pouvait agir comme initiateur de l'interaction avec le compartiment membranaire, aboutissant à l'adressage de la protéine vers la membrane plasmique. En continuité avec la stratégie que nous avons développée, nous pourrions envisager de cibler des enzymes connus pour affecter spécifiquement les *pools* nucléaires de phosphoinositides.

Le rôle des PI(4,5)P₂ dans l'internalisation de EN-2 est un résultat inattendu de nos travaux si l'on considère la distribution de ce lipide restreinte au seul feuillet interne de la membrane plasmique. Il suggérerait une proximité entre mécanismes d'internalisation et de sécrétion beaucoup plus forte que celle que nous envisageons. Une partie du processus de transfert pourrait alors consister en un équilibre de la protéine de part et d'autre de la membrane plasmique, régulée notamment par les partenaires présents sur chacune des faces de la membrane.

9.2 Rôle des protéoglycanes dans le transfert intercellulaire de EN-2.

Les GAGs sont une des classes de molécules fortement représentées au niveau de la membrane plasmique et leur implication dans l'internalisation des homéoprotéines avait été observée de manière consistante dans la littérature. Si l'absence quasi-totale de ces sucres inhibe fortement l'internalisation de EN-2 (dans les cellules CHO-745) la spécificité éventuelle de leur rôle dans le processus d'internalisation, en fonction de la composition précise des chaînes de sucres, reste une question ouverte. Nous avons pu montrer un découplage entre l'étape de fixation à la membrane et l'étape même d'internalisation après surexpression de certains protéoglycanes. La spécificité d'interaction entre EN-2, et plus généralement les homéoprotéines, et différents types de protéoglycanes est une question centrale. Elle pourrait être déterminante pour l'internalisation spécifique de cette homéoprotéine dans des populations spécifiques de cellules, ou à l'inverse jouer le rôle de « barrières » extracellulaires limitant la diffusion de la protéine dans le cas de protéoglycanes présents dans la matrice extracellulaire. Notons que la protéine OTX2 s'accumule spécifiquement dans une population de cellules caractérisées par son répertoire en protéoglycanes ou que la diffusion de EN-2, et donc son activité paracrine, ne se limite qu'à quelques rangées de cellules dans le cadre de la formation de la veine transverse antérieure au niveau de l'aile de la drosophile (voir §4.3.1). Ces questions seront analysées, soit par mesure directe de l'interaction entre différents types de sucres et EN-2 *in vitro* ou en exprimant dans les cellules des protéoglycanes présentant des compositions différentes de GAGs. Un élément important de la diversité de structure des GAGs réside dans l'addition de sulfate en des endroits précis des motifs sucrés. Par exemple, l'interaction spécifique entre OTX2 et les chondroitines sulfate n'est observée que pour les formes polysulfatées de ces molécules. Le rôle de la sulfatation pourra être analysé après surexpression des enzymes responsables de ces modifications.

9.3 Interactions hydrophobes et électrostatiques, un équilibre subtil ?

A l'échelle moléculaire, la caractéristique la plus étonnante du transfert intercellulaire d'une homéoprotéine réside dans la capacité de la protéine à se mouvoir successivement dans des environnements hydrophyles et hydrophobes amenant à deux questions majeures. La première est de déterminer les paramètres favorisant l'insertion de la protéine dans l'un ou l'autre de ces deux environnements, largement incompatibles, et la deuxième qui lui est associée est de comprendre les étapes de transition capable de rendre compte de la mobilité de la protéine entre ces deux environnements. Un premier élément de réponse a été apporté grâce à une collaboration avec l'équipe de O. LEQUIN, centrée sur l'étude de la modification de la structure de l'homéodomaine de EN-2 en fonction de son environnement [274]. Comparé à un environnement aqueux, l'homéodomaine subit une modification significative de sa conformation en présence d'un environnement mimétique de la membrane. Plus précisément, le cœur hydrophobe rigidifiant la structure en solution aqueuse s'expose et devient accessible à ce

nouvel environnement, et en particulier le résidu tryptophane de la troisième hélice indispensable à l'internalisation. L'homéodomaine pourrait donc adopter des conformations différentes en fonction de son environnement, qui pourraient s'accorder avec les différentes étapes du transfert intercellulaire de la protéine. Une observation importante est que la modification de conformation n'est pas observée en présence de lipides apolaires mais requiert la présence de lipides chargés négativement, impliquant de ce fait des interactions électrostatiques dans la modification conformationnelle. Une telle étude est difficilement envisageable à l'échelle de la protéine entière mais l'analyse récente de formes mutées de la protéine EN-2 pourrait s'accorder avec cette hypothèse. EN-2 ne comporte qu'une seule cystéine, située en dehors de l'homéodomaine responsable de la dimérisation quasi-complète de la protéine recombinante purifiée analysée sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices. La mutation de cette cystéine unique (C>S) prévient comme attendu la formation de dimères, mais entraîne également une diminution drastique de l'internalisation de la protéine mutée (Fig. 28B) et même de son action paracrine. Ces effets pourraient résulter d'une altération de la conformation de la protéine, classiquement régulée par l'état d'oxydation des résidus cystéines, bien que l'on ne puisse exclure à ce stade d'autres effets, notamment sur les interactions avec des partenaires protéiques. Quelque soit le mécanisme à l'œuvre, ces derniers résultats pourraient constituer le premier exemple d'une régulation de l'action paracrine des homéoprotéines par la signalisation Red/ox.

Bien que fortement hypothétique, nous pouvons proposer un modèle où les interactions électrostatiques à proximité de l'environnement hydrophobe des membranes biologiques pourrait induire un état conformationnel instable et transitoire de la protéine, lui permettant de basculer vers l'une ou l'autre des conformations, « hydrophile » ou « hydrophobe », créant ainsi un équilibre. Selon cette hypothèse, le rôle central des PI(4,5)P₂ pourrait être lié à la nature même de la structure de cette molécule, combinant tête polaire fortement négative et chaînes acylées. La structure et la répartition des charges de la tête polaire seraient alors des composants essentiels déterminant la nature et la force de l'interaction avec l'homéoprotéine et donc la capacité à induire un état conformationnel transitoire. A la surface de la cellule, on ne peut exclure que des interactions électrostatiques avec des structures spécifiques de GAGs induiraient chez la protéine un état transitoire similaire permettant son internalisation. Une prédiction de notre modèle est que des variations, même mineures, des interactions électrostatiques pourraient avoir des conséquences importantes sur le comportement de la protéine. Très récemment nous avons initié une stratégie sûrement naïve pour aborder cette question, basée sur l'influence du pH sur les interactions électrostatiques. Le pH est en effet un paramètre central déterminant l'état de charge de toute molécule. Dans une gamme de pH n'altérant pas l'intégrité des cellules (entre 8,0 et 6,0), la charge théorique globale de la protéine EN-2 est modifiée de manière significative, passant d'une charge théorique globale de +19 à pH 6,0 à +12 à pH 8,0 (voir Fig. 27). Notons que dans cette même gamme la charge de PI(4,5)P₂ est aussi affectée. Nous avons donc testé l'influence du pH sur l'internalisation de EN-2. Comparée à la distribution hétérogène de la protéine internalisée, diffuse et ponctuée, l'acidification du milieu (pH 6,0) entraîne une forte hausse du signal diffus, alors qu'à pH 8,0 seul le signal ponctué est observé (Fig. 28A). Le pH semble donc jouer un rôle critique dans le mode d'internalisation de EN-2, suggérant la prédominance du

processus de translocation directe à pH acide et inversement, une internalisation purement endocytique à pH alcalin. Ces résultats rappellent par certains aspects la situation des toxines bactériennes présentées dans l'introduction de cette thèse, dont l'accès au cytosol est conditionné par une acidification des endosomes. Il est intéressant de noter que certaines de ces toxines (PMT, toxine B de *C. difficile*) sont capables de transloquer directement au travers de la membrane plasmique dans des conditions de pH extracellulaire acide, beaucoup plus drastique cependant que celles utilisées dans nos expériences [221, 222]. Bien que d'apparence plus éloignée, le cas des protéines Rac1 et 2 méritent d'être mentionné. Ces deux protéines régulent la polymérisation de l'actine à proximité de la membrane plasmique, nécessaire par exemple à l'initiation de la phagocytose et de la macropinocytose. Le recrutement séquentiel de ces deux protéines au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique repose sur la différence de leur charge (+8 pour Rac1 et +4 pour Rac2 à pH 7,0) et d'une redistribution des lipides [275]. En présence de phospholipides chargés négativement [PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ et phosphatidylsérine], seule la protéine Rac1 est recrutée. La redistribution de ces lipides suite à la maturation du phagosome provoque une diminution de la charge globale de la membrane qui se traduit par la délocalisation de Rac1 et le recrutement de Rac2. La perturbation locale du pH à proximité de la membrane plasmique entraîne un défaut de recrutement de Rac1 et une inhibition de la macropinocytose [276]. On peut ainsi envisager une situation similaire dans laquelle le pH du microenvironnement membranaire soit à l'origine d'une modification de charge de EN-2 qui puisse favoriser son interaction avec les phospholipides membranaires, et en particulier avec les phosphoinositides. Ensuite ces interactions électrostatiques entre la protéine et la partie polaire des phosphoinositides pourrait permettre la transition de la conformation « hydrophile » vers la conformation « hydrophobe » et ainsi l'insertion de EN-2 dans la membrane plasmique, étape indispensable à sa translocation.

pH	EN-2	EN-2HD	FGF2
6,0	19,1	8,1	12,6
6,1	18,6	8,1	12,4
6,2	18,1	8,1	12,2
6,3	17,6	8,1	12,0
6,4	17,2	8,0	11,8
6,5	16,7	8,0	11,5
6,6	16,2	8,0	11,3
6,7	15,8	8,0	11,1
6,8	15,4	8,0	10,9
6,9	15,0	7,9	10,7
7,0	14,6	7,9	10,5
7,1	14,3	7,9	10,3
7,2	14,0	7,9	10,2
7,3	13,7	7,8	10,0
7,4	13,5	7,8	9,8
7,5	13,3	7,7	9,6
7,6	13,0	7,7	9,4
7,7	12,8	7,6	9,2
7,8	12,6	7,6	9,0
7,9	12,5	7,5	8,7
8,0	12,3	7,4	8,4

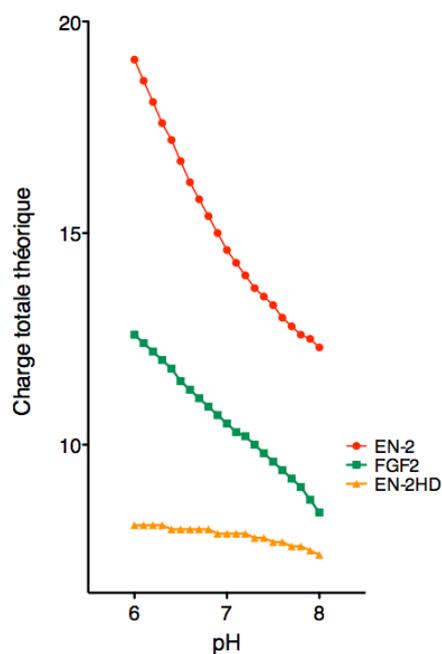


FIGURE 27 – **Influence du pH sur la charge théorique globale de EN-2.** Dans le tableau de droite sont représentées les valeurs théoriques de la charge globale des protéines EN-2 et FGF2 ainsi que de l'homéodomaine de EN-2 (EN-2HD) en fonction du pH. Les mêmes valeurs sont représentées sous formes linéaires sur le graphe de gauche.

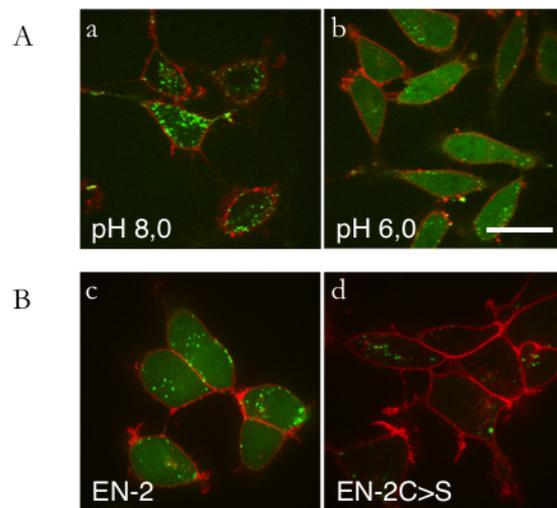


FIGURE 28 – Le pH extracellulaire modifie l’internalisation de EN-2.
(A) Visualisation en présence de bleu de trypan de l’internalisation de EN-2 couplée à la fluorescéine dans des cellules HeLa. La protéine a été incubée 1h à 37°C après que le pH du milieu ait été ajusté à pH 6,0 par l’ajout de HCl (a), ou à pH 8,0, par l’ajout de NaOH (b). (B) Comparaison de l’internalisation dans des cellules HEK293 de la protéine EN-2 sauvage (c) ou d’une version mutante où la cystéine en position 175 a été substituée par une sérine (EN-2C>S) (d). La barre d’échelle représente 20 μm.

Bibliographie

- [1] Leewenhoek, A. v. Observations, communicated to the publisher by mr. antony van leewenhoek, in a dutch letter of the 9th of octob. 1676. here english'd : concerning little animals by him observed in rain-well-sea. and snow water ; as also in water wherein pepper had lain infused. *Philosophical Transactions (1665-1678)* **12**, pp. 821–831 (1677).
- [2] Brown, R. Xxxv. on the organs and mode of fecundation in orchideæ and asclepiadeæ. *Transactions of the Linnean Society of London* **16**, 685–738 (1833).
- [3] Dutrochet, H. *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité* (J. B. Baillièrre, 1824).
- [4] Schleiden, M. J. Beiträge zur phythogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin* **13**, 137–176 (1838).
- [5] Schwann, T. *Mikroskopische Untersuchungen ueber die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiers und Pflanzen* (G. L. Reimer, 1839).
- [6] Paweletz, N. Walther Flemming : pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 72–75 (2001).
- [7] Driesch, H. *Analytische Theorie der Organischen Entwicklung.* (W. Engelmann, Leipzig, 1894).
- [8] Turing, A. M. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **237**, 37–72 (1952).
- [9] Wolpert, L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of theoretical biology* **25**, 1–47 (1969).
- [10] Gierer, A. & Meinhardt, H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30–39 (1972).
- [11] Bateson, W. *Materials for the Study of Variation, Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species* (Macmillan, 1894).
- [12] Bridges, C. B. & Morgan, T. H. *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster*, vol. 327 (Carnegie Institution of Washington, 1923).
- [13] Postlethwait, J. H. & Schneiderman, H. A. Pattern formation and determination in the antenna of the homoeotic mutant Antennapedia of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **25**, 606–640 (1971).

BIBLIOGRAPHIE

- [14] Lewis, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565–570 (1978).
- [15] Kaufman, T. C., Lewis, R. & Wakimoto, B. Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *DROSOPHILA MELANOGASTER* : The Homoeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics* **94**, 115–133 (1980).
- [16] Beeman, R. W., Stuart, J. J., Haas, M. S. & Denell, R. E. Genetic analysis of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology* **133**, 196–209 (1989).
- [17] Duboule, D. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* **134**, 2549–2560 (2007).
- [18] Banerjee-Basu, S. & Baxevanis, A. D. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic acids research* **29**, 3258–3269 (2001).
- [19] Kissinger, C. R., Liu, B. S., Martin-Blanco, E., Kornberg, T. B. & Pabo, C. O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution : a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579–590 (1990).
- [20] Bender, W. *et al.* Molecular Genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* **221**, 23–29 (1983).
- [21] Scott, M. P. *et al.* The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell* **35**, 763–776 (1983).
- [22] Garber, R. L., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **2**, 2027–2036 (1983).
- [23] Kuroiwa, A., Hafen, E. & Gehring, W. J. Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell* **37**, 825–831 (1984).
- [24] McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**, 428–433 (1984).
- [25] Carrasco, A. E., McGinnis, W., Gehring, W. J. & De Robertis, E. M. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell* **37**, 409–414 (1984).
- [26] McGinnis, W., Hart, C. P., Gehring, W. J. & Ruddle, F. H. Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* **38**, 675–680 (1984).
- [27] Hart, C. P., Awgulewitsch, A., Fainsod, A., McGinnis, W. & Ruddle, F. H. Homeo box gene complex on mouse chromosome 11 : molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeo box locus. *Cell* **43**, 9–18 (1985).
- [28] Hauser, C. A. *et al.* Expression of homologous homeo-box-containing genes in differentiated human teratocarcinoma cells and mouse embryos. *Cell* **43**, 19–28 (1985).

-
- [29] Scott, M. P. & Weiner, A. J. Structural relationships among genes that control development : sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 4115–4119 (1984).
- [30] Shepherd, J. C., McGinnis, W., Carrasco, A. E., De Robertis, E. M. & Gehring, W. J. Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* **310**, 70–71 (1984).
- [31] McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* **37**, 403–408 (1984).
- [32] Hiromi, Y. & Gehring, W. J. Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene fushi tarazu. *Cell* **50**, 963–974 (1987).
- [33] Jaynes, J. B. & O’Farrell, P. H. Activation and repression of transcription by homoeodomain-containing proteins that bind a common site. *Nature* **336**, 744–749 (1988).
- [34] Han, K., Levine, M. S. & Manley, J. L. Synergistic activation and repression of transcription by *Drosophila* homeobox proteins. *Cell* **56**, 573–583 (1989).
- [35] Krasnow, M. A., Saffman, E. E., Kornfeld, K. & Hogness, D. S. Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* **57**, 1031–1043 (1989).
- [36] Winslow, G. M., Hayashi, S., Krasnow, M., Hogness, D. S. & Scott, M. P. Transcriptional activation by the Antennapedia and fushi tarazu proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* **57**, 1017–1030 (1989).
- [37] Biggin, M. D. & Tjian, R. A purified *Drosophila* homeodomain protein represses transcription in vitro. *Cell* **58**, 433–440 (1989).
- [38] Qian, Y. Q. *et al.* The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution : comparison with prokaryotic repressors. *Cell* **59**, 573–580 (1989).
- [39] Müller, M. *et al.* Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antennapedia homeodomain. *The EMBO Journal* **7**, 4299–4304 (1988).
- [40] Wolberger, C., Vershon, A. K., Liu, B., Johnson, A. D. & Pabo, C. O. Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**, 517–528 (1991).
- [41] Gehring, W. J., Affolter, M. & Bürglin, T. Homeodomain proteins. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 487–526 (1994).
- [42] Desplan, C., Theis, J. & O’Farrell, P. H. The *Drosophila* developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* **318**, 630–635 (1985).
- [43] Hoey, T. & Levine, M. Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332**, 858–861 (1988).
- [44] Schier, A. F. & Gehring, W. J. Functional specificity of the homeodomain protein fushi tarazu : the role of DNA-binding specificity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 1450–1454 (1993).

- [45] Treisman, J., Gönczy, P., Vashishtha, M., Harris, E. & Desplan, C. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* **59**, 553–562 (1989).
- [46] Mann, R. S. & Affolter, M. Hox proteins meet more partners. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 423–429 (1998).
- [47] Solano, P. J. *et al.* Genome-wide identification of in vivo Drosophila Engrailed-binding DNA fragments and related target genes. *Development* **130**, 1243–1254 (2003).
- [48] Zagozewski, J. L., Zhang, Q., Pinto, V. I., Wigle, J. T. & Eisenstat, D. D. The role of homeobox genes in retinal development and disease. *Developmental Biology* **393**, 195–208 (2014).
- [49] Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 1864–1868 (1991).
- [50] Le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A. & Volovitch, M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 9120–9124 (1993).
- [51] Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 10444–10450 (1994).
- [52] Derossi, D. *et al.* Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18188–18193 (1996).
- [53] Thorén, P. E., Persson, D., Karlsson, M. & Nordén, B. The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Letters* **482**, 265–268 (2000).
- [54] Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A. H., Perez, F. & Prochiantz, A. Transcription factor *hoxa-5* is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mechanisms of development* **55**, 111–117 (1996).
- [55] Joliot, A. *et al.* Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Current Biology* **8**, 856–863 (1998).
- [56] Prochiantz, A. & Joliot, A. Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 814–819 (2003).
- [57] Berlose, J. P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A. & Chassaing, G. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *European journal of biochemistry / FEBS* **242**, 372–386 (1996).
- [58] Maniti, O., Blanchard, E., Trugnan, G., Lamazière, A. & Ayala-Sanmartin, J. Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 869–875 (2012).
- [59] Kornberg, T. Engrailed : a gene controlling compartment and segment formation in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 1095–1099 (1981).

- [60] Poole, S. J. & Kornberg, T. B. Modifying expression of the engrailed gene of *Drosophila melanogaster*. *Development* **104 Suppl**, 85–93 (1988).
- [61] Hidalgo, A. The roles of engrailed. *Trends in genetics : TIG* **12**, 1–4 (1996).
- [62] Davis, C. A., Holmyard, D. P., Millen, K. J. & Joyner, A. L. Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. *Development* **111**, 287–298 (1991).
- [63] Bally-Cuif, L. & Wassef, M. Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**, 450–458 (1995).
- [64] Araki, I. & Nakamura, H. Engrailed defines the position of dorsal diencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* **126**, 5127–5135 (1999).
- [65] Logan, C. *et al.* Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic engrailed expression. *Current Biology* **6**, 1006–1014 (1996).
- [66] Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D. & O’Leary, D. D. Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3126–3134 (2001).
- [67] Jaynes, J. B. & O’Farrell, P. H. Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *The EMBO Journal* **10**, 1427–1433 (1991).
- [68] Tolkunova, E. N., Fujioka, M., Kobayashi, M., Deka, D. & Jaynes, J. B. Two distinct types of repression domain in engrailed : one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Molecular and cellular biology* **18**, 2804–2814 (1998).
- [69] Gemel, J., Jacobsen, C. & MacArthur, C. A. Fibroblast growth factor-8 expression is regulated by intronic engrailed and Pbx1-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6020–6026 (1999).
- [70] van Dijk, M. A. & Murre, C. extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell* **78**, 617–624 (1994).
- [71] van Dijk, M. A., Peltenburg, L. T. & Murre, C. Hox gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2. *Mechanisms of development* **52**, 99–108 (1995).
- [72] Peltenburg, L. T. & Murre, C. Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and Engrailed proteins. *Development* **124**, 1089–1098 (1997).
- [73] Serrano, N. & Maschat, F. Molecular mechanism of polyhomeotic activation by Engrailed. *The EMBO Journal* **17**, 3704–3713 (1998).
- [74] Peltenburg, L. T. & Murre, C. Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *The EMBO Journal* **15**, 3385–3393 (1996).
- [75] Serrano, N., Brock, H. W. & Maschat, F. beta3-tubulin is directly repressed by the engrailed protein in *Drosophila*. *Development* **124**, 2527–2536 (1997).

- [76] Montesinos, M. L. *et al.* The neuronal microtubule-associated protein 1B is under homeoprotein transcriptional control. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3350–3359 (2001).
- [77] Mainguy, G. *et al.* Regulation of epidermal bullous pemphigoid antigen 1 (BPAG1) synthesis by homeoprotein transcription factors. *The Journal of investigative dermatology* **113**, 643–650 (1999).
- [78] Serrano, N. *et al.* polyhomeotic appears to be a target of engrailed regulation in *Drosophila*. *Development* **121**, 1691–1703 (1995).
- [79] Morgan, R. Engrailed : complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Letters* **580**, 2531–2533 (2006).
- [80] Joliot, A. *et al.* Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* **124**, 1865–1875 (1997).
- [81] Dupont, E., Prochiantz, A. & Joliot, A. Identification of a signal peptide for unconventional secretion. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8994–9000 (2007).
- [82] Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A. & Joliot, A. A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* **126**, 3183–3190 (1999).
- [83] Tassetto, M., Maizel, A., Osorio, J. & Joliot, A. Plant and animal homeodomains use convergent mechanisms for intercellular transfer. *EMBO reports* **6**, 885–890 (2005).
- [84] Lucas, W. J. *et al.* Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980–1983 (1995).
- [85] Kim, J. Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z. & Jackson, D. Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4103–4108 (2002).
- [86] Maizel, A. *et al.* Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* **129**, 3545–3553 (2002).
- [87] Sugiyama, S. *et al.* Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* **134**, 508–520 (2008).
- [88] Beurdeley, M. *et al.* Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 9429–9437 (2012).
- [89] Spatazza, J. *et al.* Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell reports* **3**, 1815–1823 (2013).
- [90] Lesaffre, B., Joliot, A., Prochiantz, A. & Volovitch, M. Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural development* **2**, 2 (2007).
- [91] Di Lullo, E. *et al.* Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development* **138**, 4991–5001 (2011).
- [92] Kim, N. *et al.* Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *eLife* **3**, e02671 (2014).

- [93] Bardine, N. *et al.* Vertical signalling involves transmission of Hox information from gastrula mesoderm to neurectoderm. *PloS one* **9**, e115208 (2014).
- [94] Rapoport, T. A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**, 663–669 (2007).
- [95] Braakman, I. & Bulleid, N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry* **80**, 71–99 (2011).
- [96] Szul, T. & Sztul, E. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda, Md.)* **26**, 348–364 (2011).
- [97] Guo, Y., Sirkis, D. W. & Schekman, R. Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annual review of cell and developmental biology* **30**, 169–206 (2014).
- [98] Jena, B. P. Porosome : the secretory portal in cells. *Biochemistry* **48**, 4009–4018 (2009).
- [99] Südhof, T. C. & Rothman, J. E. Membrane fusion : grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474–477 (2009).
- [100] Lodish, A., Berk, A., Zipursky, S. & et al. *Molecular Cell Biology. 4th edition.*, chap. Section 17.3, Overview of the Secretory Pathway. (W. H. Freeman, New York, 2000).
- [101] Hong, W. & Lev, S. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in Cell Biology* **24**, 35–43 (2014).
- [102] Rabouille, C., Malhotra, V. & Nickel, W. Diversity in unconventional protein secretion. *Journal of Cell Science* **125**, 5251–5255 (2012).
- [103] Grieve, A. G. & Rabouille, C. Golgi bypass : skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3** (2011).
- [104] Yoo, J.-S. *et al.* Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11401–11409 (2002).
- [105] Marie, M., Dale, H. A., Sannerud, R. & Saraste, J. The function of the intermediate compartment in pre-Golgi trafficking involves its stable connection with the centrosome. *Molecular biology of the cell* **20**, 4458–4470 (2009).
- [106] Baldwin, T. A. & Ostergaard, H. L. The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via golgi-dependent and -independent pathways. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 50333–50340 (2002).
- [107] Martin, P. E., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R. J. & Evans, W. H. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of Cell Science* **114**, 3845–3855 (2001).
- [108] Qu, C., Gardner, P. & Schrijver, I. The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. *Experimental cell research* **315**, 1683–1692 (2009).
- [109] Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J. & Warren, G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**, 253–262 (1997).

- [110] Schotman, H., Karhinen, L. & Rabouille, C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Developmental cell* **14**, 171–182 (2008).
- [111] Schotman, H., Karhinen, L. & Rabouille, C. Integrins mediate their unconventional, mechanical-stress-induced secretion via RhoA and PINCH in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* **122**, 2662–2672 (2009).
- [112] Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445–452 (2009).
- [113] Simons, M. & Raposo, G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 575–581 (2009).
- [114] Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* **30**, 255–289 (2014).
- [115] Cocucci, E. & Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes : shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* **25**, 364–372 (2015).
- [116] Barrès, C. *et al.* Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* **115**, 696–705 (2010).
- [117] Zhan, R. *et al.* Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes. *Biochemical and biophysical research communications* **387**, 229–233 (2009).
- [118] McCready, J., Sims, J. D., Chan, D. & Jay, D. G. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility : a role for plasminogen activation. *BMC cancer* **10**, 294 (2010).
- [119] Gangalum, R. K., Atanasov, I. C., Zhou, Z. H. & Bhat, S. P. AlphaB-crystallin is found in detergent-resistant membrane microdomains and is secreted via exosomes from human retinal pigment epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **286**, 3261–3269 (2011).
- [120] Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. & Keski-Oja, J. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *Journal of cellular biochemistry* **105**, 1211–1218 (2008).
- [121] Mullen, L., Hanschmann, E.-M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A. & Ghezzi, P. Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **21**, 98–108 (2015).
- [122] Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**, 654–659 (2007).
- [123] Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* **11**, 1143–1149 (2009).
- [124] Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. Shedding microvesicles : artefacts no more. *Trends in Cell Biology* **19**, 43–51 (2009).

-
- [125] Dujardin, S. *et al.* Ectosomes : A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PloS one* **9**, e100760–10 (2014).
- [126] Mehul, B. & Hughes, R. C. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *Journal of Cell Science* **110** (Pt 10), 1169–1178 (1997).
- [127] Menon, R. P. & Hughes, R. C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *European journal of biochemistry / FEBS* **264**, 569–576 (1999).
- [128] Hughes, R. C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1473**, 172–185 (1999).
- [129] Kinseth, M. A. *et al.* The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell* **130**, 524–534 (2007).
- [130] Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. & Malhotra, V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of Cell Biology* **188**, 527–536 (2010).
- [131] Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W. F. & Subramani, S. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology* **188**, 537–546 (2010).
- [132] Bruns, C., McCaffery, J. M., Curwin, A. J., Duran, J. M. & Malhotra, V. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *The Journal of Cell Biology* **195**, 979–992 (2011).
- [133] Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* **182**, 685–701 (2008).
- [134] Matsunaga, K. *et al.* Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology* **190**, 511–521 (2010).
- [135] Cerretti, D. P. *et al.* Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**, 97–100 (1992).
- [136] Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768–774 (1992).
- [137] Andrei, C. *et al.* The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Molecular biology of the cell* **10**, 1463–1475 (1999).
- [138] MacKenzie, A. *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825–835 (2001).
- [139] Brough, D. & Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of Cell Science* **120**, 772–781 (2007).

- [140] Liu, T. *et al.* Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. *Cell reports* **8**, 974–982 (2014).
- [141] Singer, I. I. *et al.* The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1447–1459 (1995).
- [142] Hamon, Y. *et al.* Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood* **90**, 2911–2915 (1997).
- [143] Zhou, X. *et al.* The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **291**, 598–604 (2002).
- [144] Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 1913–1925 (2007).
- [145] Piccioli, P. & Rubartelli, A. The secretion of IL-1 β and options for release. *Seminars in immunology* **25**, 425–429 (2013).
- [146] Monteleone, M., Stow, J. L. & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* **74**, 213–218 (2015).
- [147] Harris, J. *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 9587–9597 (2011).
- [148] Nakahira, K. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* **12**, 222–230 (2011).
- [149] Dupont, N. *et al.* Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO Journal* **30**, 4701–4711 (2011).
- [150] Wang, L.-J. *et al.* The microtubule-associated protein EB1 links AIM2 inflammasomes with autophagy-dependent secretion. *The Journal of biological chemistry* **289**, 29322–29333 (2014).
- [151] Zemskov, E. A., Mikhailenko, I., Hsia, R.-C., Zaritskaya, L. & Belkin, A. M. Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipid-dependent delivery into recycling endosomes. *PloS one* **6**, e19414 (2011).
- [152] Santhanam, L., Berkowitz, D. E. & Belkin, A. M. Nitric oxide regulates non-classical secretion of tissue transglutaminase. *Communicative & integrative biology* **4**, 584–586 (2011).
- [153] Degryse, B. *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology* **152**, 1197–1206 (2001).
- [154] Gardella, S. *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* **3**, 995–1001 (2002).
- [155] Keller, M., Rüegg, A., Werner, S. & Beer, H.-D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831 (2008).

-
- [156] Lamkanfi, M. *et al.* Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 4385–4392 (2010).
- [157] Willingham, S. B. *et al.* NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 2008–2015 (2009).
- [158] Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* **345**, 84–86 (1990).
- [159] Rayne, F., Debaisieux, S., Bonhoure, A. & Beaumelle, B. HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane. *Cell biology international* **34**, 409–413 (2010).
- [160] Rayne, F. *et al.* Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *The EMBO Journal* **29**, 1348–1362 (2010).
- [161] Jackson, A. *et al.* Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 10691–10695 (1992).
- [162] Jackson, A., Tarantini, F., Gamble, S., Friedman, S. & Maciag, T. The release of fibroblast growth factor-1 from NIH 3T3 cells in response to temperature involves the function of cysteine residues. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 33–36 (1995).
- [163] Mouta Carreira, C., Landriscina, M., Bellum, S., Prudovsky, I. & Maciag, T. The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **18**, 277–285 (2001).
- [164] Duarte, M. *et al.* Thrombin induces rapid PAR1-mediated non-classical FGF1 release. *Biochemical and biophysical research communications* **350**, 604–609 (2006).
- [165] Duarte, M. *et al.* Novel cross-talk between three cardiovascular regulators : thrombin cleavage fragment of Jagged1 induces fibroblast growth factor 1 expression and release. *Molecular biology of the cell* **19**, 4863–4874 (2008).
- [166] Landriscina, M. *et al.* S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 22544–22552 (2001).
- [167] LaVallee, T. M. *et al.* Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 22217–22223 (1998).
- [168] Soldi, R. *et al.* Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway. *Experimental cell research* **313**, 3308–3318 (2007).
- [169] Landriscina, M. *et al.* Copper induces the assembly of a multiprotein aggregate implicated in the release of fibroblast growth factor 1 in response to stress. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 25549–25557 (2001).
- [170] Tarantini, F., Gamble, S., Jackson, A. & Maciag, T. The cysteine residue responsible for the release of fibroblast growth factor-1 residues in a domain independent of the domain for phosphatidylserine binding. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29039–29042 (1995).

- [171] Engleka, K. A. & Maciag, T. Inactivation of human fibroblast growth factor-1 (fgf-1) activity by interaction with copper ions involves fgf-1 dimer formation induced by copper-catalyzed oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 11307–11315 (1992).
- [172] Sivaraja, V. *et al.* Copper binding affinity of S100A13, a key component of the FGF-1 nonclassical copper-dependent release complex. *Biophysical journal* **91**, 1832–1843 (2006).
- [173] Graziani, I. *et al.* Release of FGF1 and p40 synaptotagmin 1 correlates with their membrane destabilizing ability. *Biochemical and biophysical research communications* **349**, 192–199 (2006).
- [174] Devaux, P. F. & Morris, R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* **5**, 241–246 (2004).
- [175] Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W. & Zwaal, R. F. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1439**, 317–330 (1999).
- [176] Mohan, S. K., Rani, S. G. & Yu, C. The heterohexameric complex structure, a component in the non-classical pathway for fibroblast growth factor 1 (FGF1) secretion. *The Journal of biological chemistry* **285**, 15464–15475 (2010).
- [177] Rajalingam, D., Graziani, I., Prudovsky, I., Yu, C. & Kumar, T. K. S. Relevance of partially structured states in the non-classical secretion of acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry* **46**, 9225–9238 (2007).
- [178] Prudovsky, I. *et al.* Secretion without Golgi. *Journal of cellular biochemistry* **103**, 1327–1343 (2008).
- [179] Prudovsky, I., Kumar, T. K. S., Sterling, S. & Neivandt, D. Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion : problem and methods of study. *International journal of molecular sciences* **14**, 3734–3772 (2013).
- [180] Liu, Y., Myrvang, H. K. & Dekker, L. V. Annexin A2 complexes with S100 proteins : structure, function and pharmacological manipulation. *British journal of pharmacology* **172**, 1664–1676 (2015).
- [181] Donato, R. Intracellular and extracellular roles of s100 proteins. *Microscopy Research and Technique* **60**, 540–551 (2003).
- [182] McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E. & D'Amore, P. A. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *The Journal of Cell Biology* **109**, 811–822 (1989).
- [183] Muthukrishnan, L., Warder, E. & McNeil, P. L. Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* **148**, 1–16 (1991).
- [184] Mignatti, P. & Rifkin, D. B. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence : a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism ? *Journal of cellular biochemistry* **47**, 201–207 (1991).
- [185] Prats, H. *et al.* High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 1836–1840 (1989).

-
- [186] Florkiewicz, R. Z., Majack, R. A., Buechler, R. D. & Florkiewicz, E. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *Journal of Cellular Physiology* **162**, 388–399 (1995).
- [187] Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. & Rifkin, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews* **18**, 26–45 (1997).
- [188] Trudel, C., Faure-Desire, V., Florkiewicz, R. Z. & Baird, A. Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *Journal of Cellular Physiology* **185**, 260–268 (2000).
- [189] Schäfer, T. *et al.* Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 6244–6251 (2004).
- [190] Zehe, C., Engling, A., Wegehingel, S., Schäfer, T. & Nickel, W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15479–15484 (2006).
- [191] Temmerman, K. *et al.* A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic* **9**, 1204–1217 (2008).
- [192] Backhaus, R. *et al.* Unconventional protein secretion : membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *Journal of Cell Science* **117**, 1727–1736 (2004).
- [193] Torrado, L. C. *et al.* An intrinsic quality-control mechanism ensures unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 in a folded conformation. *Journal of Cell Science* **122**, 3322–3329 (2009).
- [194] Steringer, J. P., Müller, H.-M. & Nickel, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2—a novel type of protein translocation across membranes? *Journal of molecular biology* **427**, 1202–1210 (2015).
- [195] Zacherl, S. *et al.* A Direct Role for ATP1A1 in Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2. *The Journal of biological chemistry* **290**, 3654–3665 (2015).
- [196] Ebert, A. D. *et al.* Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic* **11**, 813–826 (2010).
- [197] Müller, H.-M. *et al.* Formation of Disulfide Bridges Drives Oligomerization, Membrane Pore Formation and Translocation of Fibroblast Growth Factor 2 to Cell Surfaces. *The Journal of biological chemistry* (2015).
- [198] Zeitler, M., Steringer, J. P., Müller, H.-M., Mayer, M. P. & Nickel, W. HIV-Tat Forms Phosphoinositide Dependent Membrane Pores Implicated in Unconventional Protein Secretion. *The Journal of biological chemistry* (2015).
- [199] Kandaswamy, K. K. *et al.* SPRED : A machine learning approach for the identification of classical and non-classical secretory proteins in mammalian genomes. *Biochemical and biophysical research communications* **391**, 1306–1311 (2010).

- [200] Amzallag, N. *et al.* TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 46104–46112 (2004).
- [201] Cordell, P. A. *et al.* Association of coagulation factor XIII-A with Golgi proteins within monocyte-macrophages : implications for subcellular trafficking and secretion. *Blood* **115**, 2674–2681 (2010).
- [202] Tanaka, M. *et al.* Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **359**, 194–201 (2007).
- [203] Jang, A. *et al.* Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *Journal of neurochemistry* **113**, 1263–1274 (2010).
- [204] Merk, M. *et al.* The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 6896–6906 (2009).
- [205] Caberoy, N. B. & Li, W. Unconventional secretion of tubby and tubby-like protein 1. *FEBS Letters* **583**, 3057–3062 (2009).
- [206] Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 857–902 (2009).
- [207] Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology* **3**, 473–483 (2001).
- [208] Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A. & Oppenheim, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of virology* **76**, 5156–5166 (2002).
- [209] Ewers, H. *et al.* GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nature cell biology* **12**, 11–8– sup pp 1–12 (2010).
- [210] Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 603–612 (2007).
- [211] Shvets, E., Ludwig, A. & Nichols, B. J. News from the caves : update on the structure and function of caveolae. *Current Opinion in Cell Biology* **29**, 99–106 (2014).
- [212] Meister, M. & Tikkanen, R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo : a flotillin point of view. *Membranes* **4**, 356–371 (2014).
- [213] Hansen, C. G. & Nichols, B. J. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science* **122**, 1713–1721 (2009).
- [214] Kerr, M. C. & Teasdale, R. D. Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364–371 (2009).
- [215] Flannagan, R. S., Jaumouillé, V. & Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* **7**, 61–98 (2012).
- [216] González, J. E. & Wisnieski, B. J. An endosomal model for acid triggering of diphtheria toxin translocation. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 15257–15259 (1988).

-
- [217] Feld, G. K., Brown, M. J. & Krantz, B. A. Ratcheting up protein translocation with anthrax toxin. *Protein science : a publication of the Protein Society* **21**, 606–624 (2012).
- [218] Koriazova, L. K. & Montal, M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nature structural biology* **10**, 13–18 (2003).
- [219] Pei, S., Doye, A. & Boquet, P. Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Molecular microbiology* **41**, 1237–1247 (2001).
- [220] Blöcker, D. *et al.* Clostridium botulinum C2 toxin : low pH-induced pore formation is required for translocation of the enzyme component C2I into the cytosol of host cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 37360–37367 (2003).
- [221] Pfeifer, G. *et al.* Cellular uptake of Clostridium difficile toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 44535–44541 (2003).
- [222] Baldwin, M. R., Lakey, J. H. & Lax, A. J. Identification and characterization of the Pasteurella multocida toxin translocation domain. *Molecular microbiology* **54**, 239–250 (2004).
- [223] Méré, J., Morlon-Guyot, J., Bonhoure, A., Chiche, L. & Beaumelle, B. Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 21194–21201 (2005).
- [224] Vendeville, A. *et al.* HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Molecular biology of the cell* **15**, 2347–2360 (2004).
- [225] Yezid, H., Konate, K., Debaisieux, S., Bonhoure, A. & Beaumelle, B. Mechanism for HIV-1 Tat insertion into the endosome membrane. *The Journal of biological chemistry* **284**, 22736–22746 (2009).
- [226] Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. & Giacca, M. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 3254–3261 (2001).
- [227] Mallard, F. *et al.* Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *The Journal of Cell Biology* **143**, 973–990 (1998).
- [228] Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L. & Sandvig, K. Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *Journal of Cell Science* **117**, 2321–2331 (2004).
- [229] Bujny, M. V., Popoff, V., Johannes, L. & Cullen, P. J. The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *Journal of Cell Science* **120**, 2010–2021 (2007).
- [230] Utskarpen, A., Slagsvold, H. H., Dyve, A. B., Skånland, S. S. & Sandvig, K. SNX1 and SNX2 mediate retrograde transport of Shiga toxin. *Biochemical and biophysical research communications* **358**, 566–570 (2007).

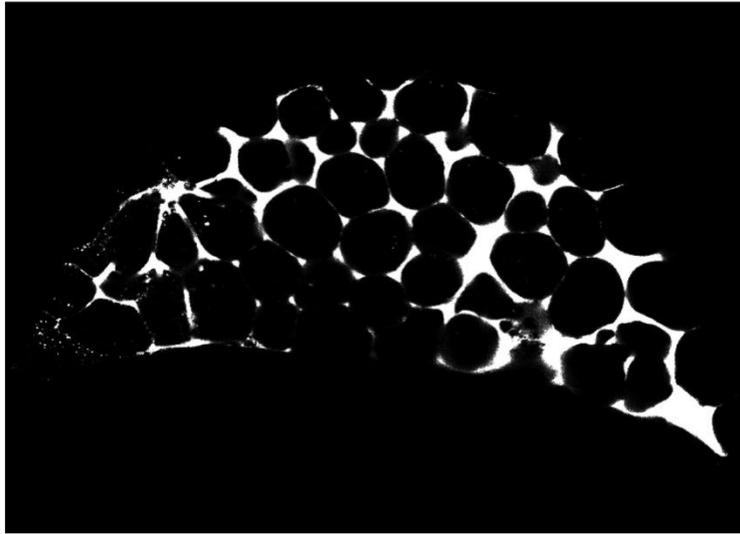
- [231] Girod, A. *et al.* Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nature cell biology* **1**, 423–430 (1999).
- [232] McKenzie, J., Johannes, L., Taguchi, T. & Sheff, D. Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *The FEBS journal* **276**, 1581–1595 (2009).
- [233] Garred, O., van Deurs, B. & Sandvig, K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 10817–10821 (1995).
- [234] Kurmanova, A. *et al.* Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 144–149 (2007).
- [235] Yu, M. & Haslam, D. B. Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infection and immunity* **73**, 2524–2532 (2005).
- [236] Falguières, T. & Johannes, L. Shiga toxin B-subunit binds to the chaperone BiP and the nucleolar protein B23. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **98**, 125–134 (2006).
- [237] Brunet, I. *et al.* The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* **438**, 94–98 (2005).
- [238] Wizenmann, A. *et al.* Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* **64**, 355–366 (2009).
- [239] Stettler, O. *et al.* Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development* **139**, 215–224 (2012).
- [240] Layalle, S. *et al.* Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development* **138**, 2315–2323 (2011).
- [241] Zhou, J. *et al.* Nkx3.1 functions as para-transcription factor to regulate gene expression and cell proliferation in non-cell autonomous manner. *The Journal of biological chemistry* **287**, 17248–17256 (2012).
- [242] McGrath, S. E., Michael, A., Morgan, R. & Pandha, H. EN2 : a novel prostate cancer biomarker. *Biomarkers in medicine* **7**, 893–901 (2013).
- [243] Morgan, R. *et al.* Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **49**, 2214–2222 (2013).
- [244] Hammond, G. R. V., Schiavo, G. & Irvine, R. F. Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P(2). *Biochemical Journal* **422**, 23–35 (2009).
- [245] Engling, A. *et al.* Biosynthetic FGF-2 is targeted to non-lipid raft microdomains following translocation to the extracellular surface of CHO cells. *Journal of Cell Science* **115**, 3619–3631 (2002).
- [246] Schacht, J. Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. *Journal of neurochemistry* **27**, 1119–1124 (1976).
- [247] Arbuzova, A. *et al.* Fluorescently labeled neomycin as a probe of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1464**, 35–48 (2000).

- [248] Schink, K. O., Raiborg, C. & Stenmark, H. Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **35**, 900–912 (2013).
- [249] D’Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A. & De Matteis, M. A. The multiple roles of PtdIns(4)P – not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *Journal of Cell Science* **121**, 1955–1963 (2008).
- [250] Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F. & Payrastre, B. Phosphatidylinositol 5-phosphate : a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **36**, 260–272 (2014).
- [251] Li, H. & Marshall, A. J. Phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate-specific phosphatases and effector proteins : A distinct branch of PI3K signaling. *Cellular signalling* **27**, 1789–1798 (2015).
- [252] McCartney, A. J., Zhang, Y. & Weisman, L. S. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate : low abundance, high significance. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **36**, 52–64 (2014).
- [253] Sun, Y., Thapa, N., Hedman, A. C. & Anderson, R. A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate : targeted production and signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **35**, 513–522 (2013).
- [254] Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* **7**, 606–619 (2006).
- [255] Shah, Z. H. *et al.* Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *The FEBS journal* **280**, 6295–6310 (2013).
- [256] Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. & Takenawa, T. alpha-Actinin and vinculin are PIP₂-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1518–1522 (1994).
- [257] Sala-Vila, A., Castellote, A. I., Rodriguez-Palmero, M., Campoy, C. & López-Sabater, M. C. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain) : changes during lactation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **21**, 467–473 (2005).
- [258] Schimpf, K., Thompson, L. & Baugh, S. Determination of Myo-Inositol (Free and Bound as Phosphatidylinositol) in Infant Formula and Adult Nutritionals by Liquid Chromatography/Pulsed Amperometry with Column Switching : First Action 2011.18. *Journal of AOAC International* **95**, 937–942 (2012).
- [259] Mehta, Z. B., Pietka, G. & Lowe, M. The cellular and physiological functions of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic* **15**, 471–487 (2014).
- [260] Aikawa, Y. & Martin, T. F. J. ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *The Journal of Cell Biology* **162**, 647–659 (2003).
- [261] Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *The Journal of Cell Biology* **196**, 483–496 (2012).

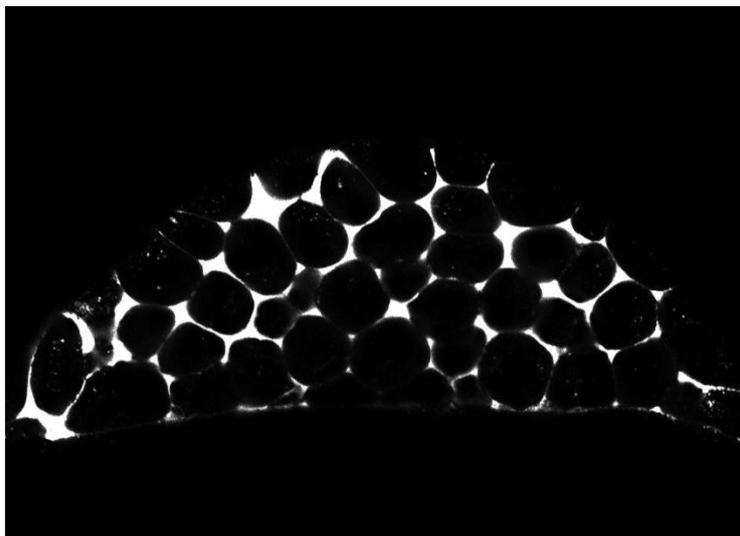
- [262] D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. ARF proteins : roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 347–358 (2006).
- [263] Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. & Donaldson, J. G. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of Cell Biology* **154**, 1007–1017 (2001).
- [264] Mortier, E. *et al.* Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions. *The EMBO Journal* **24**, 2556–2565 (2005).
- [265] Klopfenstein, D. R., Tomishige, M., Stuurman, N. & Vale, R. D. Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* **109**, 347–358 (2002).
- [266] Osborne, S. L., Thomas, C. L., Gschmeissner, S. & Schiavo, G. Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *Journal of Cell Science* **114**, 2501–2511 (2001).
- [267] Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037 (2007).
- [268] Couchman, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annual review of cell and developmental biology* **26**, 89–114 (2010).
- [269] Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function : A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **42**, 11–55 (2015).
- [270] Gama, C. I. & Hsieh-Wilson, L. C. Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code. *Current opinion in chemical biology* **9**, 609–619 (2005).
- [271] Esko, J. D., Stewart, T. E. & Taylor, W. H. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 3197–3201 (1985).
- [272] Couchman, J. R. Syndecans : proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 926–937 (2003).
- [273] Manon-Jensen, T., Itoh, Y. & Couchman, J. R. Proteoglycans in health and disease : the multiple roles of syndecan shedding. *The FEBS journal* **277**, 3876–3889 (2010).
- [274] Carlier, L. *et al.* Investigation of homeodomain membrane translocation properties : insights from the structure determination of engrailed-2 homeodomain in aqueous and membrane-mimetic environments. *Biophysical journal* **105**, 667–678 (2013).
- [275] Magalhaes, M. A. O. & Glogauer, M. Pivotal Advance : Phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active Rac1 and Rac2. *Journal of leukocyte biology* **87**, 545–555 (2010).
- [276] Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering sub-membranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of Cell Biology* **188**, 547–563 (2010).

Annexes

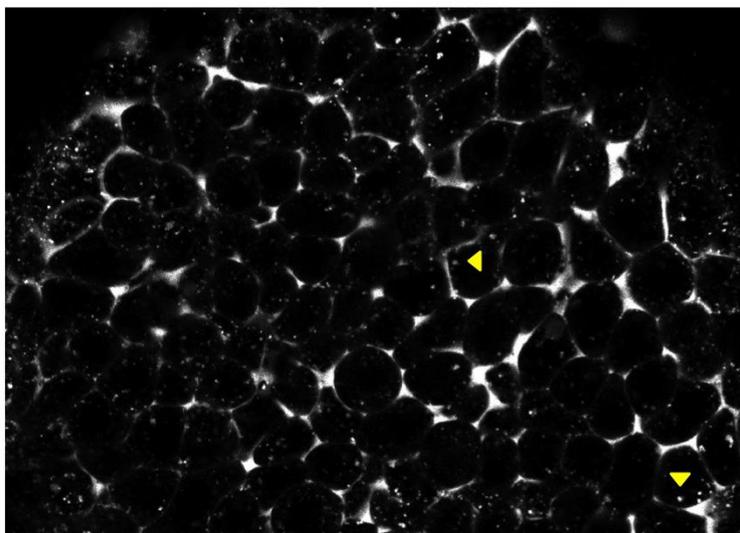
Figures supplémentaires de l'article n° 1.



30 min post injection



60 min post injection



90 % epiboly

Figure S1: Intercellular distribution of 4G11 anti-Engrailed antibody injected at blastula stage. Embryos were injected with FITC-labeled 4G11 antibody at blastula stage. Images were taken on living embryos, at 30 and 60 minutes post injection, and at 90% epiboly. The antibody is detected in the intercellular space and is not taken-up by cells, except for residual non-specific endocytosis (arrowheads). In no occasion 4G11 antibodies were detected in the nuclei.

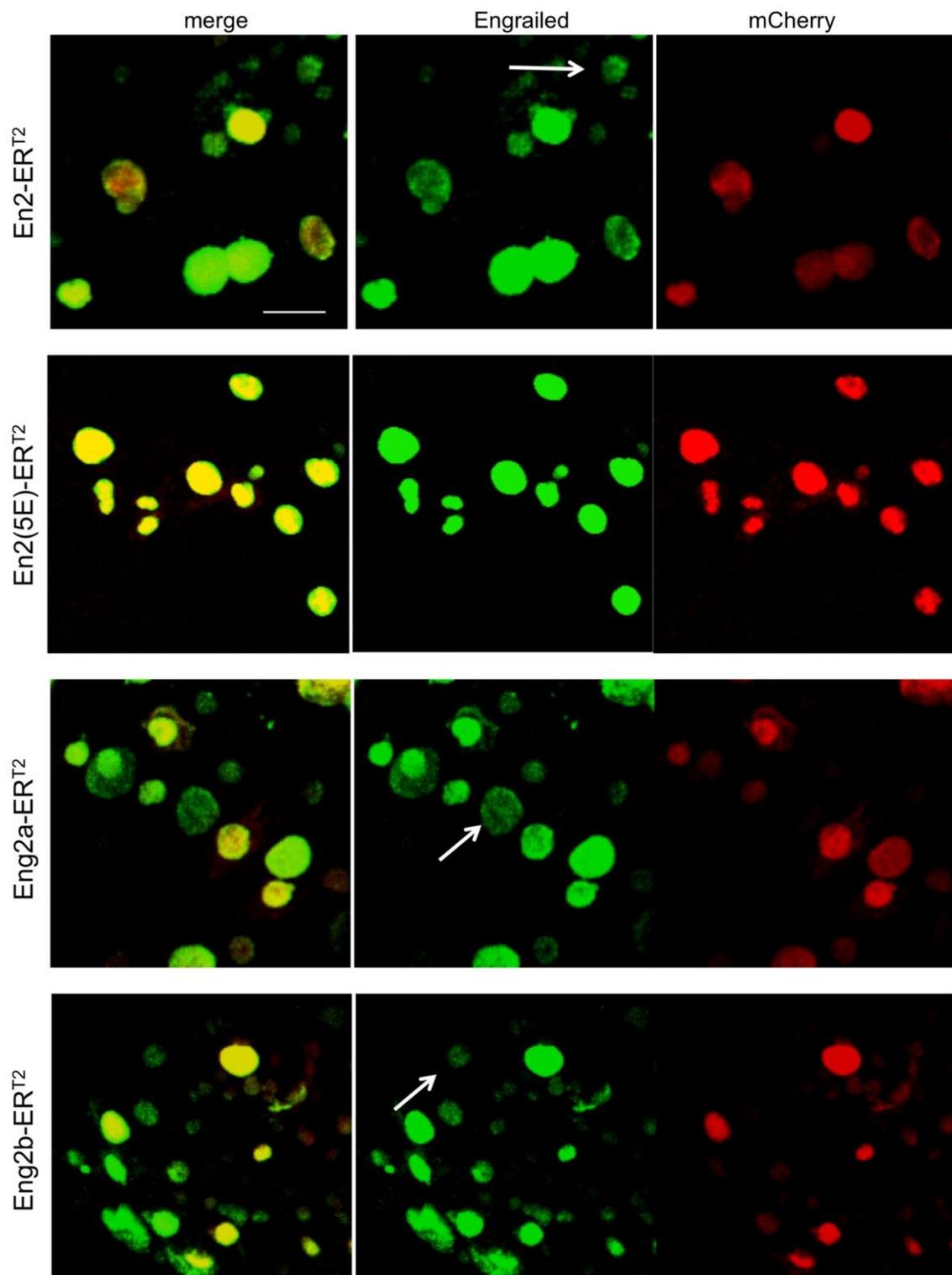


Figure S2: Intercellular transfer of En2, En25E, Eng2a and En2b in zebrafish embryos at 90% epiboly. En2-ERT²-P2A-mCherry plasmid was injected at one cell stage (10 ng/ml). Embryos were fixed at 90% epiboly, and immunostained for En2ERT² (Green) and mCherry (Red). Cells that do not contain the plasmid and in which Engrailed-ERT² protein has been imported appear in green (white arrow). Scale bar: 20 μ m.

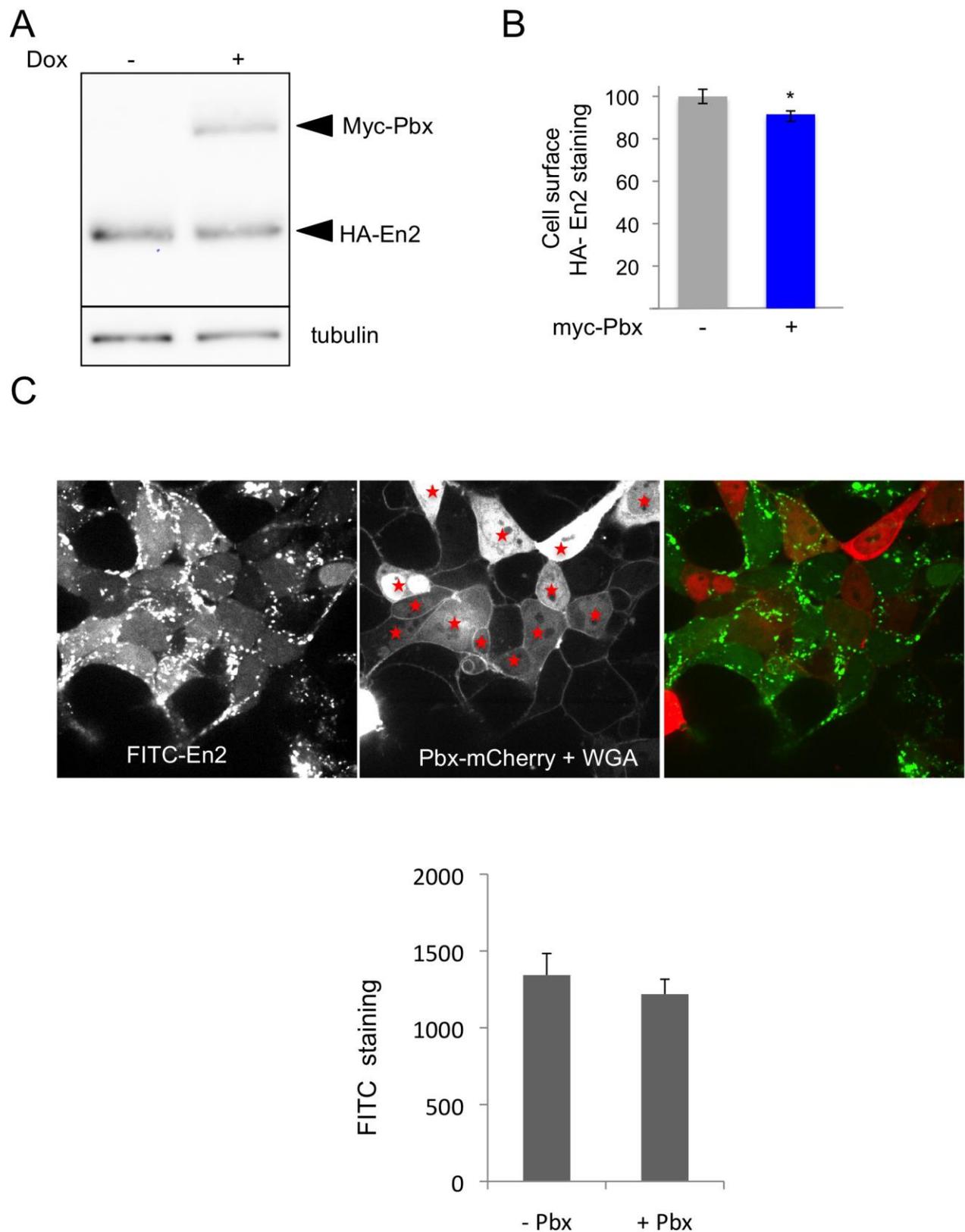


Figure S3: Sensitivity of En2 intercellular transfer to Pbx overexpression. Pbx1a overexpression does not affect En2 expression (**A**) and only marginally reduced En2 secretion (**B**) in HEK293 cells. $*P < 0.005$. (**C**) Internalization of FITC-labelled En2 in a co-culture of cells expressing Pbx1a-Cherry (red star) or not. En2 internalization quantified in each cell population is not altered by Pbx overexpression. Cherry and WGA signal are detected in the same channel.

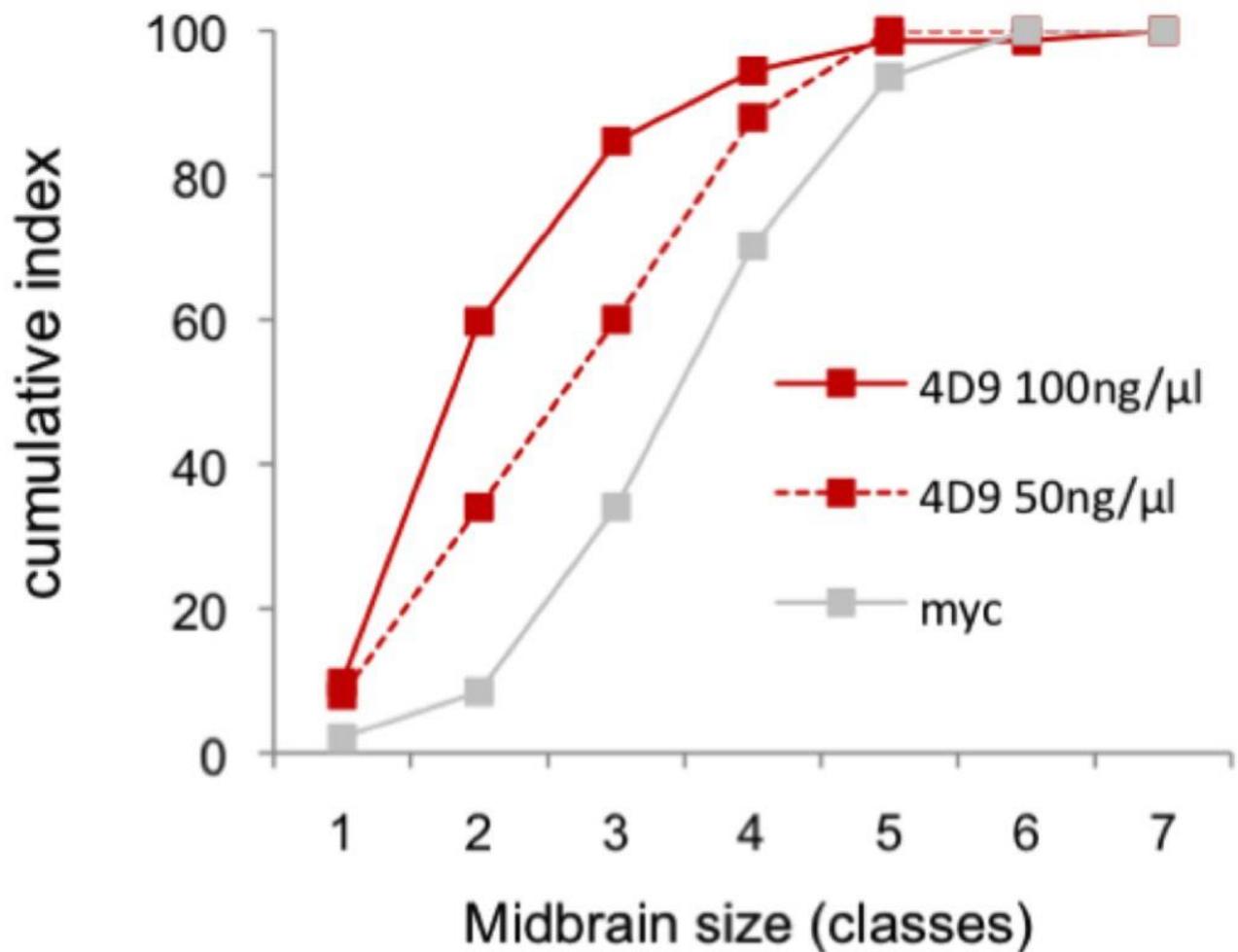


Figure S4: Dose response phenotype for 4D9 injection. Zebrafish embryos were injected intercellularly at blastula stage with anti-myc or anti-En (4D9 at 50 or 100ng/μl) antibody. Mesencephalon length of injected embryos is presented as cumulative frequency plot.

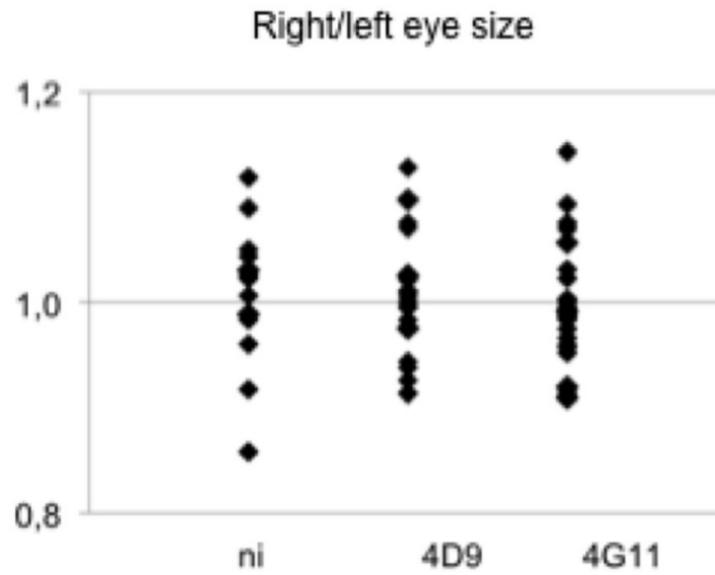


Figure S5: Absence of effect of 4D9 and 4G11 injection on eye size. Zebrafish embryos were injected intercellularly at blastula stage with anti-myc or anti-En (4G11 or 4D9) antibody (100ng/ μ l). Size ratios right/left eyes were measured on flat-mount embryos at 24 hpf after *pax6* ISH.

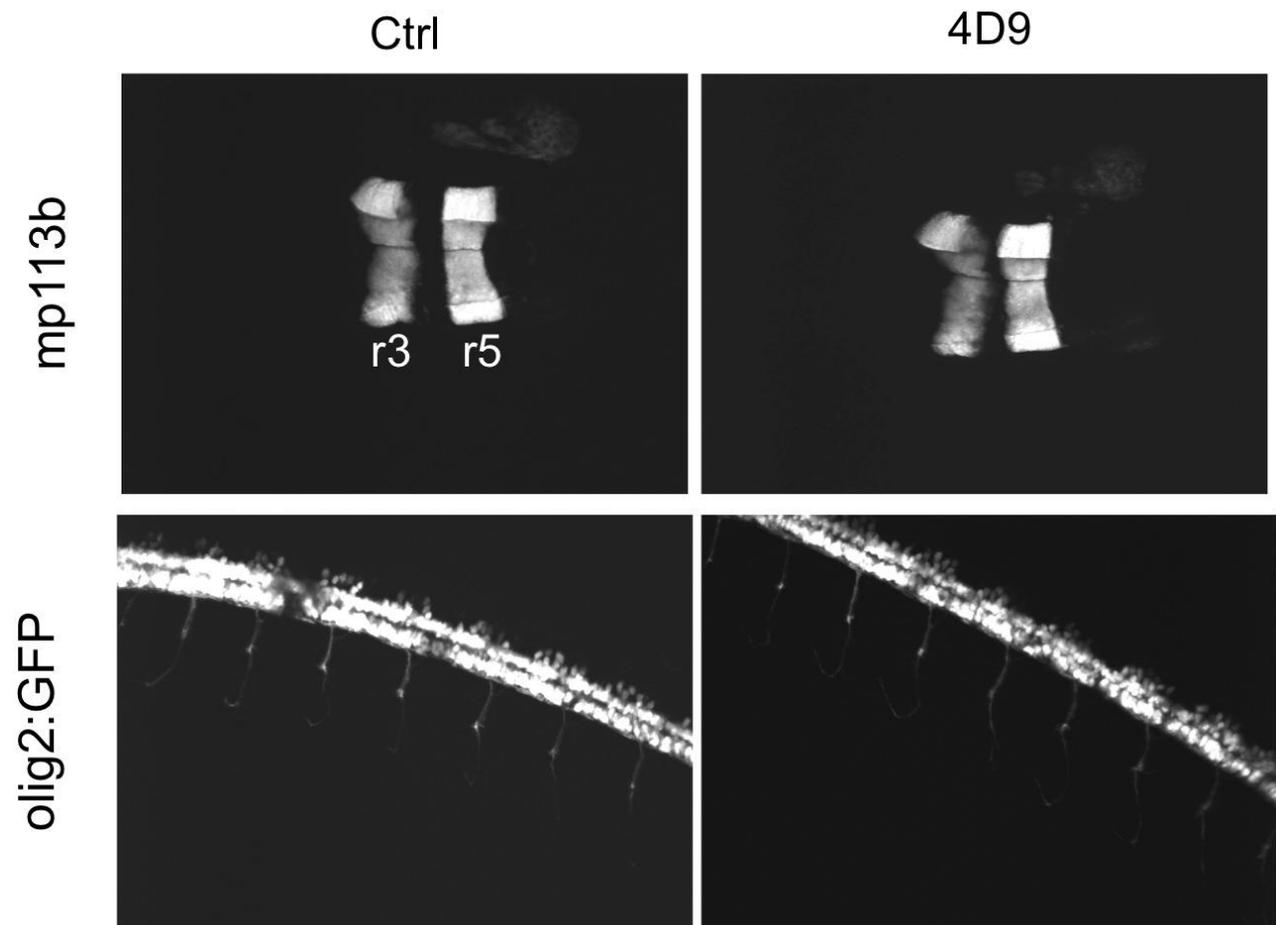


Figure S6: 4D9 injection has no effect on hindbrain (mp311b) and spinal cord (olig2) organization. Tg(mp311 +/+GFP) (Xu et al., 2012, *Development* 139(18): 3355-62), or olig2:gfp Tg(olig2:EGFP) (Shin et al., 2003, *Methods Cell Sci* 25(1-2): 7-14), transgenic zebrafish embryos were injected intercellularly at blastula stage with anti-myc or anti-En (4D9) antibody. Phenotype observed at 24 hpf. Dorsal view (mp311b) lateral view (olig2). r = rhombomere. Inhibition of Engrailed intercellular transfer has no effect on rhombomere development or oligodendrocyte migration.

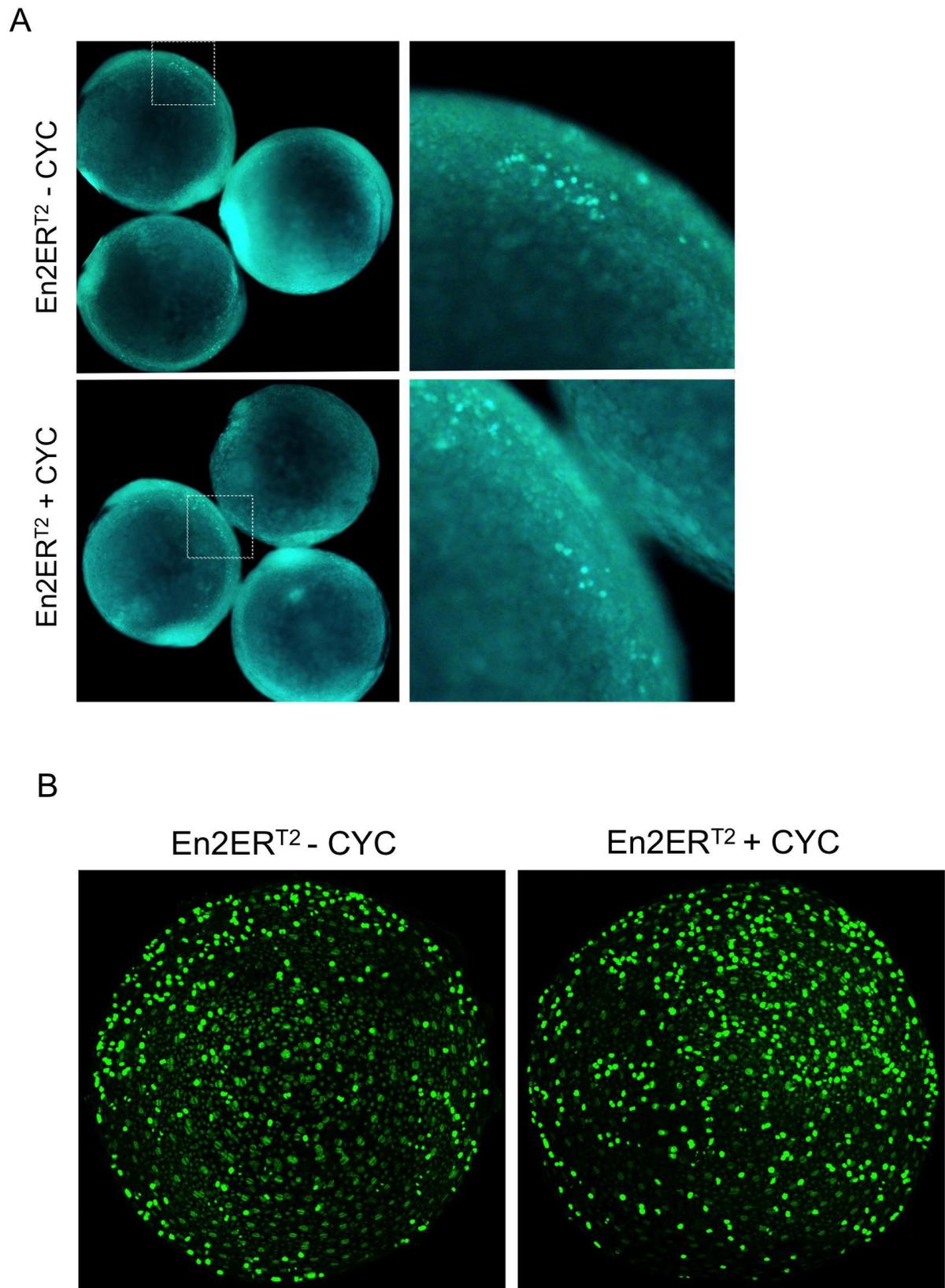


Figure S7: Proliferation and apoptosis are not affected by En2 gain of function. mRNA encoding En2ERT^{T2} was injected at one-cell stage, incubated in caged CYC and the protein activated at 70% epiboly. Embryos were either stained with acridine orange to visualize dying cells (**A**) or fixed at 90% epiboly for P-H3 immunostaining to detect cell in mitosis (**B**). No significant difference was observed.

4G11 Epitope

Chick En1	TNFFIDNILRPDFG
Chick En2	TNFFIDNILRPEFG
Danio Eng2a	TNFFIDNILRPDFG
Danio Eng2b	TNFYIDNILRPDFG

4D9 Epitope

Droso En	ELGLNESQIKIWF
Chick En2	ELGLNESQIKIWF
Danio Eng2a	ELGLNESQIKIWF
Danio Eng2b	ELGLNESQIKIWF

Figure S8: Conservation 4D9 and 4G11 epitopes in the studied Engrailed proteins. 4D9 and 4G11 epitopes are defined according (Patel et al. Cell 1989;58:955–968) and (Ericson et al. Cell 1997;90:169–180) respectively.

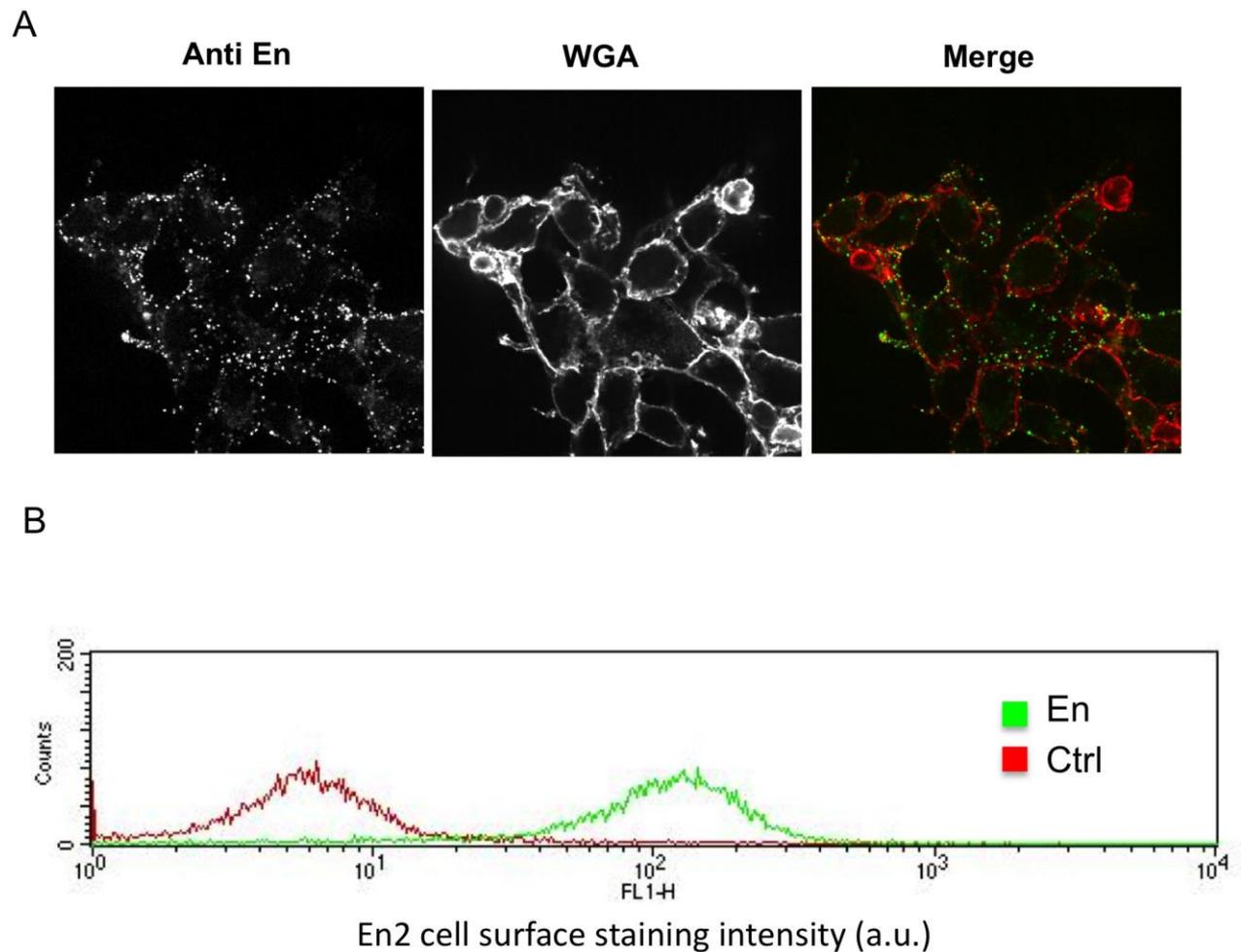


Figure S9: (A) Visualization of extracellular En2 staining. HEK293 expressing En2 were fixed and immunostained for Engrailed (4G11) and the plasma membrane marker wheat germ agglutinin (WGA) in the absence of permeabilization treatment. (B) Exemplary FACS profile of En surface staining in the presence (En) or absence (ctrl) Engrailed expression.

Supplementary Materials and Methods

Plasmids

Plasmids used for in vitro transcription (pCSmEn2ERT, coding for myc-En2-ER^{T2}; pCSmEn25EERT, coding for myc-En2(Ser150,151,153,155,156Glu)-ER^{T2}; pCSmEn2SRERT, coding for myc-En2(W247S,F248R)-ER^{T2}; pShaEng2aE4PCh, coding for HA-Eng2a-ER^{T2}-P2A-mCherry; pShaEng2bE4PCh, coding for HA-Eng2b-ER^{T2}-P2A-mCherry; pCSm5En2WWER4, coding for 5xmyc-En2(W169K,W172K)-ER^{T2}; pShaEng2aKRPC, coding for HA-Eng2a(W145K,W148K)-ER^{T2}-P2A-mCherry; pShaEng2bKRPC, coding for HA-Eng2b(W141K,W144K)-ER^{T2}-P2A-mCherry) were built in derivatives of pCS2 (Turner & Weintraub, 1994). Plasmid for expression in zebrafish embryos (pT22Ubm5En2E4PCh, coding for 5xmyc-En2-ER^{T2}-P2A-mCherry) contains an Ubi promoter (Mosiman et al., 2011). Plasmids for protein expression in *E. coli* (pShCherryScEn2, coding for bactCherry-ScissionCS-En2; pShCherryScEng2a, coding for bactCherry-ScissionCS-Eng2a; pShCherryScEng2b, coding for bactCherry-ScissionCS-Eng2b; pShCherryScEn2WW, coding for bactCherry-ScissionCS-En2(W169K,W172K)) were based on CherryExpressTM vector from Eurogentec SA (Belgium). Plasmids for transfection in mammalian cells (pCSEng2a or pcDNA7Eng2a, coding for Eng2a; pCSEng2b or pcDNA7Eng2b, coding for Eng2b; pcDNA7En2, coding for En2; pcDNA7En2K, coding for En2(W169K,W172K); pcDNA7Eng2aK, coding for Eng2a(W145K,W148K); pcDNA7Eng2bK, coding for Eng2b(W141K,W144K)) were built in derivatives of either pCS2 or pcDNA5 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Sequences are available on request.

Table S1: Sample size

<p>Figure 1B: no CYC[n=33]; dome[n=44]; 50% epiboly[n=18]; 70% epiboly[n=20]; 1-2 somite[n=13].</p> <p>Figure 1D: Ctrl[n=54; En2 gain-of-function[n=66]</p>
<p>Figure 2B: no CYC, 5E[n=78]; no CYC, SR[n=29]; dome, 5E[n=16]; dome, SR[n=57]; 50% epiboly, 5E[n=78]; 50% epiboly, SR[n=41]; 70% epiboly, 5E[n=21]</p> <p>Figure 2C: Ctrl[n=6], En2[n=6], En-5E[n=6],</p> <p>Figure 2E: EnER^{T2} no CYC[n=18]; EnER^{T2} + CYC[n=57]; EnER^{T2} + CYC+ 4G11[n=136]; EnER^{T2} + CYC+ 4D9[n=29]; 4G11[n=48]; 4D9[n=79]</p>
<p>Figure 3D: En2[n= 14 samples*]; Eng2a[n=15 samples*]; Eng2b[n=14 samples*]</p> <p>Figure 3E: For each condition 8 independent samples of 10,000 cells were used for quantification.</p> <p>Figure 3F: EnER^{T2} no CYC[n=47]; EnER^{T2} + CYC[n=31]; Eng2aER^{T2} no CYC[n=42]; Eng2aER^{T2} + CYC[n=43]; Eng2bER^{T2} no CYC[n=81]; Eng2bER^{T2} + CYC[n=101]</p>
<p>Figure 4E: anti-myc[n=47]; 4D9[n=72]; 4D9+peptide[n=26];</p> <p>Figure 4F: anti-myc[n=37]; 4D9[n=59]; 4D9+peptide[n=37];</p> <p>Figure 4G: anti-myc[n=47]; 4G11[n=54];</p> <p>Figure 4H: anti-myc[n=37]; 4G11[n=23];</p> <p>Figure 4I: En2[n=80], En2+4D9[n=60], Eng2a[n=49], En2a+4D9[n=45], Eng2b[n=59], Eng2b+4D9[n=38];</p> <p>Figure 4J: Ctrl[n=6], En2[n=6], En2a[n=6], En2b[n=6],</p>
<p>Figure 5: En2 gain-of-function[n=66]; Ctrl[n=54]; anti-myc[n=23]; anti En2[n=60]</p>
<p>Figure 6A: En2[n=52]; En2WW>KK[n=42]; Eng2a[n=56]; Eng2aWW>KK[n=76]; Eng2b[n=31]; Eng2bWW>KK[n=72]</p> <p>Figure 6B: For each condition 8 independent samples of 10,000 cells were used for quantification.</p> <p>Figure 6D: En2[n= 8 samples*]; En2WW>KK[n=8 samples*]</p> <p>Figure 6F: En2[n= 8 samples*]; HD[n= 8 samples*]; Hexa-HD[n= 8 samples*]</p>
<p>Figure S3B: For each condition 8 independent samples of 10,000 cells were used for quantification.</p> <p>Figure S3C: [n= 8 samples*]</p>
<p>Figure S4: anti-myc[n=47]; 4D9 50 ng/ml[n=50]; 4D9 100ng/ml[n=72];</p>
<p>Figure S5: ni[n=38]; 4D9[n=42]; 4G11[n=44]</p>

* for each sample the fluorescence of at least 10 cells was measured

Table S2. Plasmids used in this study

Plasmid	Promoter	Coding sequence
pCSm5En2ERT	SP6	5xmyc-chkEn2-ER ^{T2}
pCSmEn25EERT	SP6	myc-chkEn2(5S>5E)-ER ^{T2}
pCSmEn2SRERT	SP6	myc-chkEn2(WF>SR)-ER ^{T2}
pShaEng2aE4PCh	SP6	3xHA-Eng2a-ER ^{T2} -P2A-mCherry
pShaEng2bE4PCh	SP6	3xHA-Eng2b-ER ^{T2} -P2A-mCherry
pCSm5En2WWER4	SP6	myc-chkEn2(WW>KK)- ER ^{T2}
pShaEng2aKRPC	SP6	3xHA-Eng2a(WW>KK)-ER ^{T2} -P2A-mCherry
pShaEng2bKRPC	SP6	3xHA-Eng2b(WW>KK)-ER ^{T2} -P2A-mCherry
pT22Ubm5En2E4PCh	Ubi	5xmyc-chkEn2-ER ^{T2} -P2A-mCherry
pShCherryScEn2	T7	bacCherry-Sci-chkEn2
pShCherryScEng2a	T7	bacCherry-Sci-Eng2a
pShCherryScEng2b	T7	bacCherry-Sci-Eng2b
pShCherryScEn2WW	T7	bacCherry-Sci-chkEn2(WW>KK)
pCSEng2a	sCMV	Eng2a
pCSEng2b	sCMV	Eng2b
pcDNA7En2	CMV	chkEn2
pcDNA7Eng2a	CMV	Eng2a
pcDNA7Eng2b	CMV	Eng2b
pcDNA7En2K	CMV	chkEn2(WW>KK)
pcDNA7Eng2aK	CMV	Eng2a(WW>KK)
pcDNA7Eng2bK	CMV	Eng2b(WW>KK)

Sequences are available on request.

