HAL
open science

Caractérisation des régulateurs d'ELMO : identification des ligands du domaine polyprolines d'ELMO

Rida Awad

To cite this version:

Rida Awad. Caractérisation des régulateurs d'ELMO : identification des ligands du domaine polyprolines d'ELMO. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV048 . tel-01314420

HAL Id: tel-01314420

https://theses.hal.science/tel-01314420v1

Submitted on 27 Jun 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 DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Mme Rida AWAD

Thèse dirigée par **Jean-Philippe KLEMAN**
et co-dirigée par **Philippe FRACHET**

Préparée au sein du **Laboratoire «Réponse immunitaire aux pathogènes et au soi altéré» de l'Institut de Biologie Structurale**
dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Caractérisation des régulateurs d'ELMO : Identification des ligands du domaine polyproline d'ELMO

Thèse soutenue publiquement le **13 décembre 2013**,
devant le jury composé de :

M Stefan NONCHEV
Professeur de l'Université de Grenoble - Président du Jury

M Etienne DECROLY
Directeur de recherche, AFMB, Marseille - Rapporteur

Mme Marie FERNET
Ingénieur de recherche, Institut Curie, Orsay - Rapporteur

M Jean-Baptiste REISER
HDR Institut de Biologie Structurale, Grenoble - Examinateur

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

Remerciements

Tout travail réussi dans la vie nécessite en premier lieu la bénédiction de Dieu, et ensuite l´aide et le support de plusieurs personnes. Je tiens donc à remercier et à adresser ma reconnaissance à toute personne qui m´a aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

Je souhaite remercier le professeur Stefan NONCHEV dont la présence me tient à cœur et qui m'a soutenu depuis mon arrivée en France. Je le remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse mais également de m'avoir suivie tout au long de ces années au cours des comités de suivi de thèse (Merci chaleureusement à Christian VILLIERS et Véronique ROSSI pour leurs participations à ces comités).

Je tiens à remercier et à exprimer ma gratitude pour le Dr Marie FERNET et le Dr Etienne DECROLY de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail. Leurs remarques et leurs conseils sont d'une grande valeur. J'aimerais remercier tout particulièrement le Dr Jean-Baptiste REISER pour son écoute, sa gentillesse, et son soutien. Je le remercie également pour ses conseils, pour nos discussions scientifiques, et pour ses bandes dessinés qui me faisaient sourire pendant la période de rédaction difficile.

Mes remerciements vont ensuite vers mon directeur de thèse, le Dr Jean-Philippe KLEMAN. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance. Tu m'as tout de suite fait confiance et tu me l'as de surcroit ensuite réitérée à de nombreuses reprises, j'espère en être digne. Sans ton aide, ton soutien, ta patience, ta gentillesse et ton expertise scientifique je n'aurais sans doutes pas pu arriver jusqu'au bout de ma thèse. Je te remercie de m'avoir appris beaucoup de choses mais surtout comment être une meilleure personne.

Je remercie de tout cœur mon co-directeur de thèse le Dr Philippe FRACHET qui m'a accueilli dans son équipe. Je le remercie d'être présent pour moi, pour ses conseils et ses encouragements qui étaient d'une grande aide dans la réalisation de mes travaux.

Merci aux membres de mon équipe, à Pascale pour sa gentillesse et ses encouragements, à ma compatriote Rime dont j'étais ravie de faire sa connaissance ; je lui souhaite bon courage pour la suite. Une grande pensée à Mélanie, qui est une merveilleuse personne et dont l'amitié me tient à cœur. Je pense également à Linda qui a su me supporter…

J'aimerais encore remercier chaleureusement les membres de la deuxième équipe auprès de qui j'ai travaillé pendant ces trois années. J'adresse un énorme merci à Anne, Ombeline, Dominique et Violaine. Je les remercie pour leur présence, leur accueil, leur aide et les agréables moments passés à leur côté. Je ne peux pas oublier Marion, qui a partagé avec

moi la responsabilité de notre ELMO, et qui est une personne formidable que j'apprécie énormément. Je remercie de tout cœur les voisins du groupe RMN et notamment Isabel, avec son beau sourire, ainsi que Karine pour leur gentillesse et leur soutien. Je remercie également Pierre (Gans) pour son aide dans les expériences de RMN. Je remercie également Pierre (Métais) de m'avoir sauvée lors de mes erreurs d'autoclavage.

Je tiens à remercier tous les membres passés ou présents du groupe IRPAS, bien que je n'ai pas eu l'occasion de les voir souvent mais c'était un grand honneur de faire leur connaissance.

Je tiens à remercier le groupe VIC pour leur accueil, leur soutien et de me faire sentir que je fais partie de leur groupe. J'aimerais remercier Dimitrios, Isabel, Salvatore, Johanna, Meike, Fabienne et Julien mais tout particulièrement les deux «papillons» Françoise et Rose-Laure, je vous remercie pour votre aide, votre soutien et vos conseils précieux.

Je remercie mes amis du laboratoire Rime, Amel, Ziad, Chady et Christine et je leur souhaite tous bon courage pour la suite. Et à toi Rime, je te dis nos discussions plein d'humour resteront des moments inoubliables.

Un remerciement plein d'émotion pour toi Joëlle, ma seconde mère. Tu étais à mes côtés depuis mon master 2 à me soutenir, à m'encourager et à m'aider. Ta présence était un point d'appui pour moi durant ces années.

J'adresse de tout mon cœur mes remerciements à mes amis en France, vous étiez ma deuxième famille. Je remercie mon complice Mahmoud, l'adorable Makieh, le gentil Ali, le sympathique Wael et la courageuse Maha, la charmante Meryam, le malin Roland et les agréables Hind et Sandra.

Et à toi ma chère wafa, j'adresse mes vifs remerciements. Je te remercie d'être si attentionné à mon égard, de m'avoir aidée et soutenue.

Mes derniers remerciements et pas les moindres sont pour ma famille et particulièrement mes parents. Aucun de mes mots ne sera à la hauteur de vos sacrifices et de votre générosité. Vous étiez toujours la source de toute réussite dans ma vie. Je remercie mes frères et ma sœur. Je ne peux t'oublier Roba, ma chère amie et sœur, merci d'être toi.

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust

Table des Matières

Table des illustrations **9**

Tableaux **11**

I. INTRODUCTION **13**
A. Phagocytose des cellules en apoptose 16
1. Mécanisme et acteurs moléculaires **17**
2. Signalisation cellulaire: voies impliquées dans l'internalisation **19**
a) La voie GULP (CED-6) 19
b) La voie DOCK180/ELMO (CED-5/CED-12) 20
3. Les Rho GTPases: leurs origines et leurs fonctions **22**
a) Les GTPases 22
b) Les Rho GTPases 22
(1) La sous-famille Rho 23
(2) La sous-famille Rac 24
(3) Régulation des GTPases 26
4. La famille DOCK: Dedicator of cytokinesis **27**
a) La sous-famille A : DOCK1, DOCK2 et DOCK5 28
(1) DOCK1 ou DOCK180 28
(2) DOCK2 29
(3) DOCK5 29
b) La sous-famille B : DOCK3 et DOCK4 29
c) La sous-famille C : DOCK6, DOCK7, et DOCK8 30
d) La sous-famille D : DOCK9, DOCK10, et DOCK11 30
5. Les domaines fonctionnels de la famille DOCK **30**
a) Le domaine DHR1 31
b) Le domaine DHR2 31
c) Le domaine SH3 32
d) Le motif polyprolines (PxxP) 32
e) Le domaine PH 33
6. La famille ELMO **33**
a) Le domaine EID et EAD 33
b) Le domaine RBD 34
c) Le domaine PH 34
d) Le domaine ELM 35
e) Le motif polyproline 35
B. ELMO et DOCK: un mécanisme complexe de régulation et de recrutement à la membrane... 35
1. Le complexe ELMO/DOCK180 ..... **35**
2. Recrutement du complexe à la membrane **36**
a) Dépendant d'ELMO 36
(1) En interagissant avec RhoG 36
(2) En interagissant avec les membres de la famille Arf 36
(3) En interagissant avec BAI1 37
b) Dépendant de DOCK180 37
(1) En interagissant avec CrkII 37
(2) En interagissant avec la famille ERM 38
(3) En interagissant avec les phospholipides 38
(4) Dimérisation de DOCK 38
3. ELMO régule DOCK180? **39**
a) En empêchant son auto-inhibition? 39
b) Par protection contre l'ubiquitinylation 39
c) Phosphorylation de DOCK180 et d'ELMO 39
4. Complexe ELMO et DOCK180: modèle d'activation et de régulation **40**
5. Les interactions SH3/PxxP **41**
C. La phosphorylation 44
1. Les kinases **44**
a) Différents classes de kinases 44
b) Les tyrosines kinase 45
(1) Les récepteurs tyrosine kinase 45
(2) Les tyrosines kinases non récepteurs 46
(3) Fonction catalytique 47

(4) Régulation de l'activité catalytique ... 48
(a) Conformation «C-helix out» ... *49*
(b) Conformation «DFG out» ... *49*
(c) Régulation par la «P-loop» ... *49*
(d) Régulation par phosphorylation ... *50*
(e) Dérégulation des kinases ... *50*
c) La famille SRC (SRC Family Kinases: SFK) ... 51
(1) Les différents membres ... 51
(2) Structure ... 52
(3) Activation / inactivation ... 52
d) Hck: une tyrosine kinase spécifique des phagocytes ... 53
(1) Fonctions de la kinase Hck dans les phagocytes ... 54
(a) Dans la transduction des signaux par des immunorécepteurs ... *54*
(b) Dans la signalisation dépendant des intégrines ... *56*
(c) Dans la migration et formation des podosomes ... *56*
(d) Conséquences des dérégulations de Hck ... *57*
(i) Sur le recrutement des phagocytes aux sites inflammatoires ... 57
(ii) Sur l'infiltration des macrophages et pouvoir invasif des tumeurs ... 57
e) Hck et ses partenaires ... 58
(1) ELMO et Hck: partenaires mais pourquoi ? ... 58
D. Objectifs de la thèse ... 60

II. MATERIELS & METHODES ... 61
A. Biologie Moléculaire ... 62
1. Méthodes générales de biologie moléculaire ... 63
a) Transformation bactérienne et préparation d'ADN plasmidique ... 63
b) Techniques de sous-clonage : préparation du vecteur et de l'insert ... 63
(1) Amplification par PCR ... 63
(2) Par réaction enzymatique simple ... 64
(3) Insertion par clonage topo ... 65
c) Ligation ... 66
(1) Déphosphorylation du vecteur ... 66
(2) Ligation entre le vecteur linéarisé et l'insert ... 67
2. Clonage d'ELMO et de ses domaines dans le vecteur pTAP-SNAP PxxS WT ... 67
3. Clonage d'ELMO et des domaines dans le vecteur pmGFPC1 ... 68
4. Clonage des inserts SH3 de Hck et SH3 de DOCK180 dans le vecteur pCLIP C1 ... 68
5. Clonage de SH3(Hck) dans le vecteur pmCherry C1 et CLIP dans pTAP-SNAP C1 ... 68
6. Clonage du vecteur GST-CBP-TEV-Protéine A ... 69
B. Biologie cellulaire ... 70
1. Culture des cellules eucaryotes ... 70
a) Congélation et décongélation des cellules ... 70
b) Mode de culture ... 70
2. Transfection des cellules ... 70
a) Principe ... 70
b) Transfection transitoire d'ADN ... 71
c) Transfection stable des cellules HEK293T ... 72
C. Biochimie ... 72
1. Production de protéines ... 72
a) Surexpression des protéines ... 73
b) Extraction des protéines ... 74
c) Purification des protéines ... 74
d) Clivage de l'étiquette GST du GST SH3 de Hck ... 75
e) Détermination de la concentration des protéines ... 76
f) Préparation de la GST-Precission ... 76
D. Méthodes d'étude des interactions entre les protéines ... 76
1. «Pull-down» ... 76
a) SDS et western blot ... 77
(1) Electrophorèse sur gel ... 77
(2) Western blot ... 77
2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ... 79
a) Principe ... 79
b) Préparation de protéines marquées ... 80
3. Chromatographie d'exclusion stérique SEC-MALLS ... 80
a) Principe ... 80
b) Préparation des échantillons ... 81
4. Spectrométrie de masse ... 81

a) Principe ... 81
b) Expérience et préparation d'échantillons ... 82
5. Résonance plasmonique de surface (SPR) ... 82
a) Principe ... 82
b) Immobilisation des ligands sur la sensorchip ... 84
(1) Couplage amine de l'anti GST ... 84
6. Les interactions dans un contexte physiologique ... 84
a) Définition de la cytométrie en flux ... 84
(1) Etiquettes des protéines d'intérêt ... 85
(2) Protocole de marquage ... 86
b) Analyse par microscopie et par cytométrie ... 86
(3) Etude du signal de FRET ... 87
(a) Principe ... 87
(b) Différentes méthodes de détection du FRET ... 87
(c) Réalisation des expériences de FRET ... 89
c) Le réglage et la compensation ... 89
(d) Analyse des données de FRET par cytométrie ... 90
E. Tandem Affinity Purification ... 90
1. Vue d'ensemble sur la méthode du TAP-Tag ... 90
2. Mise au point de la méthode de TAP-tag au laboratoire ... 91
c) Choix des tags ... 91
d) Purification grâce au tag SNAP ... 92
e) Purification sur résine de calmoduline ... 93
(1) Tests initiaux à partir des extraits cellulaires après transfection. ... 93
(2) Purification de la protéine contrôle GST-CBP-TEV-Protéine A. ... 94

III. RESULTATS & ANALYSES ... 95
A. Identification des domaines d'interaction entre ELMO et le domaine SH3 de Hck ... 96
1. Saturation de l'interaction d'ELMO sur le domaine SH3 de Hck immobilisé ... 96
2. Comparaison par pull-down de l'interaction d'ELMO et de ses domaines sur les régions SH3 de Hck ou de DOCK180 immobilisés ... 97
3. Caractérisation préliminaire des interactions du domaine C-terminal d'ELMO avec les SH3 de DOCK180 et de Hck par SPR. ... 99
B. Caractérisation de l'interaction du peptide polyproline avec les domaines SH3 par RMN ... 100
1. Attribution et calcul de la constante d'affinité ... 103
C. Effet de la phosphorylation sur l'interaction ... 105
D. Interaction avec le domaine N-terminal d'ELMO ... 107
1. Mise en évidence de l'interaction par pull-down ... 108
2. Complexe ELMO N-terminal /SH3 de Hck par SEC-MALLS ... 108
E. Interaction d'ELMO avec Hck et activation de DOCK180. ... 110
1. Complexe ternaire du domaine C-terminal d'ELMO avec les domaines SH3 de DOCK180 et Hck par pull-down. 110
2. Etude du complexe ternaire par SPR ... 111
Analyse des interactions ... 114
1. Pull-down par immobilisation des domaines SNAP-ELMO sur les billes magnétiques ... 114
2. Mesure de FRET par cytométrie en flux ... 116
a) Choix des couples donneur/accepteur ... 116
b) Détection du signal de FRET ... 117
c) Premier essai pour détecter le signal de FRET ... 118
d) Choix du meilleur couple SNAP / CLIP ... 119
(1) Contrôle de FRET : Fusion CLIP-SNAP ... 121
(2) Mesure du FRET dans le cas des domaines mutants du C-terminal d'ELMO ... 122
3. Mesure de l'efficacité de la phagocytose par cytométrie ... 123
a) Effet des différents domaines sur la phagocytose ... 123
Stratégie du TAP-Tag ... 126
4. Mise au point de la méthode ... 127
a) Purification grâce au tag SNAP ... 128
b) Purification sur résine de calmoduline ... 128
(1) Tests initiaux à partir des extraits cellulaires après transfection ... 129
(2) Purification de la protéine contrôle GST-CBP-TEV-Protéine A ... 129
c) Purification de la protéine SNAP-CBP-ELMO sur Calmoduline ... 130
(1) Optimisation de la purification ... 131
5. Purification des protéines à grande échelle ... 132

IV. DISCUSSION GENERALE 135
A. Rôle de la kinase Hck pour l'activation de DOCK180 136
1. Hck active ELMO ? 136
2. Complexe ternaire ELMO/DOCK180/Hck 138
B. ELMO, DOCK180 et Hck pour une meilleure phagocytose ? 141
C. Autres partenaires d'ELMO 142

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 145

VI. ANNEXES 154
Abréviations 154
Publication 158

Table des illustrations

Figure 1. Schéma des voies de signalisation 21
Figure 2. Protéines de la famille Rho 23
Figure 3. Schéma des voies dépendantes de Rho 24
Figure 4. Schéma des voies dépendantes de Rac 25
Figure 5. Régulation des GTPases par les GEF, GAP et GDI 27
Figure 6. Schéma des membres de la famille DOCK 28
Figure 7. Schéma de la protéine ELMO 33
Figure 8. Schéma de l'interaction fonctionnelle d'ELMO et DOCK180 40
Figure 9. Exemple d'une interaction SH3/Polyproline 42
Figure 10. Structure cristallographique PDB 3A98 du complexe ELMO/DOCK2 43
Figure 11. Arbre phylogénétique des kinases humaines 46
Figure 12. Structure cristallographique (PDB 2SRC) de la kinase Src 48
Figure 13. Représentation des domaines de la famille Src 52
Figure 14. Les SFK dans les voies de signalisation dépendant des immunorécepteurs 55
Figure 15. Phosphorylations d'ELMO 59
Figure 16. Carte du vecteur pCR™-Blunt II-TOPO (Invitrogen) 66
Figure 17. Méthode générale du clonage 69
Figure 18. Constructions représentant les différents domaines d'ELMO. 73
Figure 19. Séquence de la protéine GST SH3 de Hck 75
Figure 20. Montage pratique du western blot 78
Figure 21. Principe de la résonance plasmonique de surface 83
Figure 22. Exemple de sensogramme 83
Figure 23. Réaction de la protéine SNAP avec son substrat. 86
Figure 24. Schéma des spectres de fluorescence 87
Figure 25. Schéma du principe du TAP-tag 91
Figure 26. Pull-down d'ELMO recombinant sur GST-SH3 de Hck. 97
Figure 27. Pull-down d'ELMO par les domaines SH3 98
Figure 28. SPR : interaction ELMO ΔN sur SH3 (DOCK180) 100
Figure 29. RMN : Interaction du SH3(DOCK180) avec le peptide D28N 101

Figure 30. RMN : Titration du SH3(Hck) avec le motif polyproline d'ELMO D28N 102
Figure 31. RMN : Déplacements chimiques SH3(Hck) en présence de D28N.....104
Figure 32. RMN : Déplacements chimiques SH3(Hck), Phospho-D28N (ELMO) 106
Figure 33. Pull-down d'ELMO par les domaines SH3 de DOCK 180 et d'ELMO.....108
Figure 34. Etude par SEC-MALLS des complexes d'ELMO 109
Figure 35. Analyse des interactions du domaine C-terminal d'ELMO. 111
Figure 36. SPR : Interaction des complexes ELMO/DOCK180/Hck 112
Figure 37. Détection des complexes SH3(Hck) et ELMO par pull-down 115
Figure 38. Analyse FRET par cytométrie en flux 118
Figure 39. Tests par cytométrie des marqueurs CLIP et SNAP 120
Figure 40. Contrôles de FRET en cytométrie 121
Figure 41. Analyse du FRET des cellules transfectées par ELMO et SH3(Hck) 122
Figure 42. Mesure de la phagocytose par cytométrie.....124
Figure 43. Schéma du principe du TAP-tag.....126
Figure 44. Schéma des constructions d'ELMO 127
Figure 45. Purification contrôle de la fusion SNAP 128
Figure 46. Purification contrôle de GST-CBP 130
Figure 47. Purification témoin de la protéine TAP-ELMO.....130
Figure 48. Purification TAP du domaine SH3 de DOCK180.....132
Figure 49. Membrane de la purification TAP des protéines associées à ELMO ΔPxP.....133
Figure 50. Phosphorylation d'ELMO 139

Tableaux

Tableau I. Les 9 grandes familles des kinases.....45
Tableau II. Expression des différents membres de la famille Src. 51
Tableau III. Préparation de l'échantillon de PCR 64
Tableau IV. Programme de PCR pour ELMO.....64
Tableau V. Amorces des PCR pour l'amplification d'ELMO 67
Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification des domaines SH3 68
Tableau VII. Programme de PCR pour les domaines SH3 68
Tableau VIII. Différentes conditions utilisés pour la transfection des HEK293T. 72
Tableau IX. Protéines produites et purifiées au cours de ce travail. 73
Tableau X. Composition des tampons de transfert. 78
Tableau XI. Substrats des protéines SNAP et CLIP 86
Tableau XII. Séquences des peptides polyprolines synthétiques d'ELMO.....101
Tableau XIII. Constantes d'affinités de l'interaction du SH3(Hck) avec D28N 104
Tableau XIV. Constantes d'affinités de l'interaction du SH3(Hck) avec Phospho-D28N 107
Tableau XV. Couples donneurs et accepteurs de FRET 117

I. INTRODUCTION

L'équipe «Phagocytose du soi altéré» au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse, fait partie du groupe «Réponse immunitaire au pathogène et au soi altéré» de l'Institut de Biologie Structurale. La thématique du groupe porte sur l'étude des mécanismes de reconnaissance moléculaire mis en jeu dans différents aspects de la réponse immunitaire aux pathogènes et aux cellules du soi altéré, ainsi que les implications biologiques de ces interactions dans la défense antimicrobienne, le maintien de la tolérance immune et les stratégies d'évasion des pathogènes. Notre équipe s'intéresse surtout à la phagocytose des cellules apoptotiques, un processus nécessaire pour l'homéostasie et le développement de l'organisme. La phagocytose peut être réalisée soit par des cellules professionnelles comme les macrophages et les cellules dendritiques, soit par des cellules non professionnelles (environnantes) comme les cellules épithéliales. Cette élimination rapide par phagocytose empêche les cellules mortes de déverser leur contenu intracellulaire et protège l'organisme contre les risques d'inflammation et de maladies auto-immunes. Le travail de notre équipe cherche d'une part à identifier les mécanismes de reconnaissance entre les phagocytes et les cellules apoptotiques impliquant la molécule C1q ainsi que, d'autre part, les voies de signalisation intracellulaires responsables de l'internalisation des cellules apoptotiques.
Je me suis intéressée pendant ma thèse au complexe ELMO/DOCK180 (Engulfment and Cell Motility/Downstream of CrKII[1]) et ses partenaires impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine dans les phagocytes. ELMO est une protéine régulatrice du facteur d'échange DOCK180, au cours de la phagocytose. Sous sa forme activée, ELMO interagit avec la protéine DOCK180 pour activer la petite GTPases Rac ce qui permet le remodelage du cytosquelette d'actine. Ce complexe est exprimé dans les macrophages et joue avec ses partenaires un rôle important dans les fonctions spécifiques accomplies par ces derniers.

Les macrophages sont des cellules de l'immunité dérivant de la lignée myéloïde à partir de la différenciation des monocytes. Ce sont des phagocytes souvent spécialisés qui ont des fonctions d'élimination des cellules apoptotiques, des pathogènes et des débris cellulaires en produisant des intermédiaires réactives de l'oxygène (H_2O_2) ou de l'azote comme l'oxyde nitrique (NO) ou le peroxynitrite (ONO_2). Ils jouent également le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et permettent l'activation des lymphocytes T spécifiques des antigènes présentés. Ils sont d'autre part impliqués dans la réponse anti-tumorale où ils sont

[1] Les abréviations usuelles sont consultables dans les Annexes de ce document.

caractérisés par un haut niveau de présentation antigénique et une production importante des interleukines IL2 et IL3 qui assureront une cytotoxicité importante vis-à-vis des cellules tumorales. Cependant une autre population de macrophages les TAM («tumor associated macrophages») est caractérisée par la sécrétion de facteurs angiogéniques, de protéases et de cytokines conduisant à la suppression d'une réponse immune spécifique favorisant l'angiogénèse et la progression tumorale. Leur infiltration est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein et du colon.
Les fonctions accomplies par les macrophages comme la phagocytose et la migration impliquent un réseau de régulateurs dont les fonctions sont liées à l'actine. Ces régulateurs sont à l'origine de la formation des podosomes et des synapses phagocytaires. Quand ils sont attirés par chimiotaxie, les macrophages forment des podosomes qui leur permettent de migrer aux sites d'inflammation. Une fois en contact avec leur cible, les podosomes disparaissent et des coupes phagocytaires apparaissent à la surface de la membrane plasmique.

Une des molécules pouvant jouer un rôle dans la phagocytose et la migration mais qui reste mal décrite est la tyrosine kinase hématopoïétique Hck. Des études récentes montrent que l'infiltration de certaines cellules de l'immunité et tout particulièrement les macrophages, est directement liée à l'activité de la kinase Hck dans la régulation des podosomes, à la fois pour la migration mais aussi pour la protéolyse opérée par ceux-ci pendant leurs déplacements (Cougoule et al. 2010). En outre, lorsque mon travail de thèse a débuté, il venait d'être décrit que Hck est un partenaire d'ELMO, et qu'elle la phosphoryle sur 5 tyrosines (Yokoyama et al. 2005). Si ces phosphorylations ne modifient pas la formation du complexe ELMO/DOCK180, elles semblent affecter le facteur d'échange et sa capacité à activer la phagocytose. Le mécanisme d'interaction de Hck avec ELMO ainsi que le rôle des phosphorylations restait cependant à élucider.

Le rôle de Hck dans la formation de podosomes ainsi que son interaction avec le complexe ELMO/DOCK180 en fait une cible potentielle importante pour le contrôle de la capacité des macrophages à migrer et à former des coupes phagocytaires. Notre projet vise à mieux comprendre les modes d'action de Hck en explorant son interaction fonctionnelle avec ELMO.

A. Phagocytose des cellules en apoptose

Dans les organismes multicellulaires, leur développement, la morphologie des organes, la formation de connections nerveuses ou même la réponse immunitaire conduisent à la formation de cellules dont la mort a été programmée, ces cellules sont en apoptose. Cette mort cellulaire programmée touche toutes les cellules en fin de vie dans l'organisme, les cellules infectées par des virus ou des pathogènes ou même des cellules tumorales. Cette élimination des cellules, dîtes du soi altéré, est nécessaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire et l'équilibre de l'organisme, et permet de le protéger contre le cancer et les maladies auto-immunes (Hochreiter-Hufford et Ravichandran 2013).

La dérégulation de la mort cellulaire programmée est impliquée dans de nombreuses pathologies. Son inhibition lors de la tumorigenèse est un facteur important dans la progression des tumeurs. Une apoptose insuffisante peut également entrainer des maladies auto-immunes comme l'ALPS (auto-immune proliferative syndrome), qui est liée à une déficience d'élimination des lymphocytes T agressifs (Worth, Thrasher, et Gaspar 2006). A l'inverse une apoptose extrême participe au développement de maladies du système immunitaire comme le SIDA (Li et al. 1995), ou des maladies neuro-dégénératives comme Parkinson et Alzheimer (Ethell et Buhler 2003).

Les corps apoptotiques générés sont éliminés par phagocytose, que l'on peut ainsi considérer comme l'étape ultime du programme apoptotique. Cette élimination est très efficace et peu de cellules en apoptose sont observées dans les différents tissus et organes. Elle peut être assurée soit par des phagocytes professionnels comme les macrophages et les cellules dendritiques, mais aussi par des phagocytes non professionnels des tissus environnants comme les cellules épithéliales ou endothéliales et les fibroblastes, ce qui explique la grande efficacité de cette élimination. Un défaut de l'élimination par phagocytose des cellules apoptotiques est souvent identifié comme la cause première de plusieurs maladies comme dans le cas de la formation des plaques d'athérosclérose (Schrijvers et al. 2005), l'arthrite rhumatoïde, ou le lupus érythémateux systémique (Tas et al. 2006). La phagocytose démarre par un phénomène de chimiotactisme afin d'attirer les phagocytes vers le foyer d'infection. La reconnaissance par le phagocyte de ses cibles permet leur internalisation puis leur destruction. Les molécules impliquées dans ces mécanismes font l'objet de la suite de ce chapitre.

1. Mécanisme et acteurs moléculaires

Comme nous venons de le voir, la phagocytose débute par une **sensibilisation des phagocytes par les cellules apoptotiques.** Les cellules apoptotiques secrètent des substances comme la factalkine, le sphingosine-1-phosphate ou les nucléotides ATP et UTP et qui sont décrits comme étant des signaux «**Find-me**» (Lauber et al. 2003; Gude et al. 2008; Elliott et al. 2009).

Ces signaux permettent d'établir un gradient chimiotactique stimulant la migration des phagocytes vers les corps apoptotiques (Hochreiter-Hufford et Ravichandran 2013).

Une fois à proximité de leur cible, les phagocytes distinguent les cellules en apoptose des cellules viables grâce aux signaux «**eat-me**» exprimés ou exposés à la surface cellulaire. Le marqueur «eat-me» le plus emblématique est la phosphatidylsérine (PtdSer ou PS), sa translocation à la surface des cellules apoptotiques est importante pour la phagocytose, mais le mécanisme de son action conserve de larges zones d'ombre. Des études suggèrent que la reconnaissance de la phosphatidylsérine est nécessaire et suffisante pour déclencher la phagocytose (Fadok et al. 1998), en plus il apparaît que la majorité des signaux «eat-me» et leurs récepteurs associés sont capables de promouvoir l'adhésion entre partenaires cellulaires sans induire un taux fort d'internalisation, la PS étant nécessaire à l'induction de l'internalisation (Hoffmann et al. 2001). Cependant, dans les travaux de Segawa et collaborateurs, des cellules viables (cellules de souris: W3-Ildm) qui exposent un taux élevé de phosphatidylsérine (équivalent aux cellules apoptotiques) via l'expression d'une forme constitutivement active du TMEM16F[2] ne sont pas phagocytées (Segawa, Suzuki, et Nagata 2011), ce qui suggère que d'autres molécules ou signaux «eat-me» doivent être également présent à la surface de la cellule pour créer une synergie. De même, des phagocytes peuvent présenter une préférence entre deux cellules apoptotiques exposant le même taux de phosphatidylsérine. En effet l'engagement des récepteurs de la phosphatidylsérine dépend de 2 facteurs, d'une part l'exposition de cette dernière à la surface et son accessibilité, et d'autre part la modification d'une fraction de la PS (par exemple par oxydation) qui est alors mieux reconnue par certaines molécules comme CD36 et MFG-E8 qui ont une préférence pour la PS modifiée (Kagan et al. 2002; Elliott et al. 2010). Ces données suggèrent que le mécanisme de reconnaissance est plus complexe qu'on ne pourrait le penser.

---

[2] la protéine transmembranaire 16F est impliquée dans l'exposition de la Ptdser à la surface des cellules suivant une voie dépendante du calcium (Nagata, Hanayama, et Kawane 2010)

D'autres signaux «eat-me» ont été identifiés, ils incluent une modification du profil de glycosylation ou de la charge des protéines de surface (Ravichandran et Lorenz 2007) , l'expression de la molécule d'adhésion intracellulaire 3 (ICAM3) et des lipoprotéines de basse densité oxydées (Devitt et al. 1998; Fadok et al. 1998; Aderem et Underhill 1999) ainsi que certaines protéines intracellulaires comme l'annexine1 et la calréticuline (Arur et al. 2003; Gardai et al. 2005; Obeid et al. 2007). Les signaux «eat-me» sont reconnus soit directement par des récepteurs exprimés à la membrane des phagocytes comme les lipides de basse densité oxydés reconnus par les récepteurs «scavenger», soit par des récepteurs solubles ou «bridging molecule» qui sont à leur tour reconnus par d'autres récepteurs du phagocyte comme MFG-E8 et la protéine S qui se lient d'un côté à la phosphatidylsérine du côté de la cellule en apoptose et de l'autre côté aux récepteurs des phagocytes, ou la molécule C1q qui est reconnue par le complexe LRP1/CD91.

Il est important de noter que les cellules viables expriment à leurs surfaces des signaux nommés «**don't eat- me**» pour se protéger de la phagocytose. Elles expriment le CD47 qui est une protéine membranaire reconnue par le récepteur SIRPα, ce qui inhibe leur internalisation par les phagocytes (Gardai et al. 2005). Il y a aussi la molécule CD31 (Brown et al. 2002) ainsi que CD59, CD55/DAF OU CD46/MCP (Elward et al. 2005; Griffiths, Gasque, et Neal 2010) qui sont des régulateurs des protéines d'activation du complément. La présence de ces signaux peut en partie expliquer que la présence seule de la phosphatidylsérine ne suffise pas à entrainer la phagocytose, et participe ainsi à un équilibre subtil qui explique la grande efficacité de cette élimination indispensable à l'homéostasie tissulaire. En prenant en compte toutes ces données, un parallèle peut être fait avec la synapse immunologique. Les différents signaux «eat-me» exposés contrebalancent les signaux «don't eat-me» et permettent l'adhésion phagocyte/cellule apoptotique tandis que l'engagement de la PS est à l'origine de la signalisation et l'induction de la phagocytose.

La phosphatidylsérine est reconnue par une large gamme de récepteurs, qui la reconnaissent soit à travers des molécules pontantes comme MFG-E8 qui se lie aux intégrines présentes à la surface des phagocytes (Hanayama et al. 2002; Nagata, Hanayama, et Kawane 2010), Gas 6 et la protéine S qui se lient aux récepteurs TAM (Nagata, Hanayama, et Kawane 2010; Nakano et al. 1997), ou encore directement comme BAI1, une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui se lie avec la

phosphatidylsérine par des répétitions extracellulaires de type thrombospondine1 (D. Park et al. 2007) . D'autres exemples à citer sont les récepteurs de la famille TIM (Wong et al. 2010) qui sont également des protéines transmembranaires exprimées par les phagocytes professionnels et les cellules du foie; les récepteurs de la famille Stabiline, une protéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales sinusoïdales et les macrophages (S. Park et al. 2008).

Comme on le voit, une grande variété de molécules et de récepteurs est impliquée dans la phagocytose des corps apoptotiques. La raison de cette variété est liée d'une part à la spécificité d'expression des récepteurs selon les cellules et les tissus considérés, et d'autre part à leurs fonctions spécifiques. Cette redondance est une preuve de l'importance physiologique de ce mécanisme. D'autre part, ces récepteurs sont non seulement impliqués dans la reconnaissance des corps apoptotiques, mais aussi dans la signalisation du remodelage du cytosquelette d'actine et la formation de pseudopodes permettant l'internalisation. Ce sont ces voies que nous allons décrire dans les paragraphes qui suivent.

2. Signalisation cellulaire: voies impliquées dans l'internalisation

Les premières informations sur les voies de signalisation impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine proviennent de l'étude génétique réalisée sur le ver *Caenorhabditis elegans*. Ces études ont permis d'identifier des protéines impliquées dans l'élimination des cellules mortes au cours du développement. Ces protéines se classent dans 2 voies principales qui mènent à l'activation de l'orthologue CED-10 la petite GTPase Rac. On distingue la voie GULP (CED-6) et la voie DOCK180/ELMO (CED-5/CED-12).

a) La voie GULP (CED-6)

Les protéines impliquées dans cette voie sont le récepteur «scavenger» LRP1/CD91 et MEGF-10 (CED-1), l'adaptateur GULP (CED-6) et le transporteur ABC (CED-7) respectivement (Hamon et al. 2006; Q. Liu et Hengartner 1998; Su et al. 2002; Wu et Horvitz 1998a; Zhou, Hartwieg, et Horvitz 2001). LRP1 et MGEF-10 sont décrits comme étant deux orthologues distincts de CED-1 chez les mammifères. Contrairement à LRP1, MGEF-10 présente une homologie structurale de son domaine extracellulaire avec CED-1 (Ravichandran et Lorenz

2007). LRP1/CD91 est quant à lui un récepteur exprimé à la surface des phagocytes capable de reconnaître les signaux «eat-me» présentés à la surface des corps apoptotiques. Il interagit directement avec l'adaptateur GULP (CED-6), cette interaction serait à l'origine d'un réarrangement du cytosquelette (Su et al. 2002).

D'une façon intéressante, il a été montré que GULP interagit avec le récepteur de la phosphatidylsérine Stabiline2, et que la suppression génétique de GULP endogène réduit l'internalisation des corps apoptotiques induite par la Stabiline2, ce qui suggère que cette voie est bien utilisée pour l'élimination (S. Park et al. 2008).

Le rôle de ABCA1/ABCA7 (CED-7) reste mal décrit surtout que ces protéines sont nécessaires pour les phagocytes mais aussi pour les corps apoptotiques (Wu et Horvitz 1998b). Le modèle établi suggère un rôle du transporteur ABC qui serait responsable de l'externalisation de la phosphatidylsérine à la surface des corps apoptotiques (Marguet et al. 1999) et qui serait reconnu par le complexe Calréticuline/CD91 ou par la Stabiline2 à la surface du phagocyte. Le signal de reconnaissance est ensuite transduit par la protéine adaptatrice GULP qui interagit directement avec la partie cytoplasmique des récepteurs de surface CD91 (Su et al. 2002) ou la Stabiline2 (S. Park et al. 2008) pour promouvoir l'activation de Rac1 et le réarrangement du réseau d'actine d'une façon encore inconnue. D'une manière intéressante, les transporteurs ABC jouent un rôle dans le transport du cholestérol et la maintenance des sous-domaines lipidiques sur la membrane ce qui lui permet de jouer un rôle dans l'homéostasie du cholestérol chez les phagocytes pendant l'internalisation des corps apoptotiques (Kiss et al. 2006; Landry et al. 2006) (Figure 1).

b) La voie DOCK180/ELMO (CED-5/CED-12)

Les protéines impliquées dans cette voie chez les nématodes sont CED-2, CED-5, CED-12 et CED-10, Leurs orthologues sont CrKII, DOCK180, ELMO et Rac1 chez les mammifères ainsi que DCrk, Myoblast city et DCed-12 et DRac respectivement chez la drosophile. Ces protéines sont impliquées de façon plus générale dans plusieurs fonctions actine-dépendantes et responsables de réarrangements du cytosquelette impliqués dans la migration, le développement des neurones, la fusion musculaire ou encore la phagocytose des corps apoptotiques (Nagata, Hanayama, et Kawane 2010). Les membres de la famille DOCK sont des facteurs d'échange de Guanine (GEF) atypiques pour les petites protéines G monomériques de la famille Rho/Rac/Cdc42. Ils sont en effet dépourvus des domaines DH

(Dbl Homology ou RhoGEF) et PH (Pleckstrin Homology) des GEF classiques nécessaires pour l'échange GTP/GDP (Brugnera et al. 2002). Les protéines DOCK de la sous famille de DOCK180 agissent en complexe avec ELMO afin de réaliser une activité GEF sur Rac. Dans le complexe, la structure binaire (DH/PH) pourrait être reconstituée par la complémentarité du domaine PH d'ELMO et du domaine portant l'activité GEF (ou DHR2) de DOCK180, équivalent fonctionnel du domaine DH (Brugnera et al. 2002; Côté et Vuori 2002). Le mécanisme de régulation du complexe ELMO/DOCK180 ainsi que son recrutement à la membrane est pour l'instant mal compris. L'interaction de DOCK180 avec la protéine adaptatrice CrkII dans le modèle du nématode *C. elegans*, est décrite comme un mécanisme majoritaire pour le recrutement du complexe à la membrane (Gumienny et al. 2001), cependant la surexpression de DOCK180 et de CrkII dans des cellules de mammifères montrent que l'interaction directe entre ces deux protéines n'est pas nécessaire pour l'internalisation ou la migration cellulaire. Les différents mécanismes de recrutement du complexe permettant de le positionner auprès de la GTPase Rac afin de l'activer seront décrits ultérieurement.

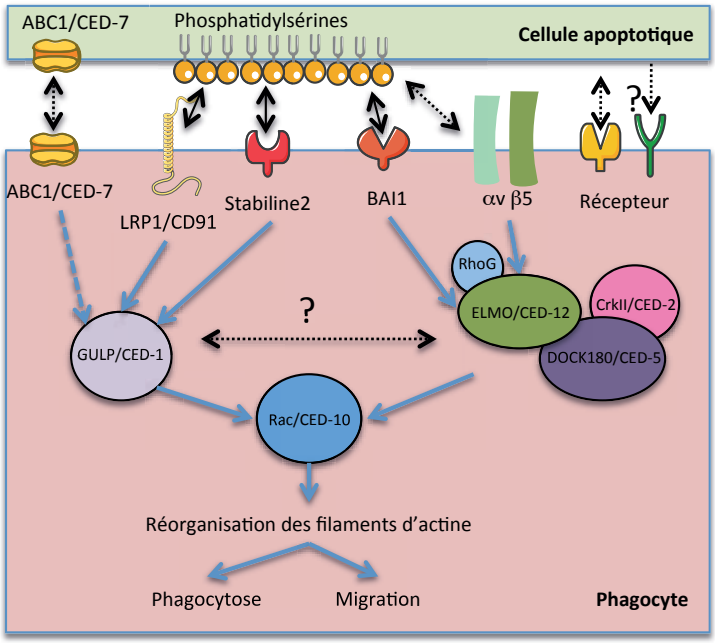


Figure 1. Schéma des voies de signalisation
Représentation des protéines des deux voies impliquées dans l'activation de la GTPase Rac au cours de la phagocytose. Les cellules en apoptose présentent à leur surface des signaux « eat-me » comme la phosphatidylsérine qui est reconnue directement, ou à l'aide de molécules pontantes (non représentées), par des récepteurs exprimés à la surface des phagocytes. Cette reconnaissance est suivie d'une activation de la voie GULP ou de la voie ELMO/DOCK180 selon les récepteurs engagés. Les deux voies aboutissent à l'activation de la GTPase Rac et à la réorganisation des filaments d'actine. Les nomenclatures des principales protéines de mammifères et leurs orthologues du cluster CED (C. Elegans Death genes) chez C. Elegans sont également indiqués.

L'implication de deux voies différentes dans l'activation de Rac serait un mécanisme cellulaire qui assure une phagocytose plus efficace. En effet l'interaction entre la Stabiline2, inducteur de la voie GULP, et l'intégrine $\alpha v\beta 5$ qui active la voie ELMO/DOCK180 suggère un mécanisme de coopération entre les différents signaux de reconnaissance pour favoriser l'ingestion des cellules apoptotiques (Kim et al. 2012).

3. Les Rho GTPases: leurs origines et leurs fonctions

a) Les GTPases

Quand les cellules reçoivent un signal extracellulaire, elles activent des voies de signalisation particulières afin de générer les réponses cellulaires adéquates. L'une des familles de protéines qui orchestre ces réponses sont les GTPases.

Les GTPases sont des molécules d'échange qui oscillent entre deux états conformationnels différents (Figure 5). Liées au GTP, elles sont sous une forme capable de transduire le signal, une fois le GTP hydrolysé elles passent sous une forme inactivée. Sous leur forme liée au GTP, elles interagissent avec des protéines cibles (effectrices) ce qui permet la transduction des signaux intracellulaires. La régulation des GTPases est décrite plus en détail dans la suite de ce chapitre.

b) Les Rho GTPases

Les membres des Rho GTPases sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. Leurs rôles dépassent la régulation simple du cytosquelette d'actine et de l'adhésion cellulaire qui sont au centre de mon travail, et s'étendent à la régulation de la polarité cellulaire, de l'endocytose, ou encore du transport des vésicules et le cycle cellulaire (Etienne-Manneville et Hall 2002). Cette famille de petite GTPases monomériques est composée de 20 protéines regroupées en 5 sous-familles en fonction de leurs séquences primaires et leurs fonctions connues. On trouve les GTPases des familles Rho (Rho-like), Rac (Rac-like), et Cdc42 (Cdc42-like), mais aussi les sous-familles Rnd ainsi que les RhoBTB (Figure 2).

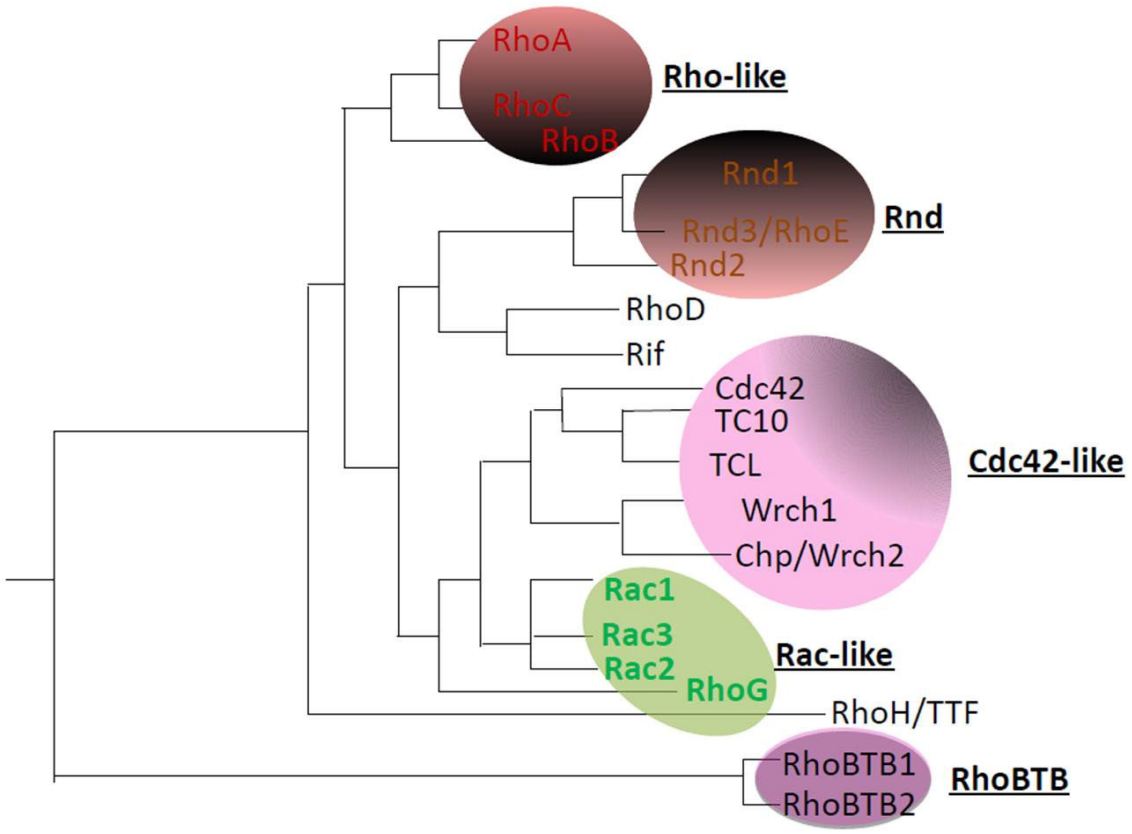


Figure 2. Protéines de la famille Rho
Représentation phylogénétique de la famille Rho (d'après(Burridge et Wennerberg 2004). La famille Rho est formée de cinq sous-familles : Rho-like, Rnd, Cdc42-like, Rac-like,et RhoBTB. Les membres de ces sous-familles et leur proximité phylogénétique sont également soulignés.

Les caractéristiques des membres de la famille Rho et Rac sont développées dans la section suivante.

(1) La sous-famille Rho

La sous-famille Rho comprend 3 membres: RhoA, RhoB et RhoC, elles présentent 85% d'homologie mais possèdent des activités cellulaires différentes. Contrairement à RhoB, RhoA et RhoC promeuvent la croissance cellulaire (Du, Lebowitz, et Prendergast 1999; Z. Chen et al. 2000). RhoB est une molécule de courte durée de vie qui est surexprimée pendant la transition G1/S du cycle cellulaire et pendant l'apoptose (Zalcman et al. 1995; A. X. Liu et al. 2000). RhoA est connue pour orchestrer la contraction des filaments d'actine ainsi que l'adhésion des cellules qui migrent. RhoC est lié à la migration et au pouvoir métastasique des cellules tumorales. Les différentes voies de signalisation orchestrées par la famille Rho sont représentées dans la figure 3.

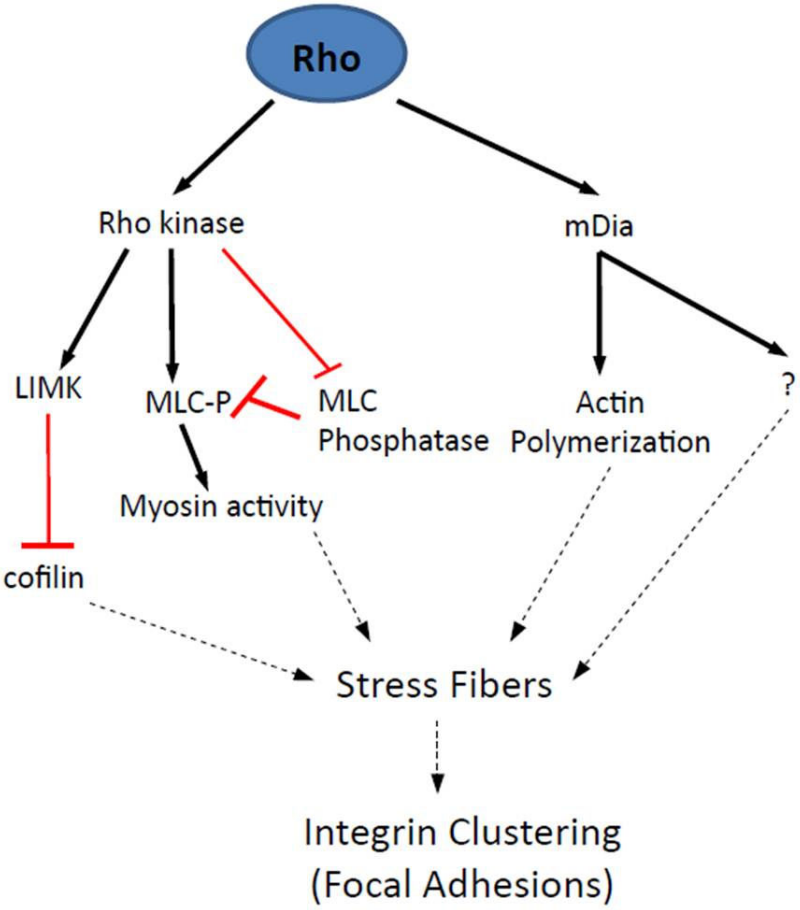


Figure 3. Schéma des voies dépendantes de Rho
Voies de signalisations orchestrées par Rho afin de réguler le cytosquelette d'actine (figure extraite de (Burridge et Wennerberg 2004). La GTPase Rho agit à travers deux effecteurs i) la Rho-kinase et ii) mDia qui activent des voies de signalisation menant à la formation des fibres de stress et aux adhésions focales.

(2) La sous-famille Rac

Cette famille est formée par Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG. Rac1 et RhoG sont ubiquitaires alors que l'expression de Rac2 et Rac3 est restreinte aux cellules neuronales et hématopoïétiques. RhoG peut interagir avec quelques effecteurs de Rac (Wennerberg et al. 2002) et joue un rôle dans l'activation de Rac1 et de Cdc42 (Gauthier-Rouviere et al. 1998). RhoG est décrite comme étant un partenaire d'ELMO qui permet la translocation du complexe ELMO/DOCK180 afin que ce dernier puisse activer la petite GTPase Rac (*Cf*. I-B 2: Recrutement du complexe à la membrane). Cette sous-famille stimule la formation des lamellipodes (Ridley 2006). Plusieurs voies orchestrées par Rac sont impliquées dans cette fonction.

Parmi ces voies, j'ai choisi de développer dans la suite de ce paragraphe plus particulièrement celles qui ont un intérêt particulier dans mon travail expérimental. Les autres voies sont résumées dans la figure 4.

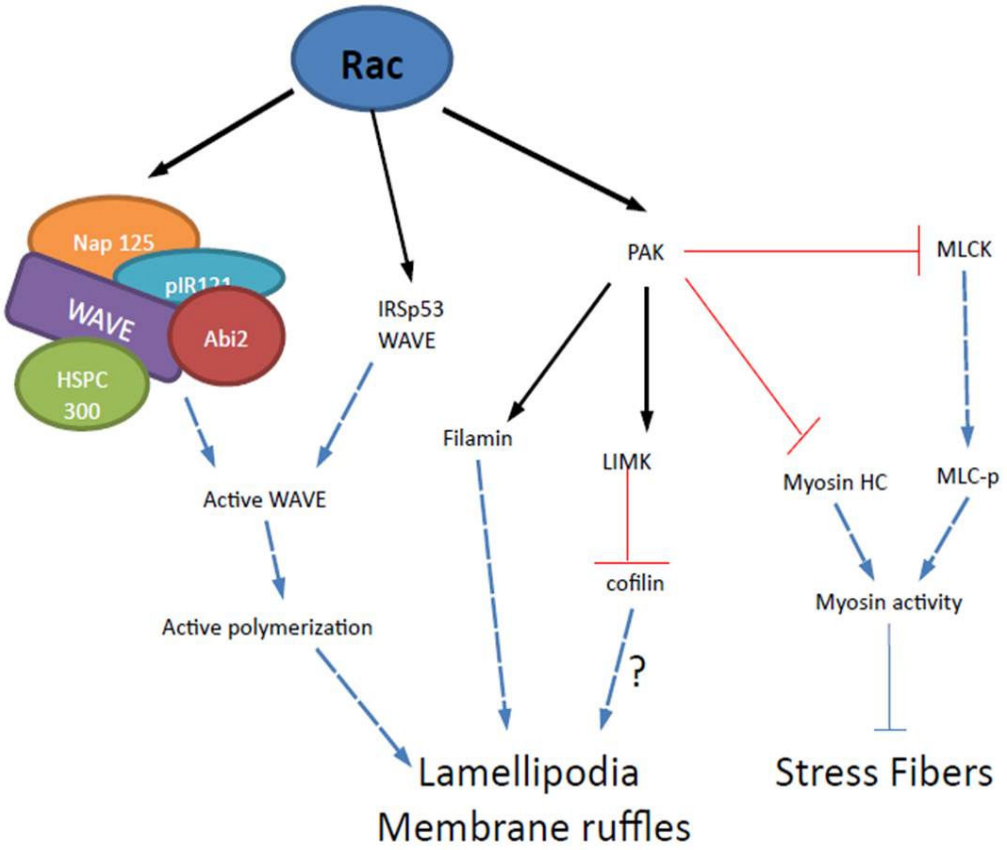


Figure 4. Schéma des voies dépendantes de Rac
Voies de signalisation orchestrées par Rac pour moduler le cytosquelette d'actine (figure extraite de (Burridge et Wennerberg 2004). Représentation des principaux acteurs impliqués dans les voies de signalisation orchestrées par la petite GTPase Rac pour la formation des lamellipodes et la perte des fibres de stress.

La petite GTPase Rac induit en particulier la polymérisation de l'actine en activant Arp2/3 qui joue un rôle dans la nucléation de l'actine. Cette activation dépend de la protéine WAVE/SCAR qui appartient à la famille de WASP (Miki, Suetsugu, et Takenawa 1998; Goley et Welch 2006). Contrairement à Cdc42 qui interagit directement avec WASP pour activer Arp2/3, WAVE/SCAR n'interagit pas directement avec la petite GTPase. Il a en effet été décrit que l'interaction entre Rac et WAVE/SCAR pourrait être médiée par IRSp53, cependant cette dernière interagit de préférence avec Cdc42 liée au GTP ce qui laisse supposer qu'elle est plus impliquée dans les voies régulées par Cdc42 (Krugmann et al. 2001; Govind et al. 2001). D'autre part, WAVE se trouve dans les cellules sous forme d'un complexe inactif, il interagit

avec Nap125, PIR121, HSPC300 et Abi2 (Eden et al. 2002). C'est l'interaction de Rac avec ce complexe qui va le dissocier ce qui permet à WAVE/HSPC300 d'activer Arp2/3 (Eden et al. 2002). Il en est de même pour la protéine adaptatrice Nck qui interagit avec Nap125, ce qui permet également la dissociation du complexe et l'activation de WAVE.

Rac joue aussi un rôle dans l'adhésion cellulaire. Une fois activée, elle induit une réorganisation du cytosquelette d'actine et une agglomération des intégrines qui interagissent avec la matrice extracellulaire (D'Souza-Schorey, Boettner, et Van Aelst 1998).

(3) Régulation des GTPases

L'activité des GTPases est régulée:

i. Par des activateurs nommés GEFs (guanine-nucelotide exchange factors) qui favorisent la forme libre de la GTPase permettant l'échange entre le GTP et le GDP.

ii. Par des inactivateurs nommés GAP (GTPase activating proteins) qui se fixent aux GTPases et favorisent l'hydrolyse du GTP, ce qui rend ces dernières inactives.

iii. Par des inhibiteurs nommés GDI (G-nucleotide dissociation inhibitors) qui maintiennent les protéines G dans un état inactif. Les GDI sont des régulateurs spécifiques des GTPases monomériques Rho/Rac et Rab. Elles se lient aux GTPases liés au GTP ou au GDP et empêchent la dissociation du nucléotide (Figure 5).

L'activation de la GTPase (activation de l'hydrolyse du GTP) sous le contrôle de protéines «GAP» (GTPase Activating Protein) inhibe la transduction. Les GTPases liées au GDP peuvent être rechargées en GTP par échange sous le contrôle des protéines «GEF» (Guanine Exchange Factor) qui sont donc des activateurs des fonctions des GTPases dans la transduction.

Les GEFs responsables de l'activation des Rho-GTPases ont été toujours caractérisées par la présence de deux domaines conservés «Dbl homology DH/Pleckstrin homology PH domains», cependant une autre famille de Rho GEF a été identifiée comme dépourvue des domaines DH/PH. Cette famille possède un domaine GEF qui ne présente aucune homologie avec les domaines GEF classiques des Rho-GTPases, c'est la famille DOCK (ci-dessous).

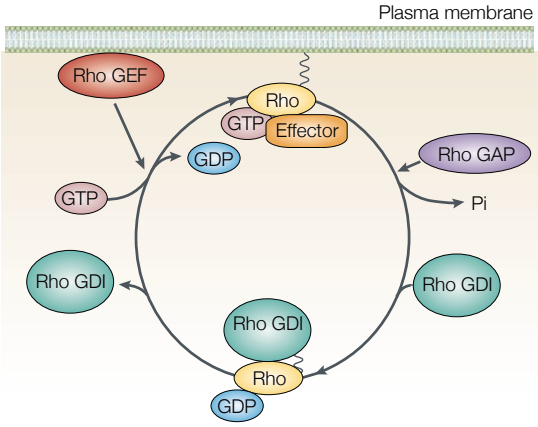


Figure 5. Régulation des GTPases par les GEF, GAP et GDI
Les GTPases Rho existent sous deux formes, une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Le passage de l'une à l'autre de ces formes est régulé par deux classes de protéines, les GEFs et les GAPs. Les GEFs sont des protéines qui catalysent l'échange du GDP par le GTP, favorisant le passage vers la forme activée de la GTPase. Les GAPs sont des protéines qui augmentent l'activité GTPasique, favorisant la forme inactive de la GTPase. En outre, une autre classe de régulateur intervient en marge du cycle GDP/GTP, les GDIs, ce sont des protéines qui séquestrent les GTPases sous forme liée au GDP dans le cytosol (Fukata et Kaibuchi 2001).

L'un des membres de cette famille nous intéresse particulièrement, DOCK180 (CED-5), puisqu'il a été identifié chez les vers comme un facteur d'échange de Rac 1, qui joue un rôle important dans la phagocytose.

4. La famille DOCK: Dedicator of cytokinesis

Les protéines DOCK, GEF atypiques pour les RhoGTPases, appartiennent à une super famille contenant 11 membres chez les mammifères (Figure 6). Elles sont classées en 4 sous-familles: DOCK-A,-B,-C et-D, selon leurs homologies de séquence et la présence de différents domaines spécifiques. Ces familles possèdent toutes en communs deux domaines spécifiques, DHR1 et DHR2 (DHR, pour Dock Homology Region), et se distinguent par la spécificité d'autres domaines. Les familles A et B sont proches et caractérisées par la présence du côté N-terminal d'un domaine SH3 capable d'interagir avec les protéines ELMO. Elles possèdent également un segment polyproline C-terminal qui interagit avec des domaines SH3 spécifiques, par exemple pour DOCK180, l'archétype de la famille DOCK-A, ce segment est spécifique de l'interaction avec le domaine SH3 de CrkII. La famille C ne possède, parmi les domaines conservés, que les domaines DHR1 et DHR2, la famille D possède un domaine PH dont la fonction est encore inconnue.

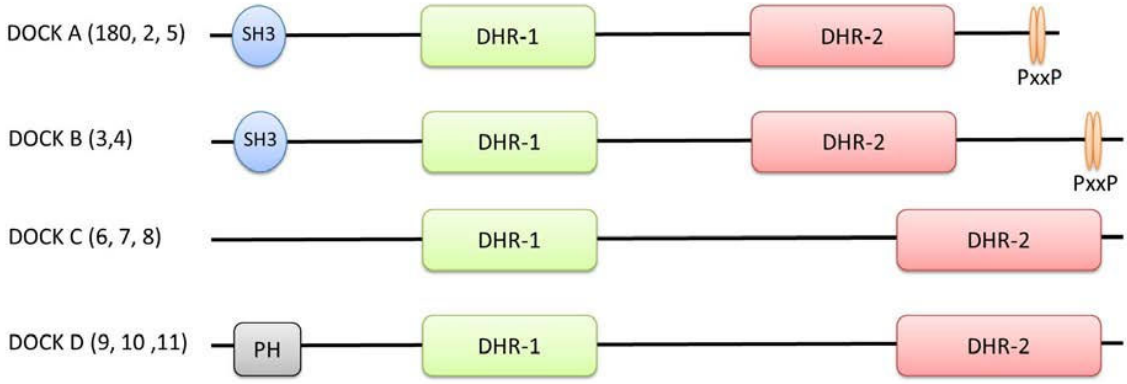


Figure 6. Schéma des membres de la famille DOCK
Représentation des domaines particuliers des protéines de la famille DOCK. Sont représentés les membres des sous-famille A (DOCK180, 2 et 5) ; sous-famille B (DOCK3 et 4) ; sous-famille C (DOCK6, 7 et 8) ; et sous-famille D (DOCK9, 10 et 11). Les membres de la famille DOCK possèdent un domaine DHR1 pour la relocalisation à la membrane et DHR2 pour la fonction GEF. Chez les membres des familles A et B, on trouve un domaine SH3 responsable de l'interaction avec ELMO ainsi que des motifs polyprolines pour le recrutement de l'adaptateur CrkII. On note la présence d'un domaine PH en N-terminal des membres de la sous-famille D.

a) La sous-famille A : DOCK1, DOCK2 et DOCK5

(1) DOCK1 ou DOCK180

Initialement, DOCK180 a été identifiée comme étant une protéine de 180kDa qui interagit avec le proto-oncogène *c-crk* (p38, Crk ou CrkII) et dont la présence est en relation avec des changements du cytosquelette d'actine dans les fonctions cellulaires comme la phagocytose et la migration (Hasegawa et al. 1996). Des études plus approfondies ont mis en évidence son activité GEF (Brugnera et al. 2002). Son orthologue chez la drosophile appelée «Myoblast city» est impliquée dans la fusion du myoblaste et la fermeture dorsale, ses fonctions sont accomplies par l'orthologue de Rac1 chez la drosophile (Nolan et al. 1998). Son orthologue chez *C. elegans*, CED-5, est impliqué dans l'internalisation des corps apoptotiques et la migration cellulaire suite à son interaction avec CED-10, orthologue de Rac (Reddien et Horvitz 2000).

DOCK180 est ubiquitaire et spécifique de Rac1. Lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules en culture avec ELMO, DOCK180 induit la formation de lamellipodes, augmente l'étalement et la migration cellulaire (Brugnera et al. 2002; Grimsley et al. 2004; Côté et al. 2005; D. Park et al. 2007; Sanders, Ampasala, et Basson 2009). Par exemple dans les neurites, DOCK180

forme un complexe ternaire avec RhoG, CrkII et ELMO afin d'activer Rac ce qui favorise l'étalement cellulaire par les intégrines ainsi que la croissance par le facteur NGF (Katoh et Negishi 2003). Malgré l'expression ubiquitaire de DOCK180 ainsi que son rôle important dans le mouvement cellulaire, il est notablement absent des leucocytes (Nishihara et al. 1999).

(2) DOCK2

DOCK2 présente 59% d'identité avec DOCK180, elle est exprimée spécifiquement par les cellules hématopoïétiques, et particulièrement par les leucocytes. DOCK2 est impliquée dans le développement, l'activation et la migration des lymphocytes. La littérature mentionne que la chimiotaxie des lymphocytes est déclenchée par DOCK2 après engagement des récepteurs des chemokines CXCR4, CXCR5 et CCR7 (Reif et Cyster 2002). DOCK2 peut interagir et jouer un rôle de facteur d'échange potentiel avec Rac1 et Rac2 (Nishihara et al. 1999).

(3) DOCK5

DOCK5 est une GEF de Rac et plus spécifiquement de Rac1. DOCK5 possède une séquence riche en résidus prolines à son extrémité C-terminale mais qui diffère de celle de DOCK180, elle n'interagit pas avec le domaine SH3 de CrkII (Hasegawa et al. 1996; Matsuda et al. 1996). DOCK5 joue un rôle important dans la différentiation des ostéoclastes (Brazier et al. 2006) ainsi que la fusion des myoblastes chez la souris (Laurin et al. 2008). La déplétion de DOCK5 comme de DOCK180 inhibe l'étalement et la migration cellulaire (Sanders, Ampasala, et Basson 2009).

b) La sous-famille B : DOCK3 et DOCK4

DOCK3 et DOCK4 sont spécifiques des cellules neuronales. DOCK3 participe à la croissance des axones et l'adhésion des cellules neuronales (Namekata et al. 2004; Q. Chen, Kimura, et Schubert 2002). La surexpression de DOCK4 et d'ELMO2 favorise la croissance des cellules dendritiques à travers l'activation de la GTPase Rac.

c) *La sous-famille C : DOCK6, DOCK7, et DOCK8*

La sous-famille C présente une double spécificité pour Rac et Cdc42. DOCK6 et DOCK7 semblent spécifiques des cellules neuronales. DOCK6 est impliquée dans le développement neuronal, DOCK7 joue un rôle dans la formation des axones dans les neurones de l'hippocampe (Watabe-Uchida et al. 2006). De plus, elle joue un rôle dans la stabilisation des microtubules en participant à la phosphorylation de la Stathmine (également appelée OP18) ce qui inactive cette protéine et l'empêche de déstabiliser les microtubules (Miyamoto et Yamauchi 2010) . DOCK8 est surtout exprimée dans les cellules du système immunitaire et en particulier les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T. DOCK8 joue un rôle dans la production d'anticorps par les lymphocytes B (Su 2010; Jabara et al. 2012), la survie des lymphocytes T (Randall et al. 2011) et la migration des cellules dendritiques (Anon et al. 2012).

d) *La sous-famille D : DOCK9, DOCK10, et DOCK11*

Cette famille est spécifique de Cdc42. Ses membres possèdent notablement un domaine PH N-terminal. DOCK9 a été identifiée comme étant la Zizimine1 (Meller et al. 2002) qui joue un rôle dans la croissance dendritique des neurones de l'hippocampe en culture (Kuramoto, Negishi, et Katoh 2009). Les domaines PH et DHR1 de DOCK9 sont responsables de sa localisation membranaire qui est nécessaire pour la régulation de la croissance dendritique (Miyamoto et Yamauchi 2010).

La fonction de DOCK10 est inconnue mais son expression peut être induite à l'activation des lymphocytes B par l'interleukine 4 (Yelo et al. 2008). Pour DOCK11, nous ne disposons que de peu d'information. On sait qu'elle est exprimée par les lymphocytes (Nishikimi et al. 2005), et il a été montré que son expression décline avec le vieillissement (Jia et al. 2012).

5. Les domaines fonctionnels de la famille DOCK

Les protéines DOCK sont de grands polypeptides de 1800 à 3100 acides aminés. Comme mentionné plus haut, elles sont composées de plusieurs domaines qui sont spécifiques et conservés parmi les familles. Les fonctions ainsi que les mécanismes de régulation de ces différents domaines sont largement étudiés. Les paragraphes suivants présentent leurs principales propriétés décrites dans la littérature.

a) Le domaine DHR1

Le domaine DHR1, d'environ 200 acides aminés, est situé en amont du domaine DHR2 chez tous les membres de la famille DOCK. Le domaine DHR1 de DOCK180 présente une faible homologie avec la famille de domaines C2, qui interagissent avec les phospholipides d'une manière dépendante ou indépendante du calcium (Merithew et Lambright 2002). Il a été montré que le domaine DHR1 de DOCK180 interagit spécifiquement avec les phosphatidyl Inositol phosphorylés PtdIns(3,5)P2 (PIP2) et PtdIns(3,4,5)P3 (PIP3) d'une façon calcium indépendante (Côté et al. 2005). Ce domaine est nécessaire dans la translocation de DOCK180 à la membrane plasmique et ses fonctions dans la migration et l'élongation cellulaire. En parallèle, ce domaine ne joue aucun rôle dans la capacité de DOCK180 à activer Rac ou à se lier avec ELMO ou CrkII (Côté et al. 2005) . Le domaine DHR1, dont la structure a été résolue en 2010, révèle un repliement en sandwich β similaire à celui des domaines C2; il présente des insertions structurales non-triviales et une boucle qui formerait un site de fixation des phospholipides. Confirmé par des expériences de mutagenèse et de modélisation, ce site s'avère être différent du site de fixation qui est classiquement trouvé dans les domaines C2 (Premkumar et al. 2010).

b) Le domaine DHR2

Le domaine DHR2 est composé de 450 à 500 acides aminés. Il est plus large que les domaines DH des GEF classiques et ne présente aucune homologie avec ces DH. Le domaine DHR2 possède une activité GEF qui peut être spécifique de Rac (comme pour DOCK180 et DOCK2), ou de Cdc42 (comme pour DOCK9 et DOCK10), soit des deux (comme pour DOCK6 et DOCK7).

Le travail de Côté et collaborateurs (Côté et Vuori 2002) montre que DOCK180 se lie et active la petite GTPase Rac et que son domaine DHR2 est suffisant pour l'activation de la GTPase *in vivo* cependant les travaux de Brugnera et collaborateurs (Brugnera et al. 2002) montrent que dans certains modèles cellulaires l'interaction de DOCK180 avec son partenaire ELMO est nécessaire pour l'activation de Rac. Chez DOCK9, le domaine DHR2 joue un rôle dans l'oligomérisation de la protéine (Meller et al. 2004) ainsi que dans l'interaction

intramoléculaire entre son domaine N-terminal et son domaine C-terminal (Meller et al. 2008) .

Le domaine DHR2 présente une architecture différente des domaines DH retrouvés chez les Rho-GEF classiques. Il est constitué de 3 lobes de taille équivalente qui possèdent un repliement unique à la famille DOCK; le site de fixation de la petite protéine G et d'échange du nucléotide étant formé par 2 des 3 lobes. En plus, les protéines DOCK utilisent un mécanisme différent des Rho-GEF pour permettre le relargage du GDP de la poche catalytique de la GTPase (Kulkarni et al. 2011).

c) Le domaine SH3

Le domaine SH3 (Src Homology 3), d'environ 60 acides aminés, est présent dans les sous-familles A et B. Il est connu pour interagir avec les motifs polyprolines et est impliqué dans plusieurs voies de signalisation.

Le domaine SH3 de DOCK180 est spécifique de l'interaction avec le domaine polyproline d'ELMO mais cette interaction n'est pas suffisante pour la formation du complexe. Il existe un second site d'interaction entre les domaines hélicaux situés en aval du domaine SH3 de DOCK180 et autour du domaine PH d'ELMO. Cependant, des études fonctionnelles au niveau cellulaire montrent que l'interaction SH3/motif polyproline joue un rôle dans la phagocytose et la migration cellulaire (Komander et al. 2008) .

Bien que cette interaction n'ait pas été caractérisée, le domaine N-terminal de DOCK180 comprenant le SH3 et une centaine de résidus adjacents interagit avec le domaine DHR2 ce qui pourrait correspondre à une conformation de la protéine dans un état d'auto-inhibition (Lu et al. 2005).

d) Le motif polyproline (PxxP)

Ce motif polyproline se trouve chez les sous-familles A et B. Le motif PxxP de DOCK180 interagit avec le domaine SH3 de la protéine adaptatrice CrkII et favoriserait son recrutement à la membrane (Matsuda et al. 1996).

e) *Le domaine PH*

Le domaine PH (ou Pleckstrin Homology) est caractéristique de la sous-famille D. Le domaine PH de DOCK9 interagit avec les phospholipides incluant le PtdIns(3,4) P2 et la phosphatidylsérine (Meller et al. 2008) ce qui peut suggérer que les domaines PH de la sous-famille D peuvent être impliqués dans la translocation de la protéine à la membrane.

6. La famille ELMO

CED-12 (orthologue d'ELMO) est identifiée chez *C.elegans* comme étant un élément de la cascade de signalisation impliquant CED-2 (orthologue de c-Crk) et CED-5 (orthologue de DOCK180), qui contrôlent l'activité de CED-10 (orthologue de Rac) dans la migration et la phagocytose des corps apoptotiques. Trois membres de la famille d'ELMO ont été identifiés chez les mammifères: ELMO, ELMO2, et ELMO3. Les protéines ELMO et ELMO2 présentent une identité de séquence supérieure à 75 %, et peuvent être facilement interchangées (Sanui et al. 2003; Hanawa-Suetsugu et al. 2012). ELMO et ELMO2 interagissent avec DOCK180, DOCK2, DOCK3 et DOCK4 (Grimsley et al. 2004; Hiramoto, Negishi, et Katoh 2006). Le mécanisme d'interaction entre ELMO (Figure 7) et DOCK180 sera discuté ultérieurement.

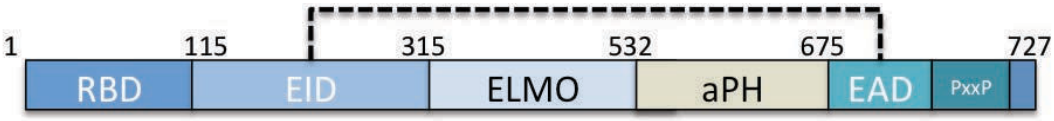


Figure 7. Schéma de la protéine ELMO
Les différents domaines de la protéine ELMO. RBD : Rho binding domain ; EID : ELMO inhibithory domain ; ELMO : domaine conservé; aPH : domaine d'homologie Pleckstrin étendu a son hélice α adajcente (532-555) ; EAD : ELMO autoregulatory domain ; PxxP : motif polyproline.

a) *Les domaines EID et EAD*

Ces 2 domaines ont été identifiés dans une étude qui visait à caractériser de nouveaux éléments structuraux d'ELMO ayant une influence sur la régulation de Rac. Les études bioinformatiques ont montré une homologie entre les domaines d'ELMO et ceux de la formine Dia1 (Diaphanous 1), une protéine impliquée dans la nucléation de l'actine et la formation de filaments constituant le cytosquelette d'actine. La famille Dia présente deux domaines DID (Diaphanous inhibitory domain) et DAD (Diaphanous Autoregulatory domain) qui possèdent une homologie respective avec les domaines EID (ELMO inhibitory domain)

localisés dans le domaine N-terminal et EAD (ELMO autoregulatory domain) qui correspond à l'hélice α localisée dans le domaine C-terminal. L'interaction entre ces deux segments est suggérée être à l'origine de l'auto-inhibition de ces protéines. De plus, la génération des mutants d'ELMO où l'auto-inhibition serait levée permet l'élongation cellulaire (Patel et al. 2010).

b) Le domaine RBD

Le domaine RBD ou RhoG binding domain est localisé du côté N-terminal de la protéine, il interagit avec la forme active de RhoG. Cette interaction jouerait d'une part un rôle dans l'activation d'ELMO en levant l'interaction entre EID et EAD (Patel et al. 2010) et d'autre part dans le recrutement du complexe ELMO/DOCK180 à la membrane. Ce domaine RBD interagit aussi avec BAI1, une protéine transmembranaire qui sert de récepteur pour la phopshatidylsérine et qui forme un complexe ternaire avec ELMO et DOCK180, et participe à l'activation du complexe (D. Park et al. 2007). RBD joue aussi un rôle dans le recrutement des protéines de la famille ERM (Erzine-Raxidine-Moesine) impliquées dans la régulation du cytosquelette (Grimsley et al. 2006).

c) Le domaine PH

Le domaine PH d'ELMO est décrit comme ayant un effet stabilisant sur le complexe formé entre le domaine DHR2 de DOCK180 et la GTPase Rac. Dans le complexe, le domaine PH n'interagit pas directement avec DOCK180, mais coopèrerait en trans à l'activité GEF du domaine DHR2 pour former un complexe tripartite DOCK180/Rac/ELMO qui stabiliserait l'interaction DOCK180/Rac (Lu et al. 2004).

Cependant, l'étude structurale de ce domaine a montré la présence d'une extension des hélices α qui sont impliquées dans l'interaction avec le domaine N-terminal de DOCK2 (Pour plus de détail, Figure 10). De plus, la structure de ce domaine PH ne ressemble pas à celle des domaines PH des Rho-GEF classiques mais plutôt à celle de certaines phospholipases comme PLCγ, cependant le domaine PH d'ELMO est incapable de se lier aux lipides (Komander et al. 2008).

d) Le domaine ELM

Un domaine ELMO (ou ELM) très conservé, spécifique aux protéines de la famille ELMO est retrouvé dans la région centrale. Aucune fonction n'est décrite pour ce domaine, cependant des domaines homologues ont été découverts au sein des protéines ELMOD1 et ELMOD2, activatrices (GAP) des GTPases Arf de la famille Ras (Bowzard et al. 2007).

e) Le motif polyproline

Ce motif est localisé dans le domaine C-terminal de la protéine. Comme décrit précédemment, il interagit avec le domaine SH3 de DOCK180. Le rôle de cette interaction dans le complexe ELMO/DOCK 180 sera développé ultérieurement.

B. ELMO et DOCK: un mécanisme complexe de régulation et de recrutement à la membrane

1. Le complexe ELMO/DOCK180

DOCK180 a été identifié comme étant une GEF atypique ne possédant pas les domaines Dbl-Homology (DH) et pleckstrin homology (PH), mais plutôt des domaines DHR1 et DHR2.

Il a été décrit que l'activité GEF de DOCK180 est assurée par son domaine DHR2, et que *in vitro* l'expression de DOCK180 ou de son domaine DHR2 est suffisante pour entraîner l'échange de GDP/GTP sur Rac1 (Côté et Vuori 2002; Côté et Vuori 2006). Pourtant, les études faites dans certains modèles cellulaires montrent que DOCK180 n'est catalytiquement actif envers Rac que lorsqu'il est en complexe avec ELMO (Brugnera et al. 2002). ELMO joue le rôle de régulateur de DOCK180. Des mutants de délétion de DOCK180 qui ne se lient pas à ELMO sont en effet incapables d'activer Rac (Grimsley et al. 2004).

Les données diverses obtenues sur les protéines ELMO et DOCK180 montrent que les mécanismes de recrutement et de régulation du couple ELMO/DOCK180 ainsi que ceux qui influencent son activité GEF sur Rac sont complexes.

Il existe 3 mécanismes possibles par lesquels ELMO régule l'activité de DOCK180:

1) l'interaction d'ELMO avec le domaine N-terminal de DOCK180 lève l'auto-inhibition de DOCK180 qui est due à l'interaction entre les domaines DHR2 et le domaine N-terminal comprenant le SH3 et les hélices adjacentes (Lu et al. 2005).

2) Le domaine PH d'ELMO stabilise l'interaction entre DOCK180 et Rac (Lu et al. 2004)

3) ELMO localise le complexe ELMO/DOCK180 sur la membrane via son interaction avec différents partenaires.

Ces différentes fonctions d'ELMO seront discutées dans les pages suivantes.

2. Recrutement du complexe à la membrane

a) Dépendant d'ELMO

(1) En interagissant avec RhoG

RhoG activé (par sa GEF Trio) interagit avec le domaine RBD localisé dans le domaine N-terminal d'ELMO. Il a été également montré que l'interaction du complexe ELMO/DOCK180 avec RhoG activé et localisé sur la membrane est nécessaire pour l'activation de Rac, et par la suite à l'étalement cellulaire (Katoh et Negishi 2003). De même, RhoG intervient dans le recrutement du complexe à la membrane lors de l'ingestion des billes de latex par des phagocytes (deBakker et al. 2004). Cependant, la délétion de RhoG dans des modèles murins ne conduit pas à des phénotypes particuliers (Vigorito et al. 2004).

D'une façon intéressante, il a été suggéré que RhoG peut jouer un rôle dans la régulation d'ELMO. Comme décrit auparavant, ELMO possède deux domaines d'homologie avec la protéine Dia1 de la sous-famille des formines qui sont des effecteurs de la petite GTPase RhoA. Dia 1 se trouve sous une forme auto-inhibée suite à l'interaction entre ses domaines DID et DAD, et c'est son interaction avec la petite protéine G qui l'active. En parallèle à ce modèle, il a été observé qu'ELMO pourrait être auto-inhibée par l'interaction intramoléculaire entre ses domaines EID et EAD et que la levée de cette inhibition augmente la motilité cellulaire. En plus, RhoG et EAD présentent une compétition dans l'interaction *in vitro* avec un fragment contenant les domaines EID et RBD, et au niveau fonctionnel des mutants d'ELMO ne possédant pas le domaine RBD sont incapables en présence de DOCK180 et de CrkII de promouvoir l'élongation cellulaire (Patel et al. 2010).

(2) En interagissant avec les membres de la famille Arf

Arl4A, petite GTPase qui fait partie de la famille Arf, interagit avec le domaine RBD d'ELMO et le localise sur la membrane. L'interaction d'Arl4A avec le complexe ELMO/DOCK180 promeut une réorganisation du cytosquelette dépendante de la voie ELMO/DOCK180/Rac

(Patel et al. 2011). Une autre GTPase de la même famille, Arf6, est connue pour l'activation de Rac. Arf6 et sa GEF ARNO sont capables de promouvoir le recrutement du complexe ELMO/DOCK180 vers la membrane, pourtant aucune interaction directe entre Arf6 ou ARNO et le complexe ELMO/DOCK180 n'a été montré (Santy, Ravichandran, et Casanova 2005). Arl4A induit le remodelage du cytosquelette d'actine d'une manière indépendante de la voie ARNO-Arf6 alors que d'autres variant de Arl4 sont décrits comme étant capables de se lier à ARNO et la localiser pour l'activation d'Arf6 (Patel et al. 2011).

(3) En interagissant avec BAI1

Ce récepteur de la phosphatidylsérine a été identifié chez *C.elegans* dans la même voie que CED-2, CED-5 et CED-12 lors de la phagocytose des cellules apoptotiques (Wang X et al, 2003). Chez les mammifères, le récepteur BAI1 (Brain specific Angiogenesis Inhibitor 1), une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), reconnaît la phosphatidylsérine grâce à son domaine Thrombonspondine et interagit avec la région N-terminale d'ELMO grâce à sa partie cytoplasmique. BAI1 forme un complexe ternaire avec ELMO et DOCK180. Ce complexe favorise l'internalisation des cellules apoptotiques (D. Park et al. 2007). Récemment, il a été montré dans le modèle murin des cellules C2C12 que BAI1 joue également un rôle dans la fusion des myoblastes à travers la même voie ELMO/DOCK180/Rac1 (Hochreiter-Hufford et Ravichandran 2013).

b) Dépendant de DOCK180

(1) En interagissant avec CrkII

DOCK180 possède dans son domaine C-terminal un motif polyproline spécifique de l'interaction avec CrkII, les études préliminaires suggèrent que l'interaction du complexe ELMO/DOCK180 avec CrkII est un mécanisme majoritaire pour le recrutement du complexe à la membrane mais la découverte des domaines d'ELMO et de DOCK180 pouvant interagir avec la membrane limite cet effet. CrkII forme un complexe ternaire avec ELMO et DOCK180 mais cette interaction ne semble pas nécessaire pour une phagocytose efficace (Tosello-Trampont et al. 2007). Le recrutement du complexe pourrait être sous la dépendance de la réponse synergique de la kinase Mer et de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$. En réponse à la liaison de la PS, Mer phosporyle FAK et permet le recrutement et l'activation du complexe $p130^{cas}$/CrkII/DOCK180 qui active à son tour Rac1 (Lu et al. 2005).

(2) En interagissant avec la famille ERM

Les protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) sont associées à la mobilité cellulaire, la formation des microvillosités, des ondulations de la membrane et des sites d'adhésion (Bretscher, Edwards, et Fehon 2002).

Les protéines de la famille ERM interagissent avec la partie N-terminale d'ELMO. ELMO interagit avec la protéine Radixine et en même temps avec DOCK180 sans altérer l'activation de Rac en aval du complexe ELMO/DOCK180. De plus, ELMO forme un complexe avec la Radixine et RhoG malgré le fait que leurs sites d'interaction se chevauchent (Grimsley et al. 2006).

(3) En interagissant avec les phospholipides

DOCK180 peut être recrutée à la membrane par interaction de son domaine DHR1 sur les PtdIns (3, 4,5) P_3. Le remplacement de DHR1 par un domaine PH canonique d'adressage aux phospholipides dans une chimère DOCK180 permet de restaurer les fonctions de DOCK180 dans l'élongation et la migration cellulaire (Côté et al. 2005), et met en avant le rôle de ce recrutement dans l'activation de DOCK180.

(4) Dimérisation de DOCK

DOCK9 est la première protéine de la famille DOCK décrite comme pouvant former un dimère. La dimérisation a lieu suite à l'interaction entre les domaines DHR2 de chaque protéine. Ces domaines DHR2 fixent également chacun une molécule de cdc42 (Meller et al. 2004). Plus récemment il a été montré que DOCK180 se trouve sous forme de dimères *in cellulo* mais la conséquence fonctionnelle de cette dimérisation n'est pas encore décrite. Une publication récente de J.F Côté et de son équipe montre que DOCK5 et DOCK180 peuvent être co-immunoprécipités à partir d'extraits cellulaires ce qui suggère la formation d'un hétérodimère entre ces deux protéines. Les auteurs suggèrent que la capacité des protéines DOCK5 et DOCK180 à former différents complexes entre eux et avec ELMO peut conduire à un activation localisée de la GTPase Rac et de la reconstruction du cytosquelette d'actine dans les cellules (Patel, Pelletier, et Côté 2011).

3. ELMO régule DOCK180?

a) En empêchant son auto-inhibition?

DOCK180 est auto-inhibée par l'interaction entre ses domaines DHR2 et le domaine N-terminal comprenant le domaine SH3 et les hélices adjacentes (Lu et al. 2005). Cette interaction empêche DHR2 d'exercer son activité GEF sur Rac. La surexpression des mutants de délétion de DOCK180 pour le domaine SH3 aboutit à une augmentation de l'ordre de 1,5 fois dans l'activation de Rac par rapport à la forme sauvage (Patel et al. 2010). L'interaction du domaine C-terminal d'ELMO avec le domaine SH3 de DOCK180 libère le domaine DHR2 qui sera plus accessible pour Rac ce qui permet son activation. Il faut noter que l'interaction d'ELMO avec DOCK180 implique elle aussi le domaine N-terminal de DOCK180 et les hélices adjacentes (Komander et al. 2008).

b) Par protection contre l'ubiquitinylation

Il a été observé que DOCK180 est plus stable une fois co-exprimée avec ELMO, et que DOCK180 endogène est dégradée rapidement si l'expression d'ELMO est inhibée. En fait, DOCK180 est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome mais il apparait que sa dégradation peut être bloquée en partie quand elle interagit avec ELMO. L'une des hypothèses envisagée est qu'ELMO protège DOCK180 de la dégradation par le protéasome ce qui peut expliquer l'augmentation de l'activité GEF de DOCK180 sur Rac1 une fois exprimée avec ELMO (Makino et al. 2006).

c) Phosphorylation de DOCK180 et d'ELMO

DOCK180 peut être phosphorylée sur des résidus sérine suite à la stimulation de l'intégrine αvβ5. DOCK180 fait partie de la cascade de signalisation intégrine $p130^{cas}$. L'intégrine recrute $p130^{cas}$ à la membrane après sa phosphorylation et se lie à CrkII. DOCK180 interagit avec le complexe $p130^{cas}$/CrkII et se trouve alors recrutée à la membrane et phosphorylée (Kiyokawa et al. 1998). Le complexe ternaire $p130^{cas}$/CrkII/DOCK180 est concentré dans les points d'adhésions focales. Il est important de noter que l'inhibition de la phosphorylation de $p130^{cas}$ inhibe la phosphorylation de DOCK180 (Kiyokawa et al. 1998).
ELMO est également une cible de phosphorylation par la tyrosine kinase Hck (Yokoyama et al. 2005). Le rôle de cette phosphorylation sera discuté en détail ultérieurement.

4. Complexe ELMO et DOCK180: modèle d'activation et de régulation

L'ensemble des données recueillies aujourd'hui permet de suggérer le modèle suivant: en absence d'activation, ELMO se trouve sous une forme auto-inhibée due à l'interaction entre ses domaines EID et EAD; DOCK180 présente également une forme auto-inhibée par l'interaction entre le domaine N-terminal comprenant le SH3 et le domaine actif DHR2.

L'interaction d'ELMO avec différents partenaires dont certains d'eux peuvent jouer le rôle de recruteurs vers la membrane (comme BAI1, RhoG, ou encore Hck) l'active et permet par la suite son interaction avec DOCK180.

ELMO interagit avec DOCK180 par l'intermédiaire du domaine SH3 de DOCK180 et du motif PxxP d'ELMO, mais implique également les régions adjacentes des domaines SH3 de DOCK180 et du domaine PH d'ELMO. DOCK180 en complexe avec ELMO présenterait ainsi un domaine DHR2 accessible, ce qui lui permettrait d'exercer son activité GEF sur Rac1 (Figure 8).

Malgré le fait que l'interaction SH3/PxxP n'est pas indispensable à la formation du complexe ELMO/DOCK180, les travaux réalisés par Marion Sévajol au laboratoire et publiés en 2012 ont établi qu'elle le stabilise en augmentant sa demi-vie (Sévajol et al. 2012).

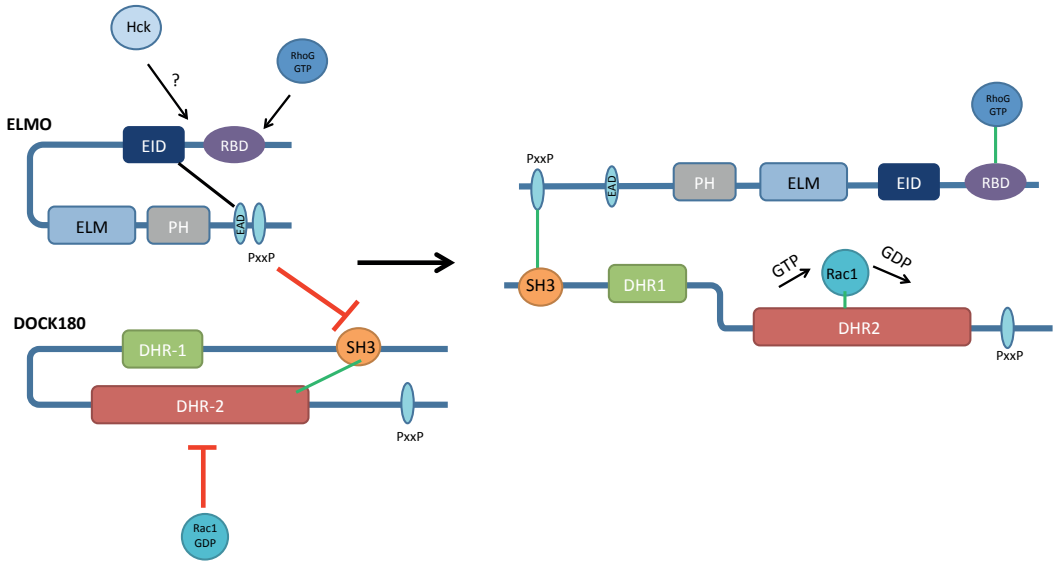


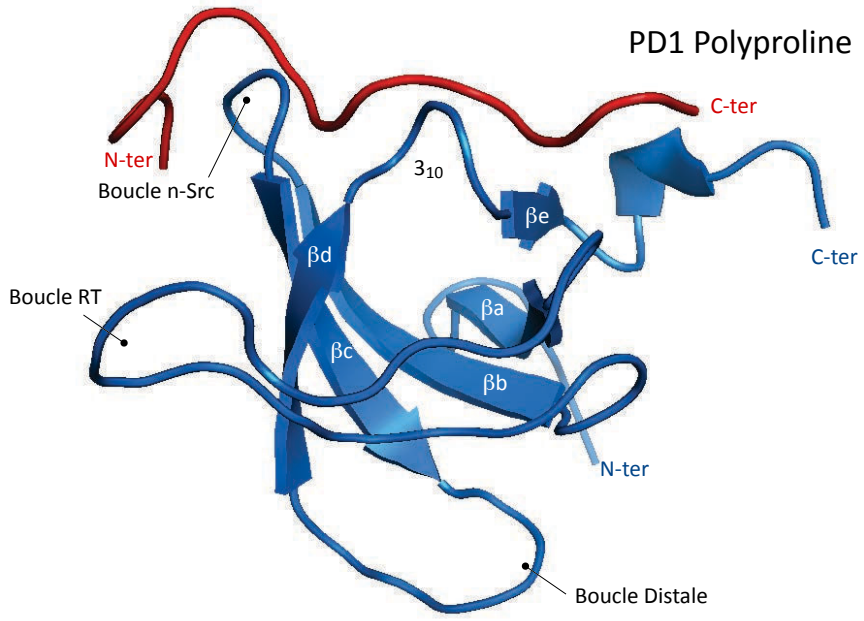
Figure 8. Schéma de l'interaction fonctionnelle d'ELMO et DOCK180
Représentation du modèle actuel proposé sur l'interaction entre ELMO et DOCK180. A l'état latent, ELMO et DOCK180 sont autoinhibées par des interactions intramoléculaires. L'interaction d'ELMO avec RhoG activé lève l'inhibition d'ELMO dû à l'interaction EID/EAD. ELMO à son tour lève l'inhibition SH3/DHR2 de DOCK180 qui va exercer sa fonction GEF sur Rac 1.

Nous verrons dans la suite de mon travail que l'interaction du domaine polyproline d'ELMO avec des domaines SH3 est aussi importante pour les fonctions d'ELMO. Les caractéristiques des interactions PxxP/SH3 sont décrites dans le paragraphe qui suit.

5. Les interactions SH3/PxxP

Les domaines SH3 (Src homology 3) sont constitués d'environ 60 acides aminés, ils se retrouvent dans une grande variété de protéines cytoplasmiques qui sont impliquées dans la signalisation cellulaire, la régulation du cytosquelette ou la réponse immunitaire. Le rôle des domaines SH3 dans la cellule est varié : localisation cellulaire, régulation, recrutement. Ces domaines sont des structures compactes, formées de cinq feuillets β (β_a à β_e) organisés en deux feuillets β perpendiculaires de trois brins chacun, le brin β_b étant à cheval sur les deux feuillets. Les extrémités N et C-terminales sont proches l'une de l'autre et localisées à l'opposé de la surface de liaison avec le ligand. Trois boucles connectent les brins β entre eux. La plus grande est la boucle RT située entre les brins β_a et β_b, cette boucle est importante pour la spécificité de reconnaissance du motif polyproline partenaire. Deux autres boucles plus courtes, la boucle n-Src et la boucle distale, connectent les brins β_b/β_c et β_c/β_d respectivement. Enfin, une courte hélice 3_{10} sépare les deux derniers brins β_d et β_e (Figure 9).

Les domaines SH3 sont spécifiques de l'interaction avec les motifs polyprolines et la meilleure des affinités est de l'ordre du micro-molaire. Les domaines polyprolines contiennent un motif consensus PxxP où x est un acide aminé quelconque. Le motif polyproline forme une hélice de type 2 dont l'orientation dépend des résidus basiques qui encadrent ce motif. Il s'agit d'un polyproline de classe 1 lorsqu'ils sont placés en N-terminal du motif PxxP(R/KxxPxxP) et de classe 2 lorsqu'ils sont placés du côté C-terminal (PxxPPxR/K). Les domaines SH3 peuvent interagir avec les 2 classes. Cela est rendu possible par le fait que l'hélice polyproline de type 2 est pratiquement symétrique et présente au domaine SH3 les chaînes latérales dans une position similaire quelle que soit l'orientation du peptide (Broutin et Ducruix 2000; Chenavas 2005).



SH3(Hck)

Figure 9. Exemple d'une interaction SH3/Polyproline
Représentation de la structure RMN du complexe formé par le domaine SH3 (ici Hck) et un peptide polyproline synthétique (ici PD1, entrée PDB 2OI3). Le domaine SH3 (en bleu) est formé de cinq feuillets β, une boucle RT située entre les brins βa et βb ,la boucle n-Src et la boucle distale connectent les brins βb /c et les brins βc/d respectivement. Une courte hélice 3_{10} sépare les deux brins βd et βe. Le peptide polyproline synthétique (en rouge, HSKYPLPPLPSL) interagit avec le domaine SH3 dans l'orientation typique des polyproline de classe 1.

L'interaction des domaines SH3 avec leurs partenaires peut être liée à la présence des domaines adjacents qui peuvent influencer les caractéristiques physiologiques de l'interaction. C'est le cas pour le domaine SH3 de DOCK2. Les travaux de Hanawa-Suetsugu et collaborateurs décrivent la structure du complexe entre le domaine C-terminal d'ELMO et les 167 premiers résidus de DOCK2 (code pdb 3A98, figure 10, Hanawa-Suetsugu et al. 2012). La structure montre d'une part une interaction entre les hélices α entourant le domaine PH d'ELMO et les hélices α adjacentes au domaine SH3 de DOCK2 (conforme aux résultats de Komander et al, 2008) et d'autre part une interaction entre le domaine SH3 et le motif polyproline d'ELMO ce qui est en accord avec les données fonctionnelles sur le rôle de cette interaction dans les fonctions cellulaires.

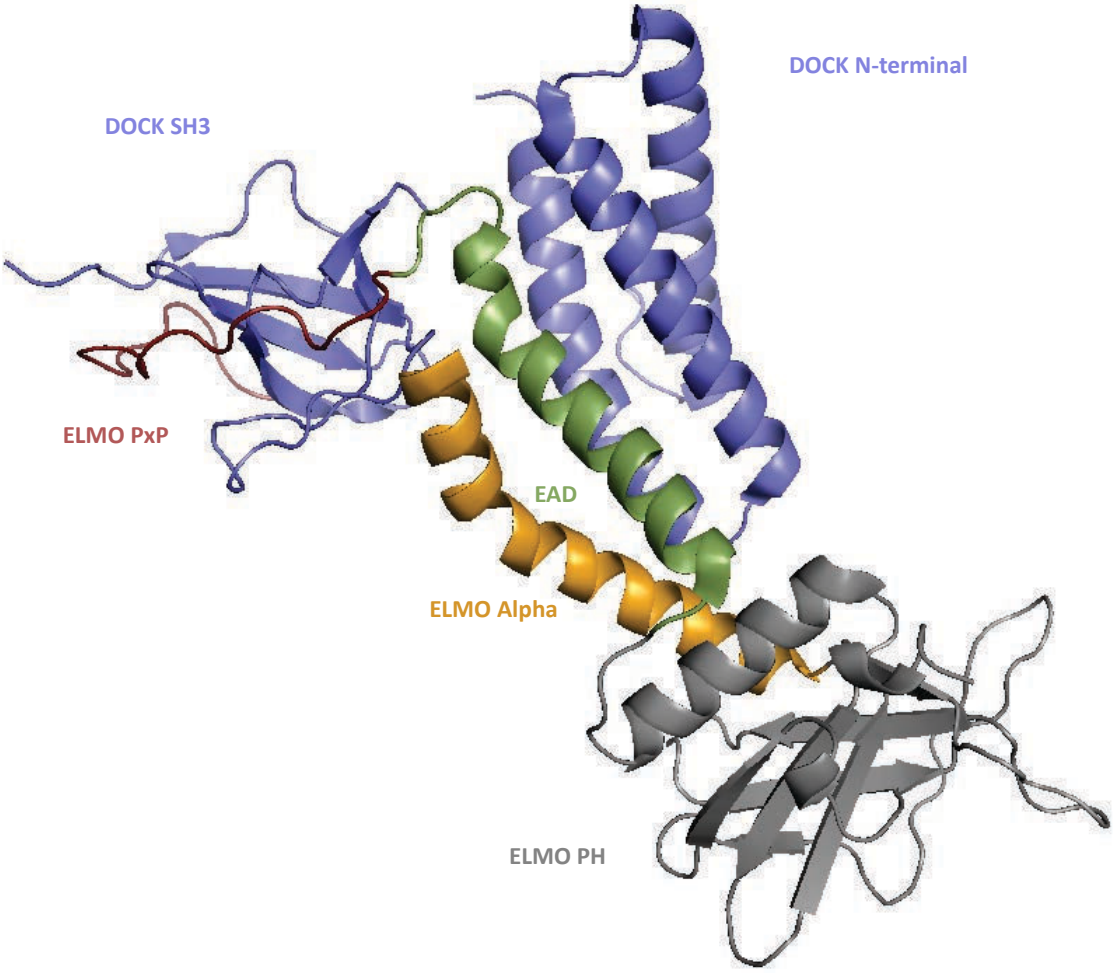


Figure 10. Structure cristallographique PDB 3A98 du complexe ELMO/DOCK2
Structure du complexe entre la partie N-terminale de DOCK2 et la partie C-terminale d'ELMO (Hanawa-Suetsugu et al. 2012). On observe un complexe qui implique l'association des hélices alpha adjacentes au domaine PH d'ELMO (PH, gris ; Hélices EAD, vert ; ELMO Alpha, orange) et les hélices adjacentes au domaine SH3 (DOCK2, violet), mais aussi la liaison du peptide polyproline d'ELMO (rouge) avec le domaine SH3 de DOCK2. DOCK180 possède 59% d'identité de séquence avec DOCK2, ce qui suggère que le complexe formé entre DOCK180 et ELMO est proche de la structure représentée ici.

L'un des mécanismes de régulation d'ELMO qui pourrait jouer un rôle dans le recrutement de la protéine à la membrane plasmique où elle peut interagir avec son partenaire DOCK180 est la phosphorylation. ELMO peut être phosphorylée par la kinase Hck, et ces phosphorylations semblent jouer un rôle pour le complexe ELMO/DOCK180. Dans la suite de ce chapitre, je donne une vue générale sur les kinases avant de développer la famille Src et plus spécifiquement Hck et sa liaison avec la protéine ELMO.

C. La phosphorylation

Le processus de phosphorylation/déphosphorylation catalysé respectivement par les kinases et les phosphatases modifie la fonction de différentes protéines. La phosphorylation augmente ou diminue l'activité biologique d'une protéine, elle peut la stabiliser ou au contraire la marquer en vue de sa destruction. L'état de phosphorylation d'une protéine est bien connu pour contrôler les interactions protéine-protéine. La simplicité, la flexibilité et la réversibilité associée à la disponibilité de l'ATP explique sa sélection par le vivant comme étant un processus de régulation général (Cohen 2002).

La phosphorylation des protéines cibles régule des voies de signalisation qui jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques. C'est un mécanisme à travers lequel des signaux intra et extracellulaires sont transmis à travers la cellule afin de réguler des évènements biologiques comme la croissance cellulaire, la différentiation, le développement et la mort.

1. Les kinases

Les kinases sont des protéines dont l'activité enzymatique catalyse le transfert d'un groupement phosphate provenant du nucléotide adénosine triphosphate (ATP) sur une molécule cible qui peut être une protéine, un acide nucléique, un lipide, un sucre ou même une autre kinase.

a) Différentes classes de kinases

Les kinases sont classées selon deux critères: la spécificité du substrat et l'homologie des séquences de leurs domaines catalytiques. Suivant le premier critère, on trouve les tyrosine kinases et les sérine-thréonine kinases. Suivant le second critère, l'analyse de 518 protéines kinases humaines, regroupées sous le nom de «Kinome» montre que 478 d'entre elles possèdent au moins un domaine catalytique eucaryote (ePK); les autres 40 sont qualifiées d'atypiques (aPK) car elles ne présentent pas une homologie avec les domaines catalytiques des ePK mais par contre présentent une activité kinase. Les protéines kinases humaines (ePK) identifiées sont classées en neuf groupes différents (Tableau I).

Famille des kinases	Acronyme
AGC	cAMP-dependent protein kinase/protein kinase G/protein kinase C extended
CAMK	Calcium-Calmodulin regulated kinases
CMGC	Cyclin-dependent Kinases et autres kinases du même groupe
RGC	Receptor Guanylate Cyclases
TK	Protein tyrosine kinase
TKL	Tyrosine Kinase Like
STE	MAP Kinase cascade kinases
CK1	Cell kinase1
Autres	

Tableau I. Les 9 grandes familles des kinases. les AGC (regroupe les protéines kinases A, G et C), les CAMK (Ca^{2+}/calmodulin dependant kinases), les CMGC (regroupe les CDKs, les MAPKs, GSK3 et les CLK). Le neuvième groupe correspond à une collection mixte de kinases qui sont difficiles à classer parmi les autres kinases.

Dans la suite de ce chapitre, on s'intéresse surtout à la famille des tyrosines kinases.

b) Les tyrosine kinase

Le groupe des tyrosine kinases humaines est formé de plusieurs familles comme, EPHA3 (ephrin type-A receptor 3), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), JAK2 (Janus Kinase 2), et SRC. Ces familles se divisent en deux groupes: les récepteurs et les non-récepteurs.

(1) Les récepteurs tyrosine kinase

Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire qui lie les ligands et un domaine intracellulaire à activité catalytique. En absence du ligand, ces récepteurs sont non phosphorylés et monomériques, la conformation de leur domaine kinase est inactive. L'interaction de ce domaine avec des régions juxtaposées, joue un rôle dans son inhibition.

La fixation du ligand sur le domaine extracellulaire permet la dimérisation du récepteur, la rupture des interactions auto-inhibitrices et la transphosphorylation des résidus tyrosines. La phosphorylation de ces tyrosines crée des sites d'interactions avec des protéines possédant

des domaines SH2 (Src homology domain 2) et des domaines PTB (Phosphotyrosine binding). L'activation en cascade des protéines permet leur recrutement à la membrane et ainsi l'activation de plusieurs voies de signalisation (Schlessinger 2000).

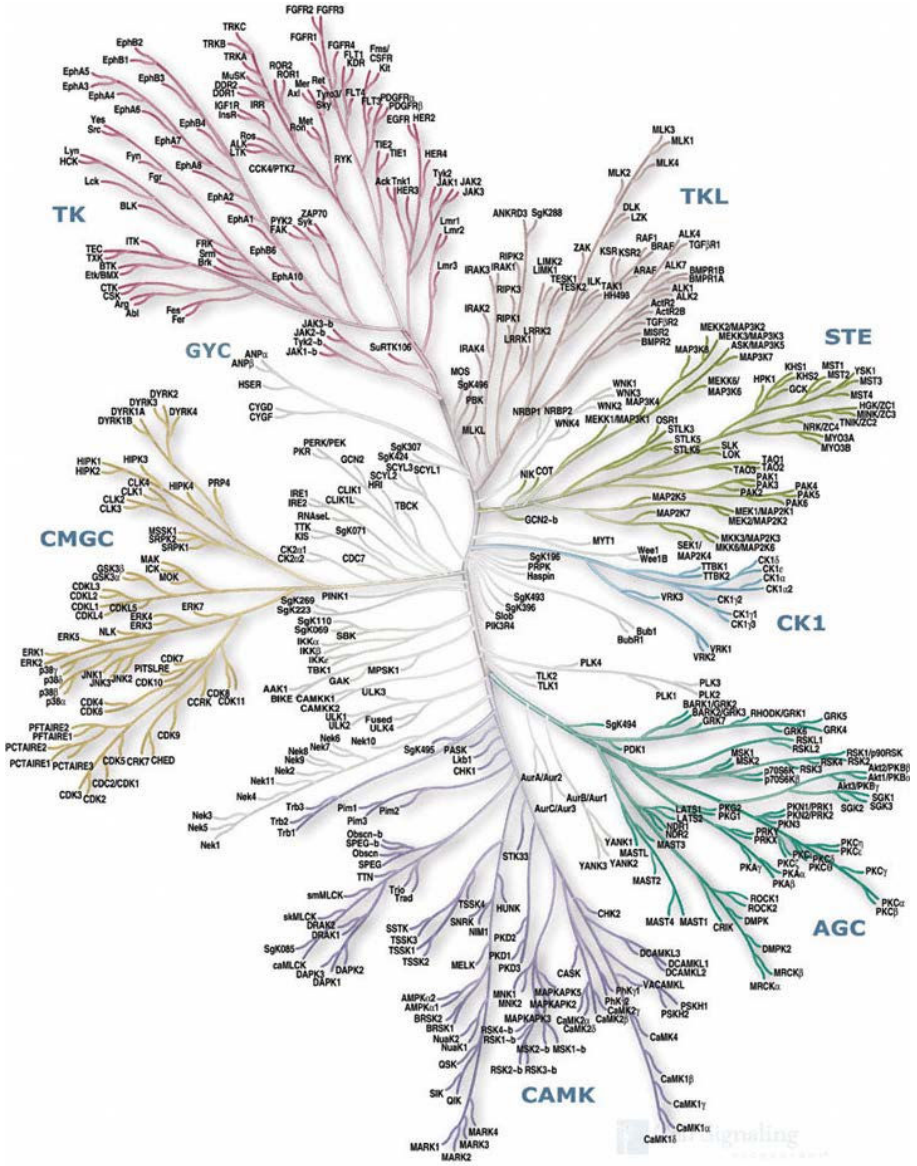


Figure 11. Arbre phylogénétique des kinases humaines
Les kinases identifiées sont réparties en 9 groupes d'après leur idendité de séquence, parmi eux la famille des tyrosines kinases (Kinome, (Manning et al. 2002).

(2) Les tyrosine kinases non récepteurs

Ces kinases sont dépourvues d'un domaine transmembranaire, et se trouvent surtout dans le cytosol, le noyau ou la surface interne de la membrane plasmique. Ces kinases sont maintenues inactives suite à des interactions intramoléculaires, ou avec des inhibiteurs protéiques ou lipidiques. Elles sont activées soit par des signaux intracellulaires conduisant à

la dissociation de leurs inhibiteurs, soit suite à leur recrutement par des récepteurs membranaires ou encore par trans-phosphorylation par d'autres kinases (Krause et Van Etten 2005).

(3) Fonction catalytique

Le domaine catalytique est formé d'environ 270 acides aminés répartis en 2 lobes, le lobe N-terminal et le lobe C-terminal. Le lobe N-terminal est formé d'un feuillet antiparallèle à cinq brins β et d'une hélice nommée αC, la boucle reliant les deux premiers brins β est nommée «P-loop» (boucle P). Elle permet la liaison des phosphates de l'ATP indispensable à l'activité des kinases. Le lobe C-terminal est constitué d'hélices α mais également de deux brins β et de deux boucles très importantes qui sont la boucle catalytique et la boucle d'activation «A-loop». Les deux lobes sont reliés par une boucle dite «région charnière» qui leur confère une certaine flexibilité l'un par rapport à l'autre (Johnson, Noble, et Owen 1996). La phosphorylation du substrat se produit dans le site actif, ce site est localisé à l'intersection des 2 lobes. Le site est formé de 2 sites juxtaposés: l'un pour recevoir l'ATP et l'autre pour le substrat. Le site de reconnaissance du substrat, formé par la «A-loop» (boucle A) qui est peu conservée et de longueur variable contribue à la spécificité de l'enzyme (Adams 2001). Le site de fixation de l'ATP est formé de plusieurs poches parmi lesquelles une poche de fixation de l'adénine, une poche pour les riboses et une poche de fixation du phosphate. La partie adénine est localisée dans une poche formée de résidus hydrophobes provenant des deux lobes, dans laquelle elle s'oriente grâce à deux liaisons hydrogènes avec la chaine principale de la région charnière. Le groupement ribose est stabilisé par des liaisons hydrogènes avec des résidus du lobe C-terminal. Les trois phosphates sont alignés pour la catalyse de par leurs interactions avec la boucle P ainsi qu'avec quatre acides aminés dit catalytiques, hautement conservés parmi toutes les kinases humaines et qui jouent un rôle dans le transfert du groupement phosphate de l'ATP vers l'accepteur (Adams 2001). Une première lysine située dans un brin central du lobe N-terminal est stabilisée grâce à une liaison ionique avec un résidu glutamate provenant de l'hélice C activatrice. Cette lysine participe à l'orientation correcte des groupements phosphates α et β de l'ATP. Un deuxième acide aminé important est l'acide aspartique du motif conservé DFG qui est situé en amont de la boucle A. Il permet la coordination d'ions magnésium nécessaires au positionnement des phosphates β et ɣ.

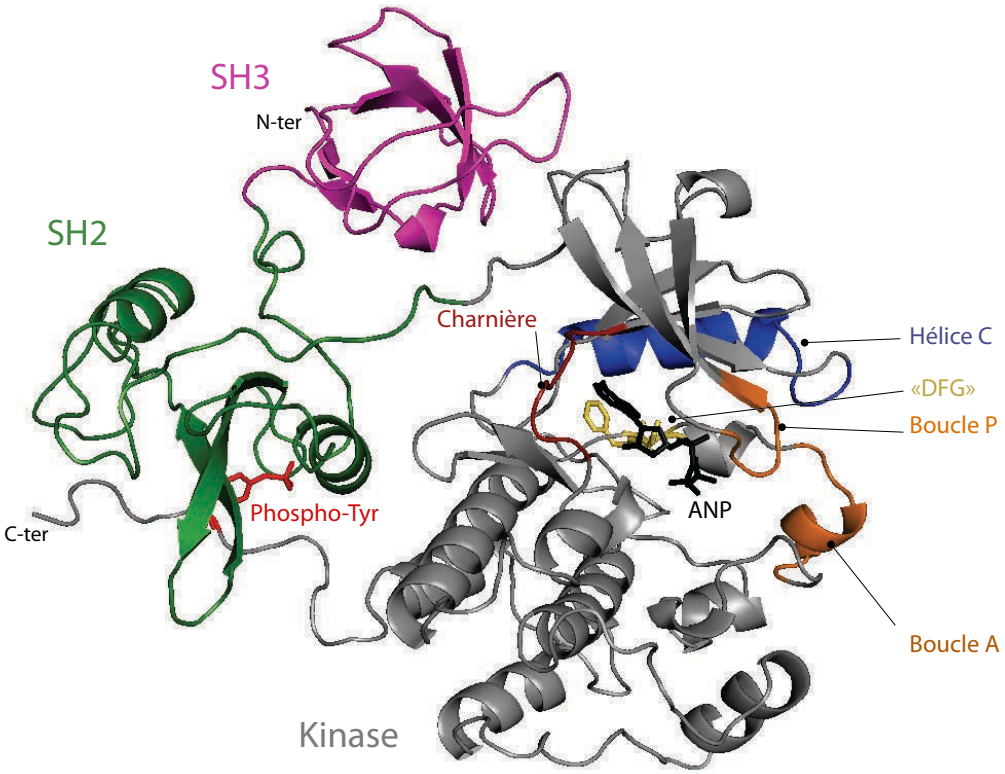


Figure 12. Structure cristallographique (PDB 2SRC) de la kinase Src
Représentation de la structure de la kinase Src en complexe avec un analogue non hydrolysable de l'ATP (ANP, Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate ester). On observe les domaines typiques des tyrosines kinases SFK : un domaine SH3 (magenta), un domaine SH2 (vert) qui interagit avec la tyrosine phosphorylée de l'extension C-terminale , le domaine Kinase (ou SH1, en gris) et les éléments clés participant à l'activité catalytique du domaine. On trouve les élèments de fixation de l'ATP (boucle P et la région charnière), les élèments de fixation du substrat et de transfert du phosphate (boucle A et boucle catalytique), les élèments d'activation de l'enzyme (hélice C et le motif peptidique DFG).

Enfin, un dernier est l'acide aspartique appartenant à la boucle catalytique et à son motif conservé HRD sert à orienter le groupement hydroxyle du résidu phospho-accepteur. Un dernier acide aminé, souvent une thréonine située à la limite du feuillet β5 et la région charnière semble essentielle pour la sélectivité de la cible comme l'ont montré des études visant à sélectionner des inhibiteurs. Pour cette raison il est appelé «gatekeeper» (Azam et al. 2008).

(4) Régulation de l'activité catalytique

L'implication des kinases dans plusieurs fonctions cellulaires nécessite que l'activité de leur domaine catalytique soit fortement régulée. Les protéines transitent entre deux conformations catalytiquement actives et inactives sous différents modes de régulation: soit la kinase est active mais l'ATP et le substrat sont incapables de se fixer, soit la kinase est inactive du fait du déplacement d'éléments clés participant au domaine catalytique. On

parle dans ce cas d'une régulation allostérique qui correspond à une alternance entre la conformation active et inactive avec des changements structuraux empêchant la fixation de l'ATP ou du substrat (Johnson, Noble, et Owen 1996; Hubbard, Mohammadi, et Schlessinger 1998). Les kinases peuvent adopter deux conformations inactives la ***conformation C-helix out*** et la ***conformation DFG out***, ces deux conformations ainsi que deux autres modes de régulation allostérique seront décrites dans la suite de cette partie.

(a) Conformation «C-helix out»

L'un des exemples décrits pour cette conformation est celui de la kinase Src, cristallisée en 1997 avec ses domaines SH2 et SH3 en interaction avec le domaine catalytique (code PDB:1FMK). Dans cette structure, Src présente une tyrosine phosphorylée sur l'extension C-terminale, contribuant à l'amarrage du domaine SH2 le long du domaine catalytique et provoquant ainsi l'adoption de la conformation inactive C-helix out. C'est plus exactement la boucle reliant le domaine SH2 au domaine catalytique qui vient perturber le lobe N-terminal en logeant la chaine latérale d'un tryptophane entre le feuillet et l'hélice C, provoquant le déplacement de cette dernière (Figure12, (Xu, Harrison, et Eck 1997).

(b) Conformation «DFG out»

L'un des exemples décrits pour cette conformation est celui du récepteur de l'insuline INSR (code PDB: 1IRK). Dans la structure sans ligand et non phosphorylée, la totalité de la boucle A subit un déplacement important, le résidu phénylalanine du motif conservé DFG (motif peptidique Asp-Phe-Gly) pointe vers le site de fixation de l'ATP dans la zone située entre le site de fixation du groupe adénine et celle du ribose, la suite de la boucle A est déplacée et ni le substrat ni l'ATP ne peuvent se fixer.

(c) Régulation par la «P-loop»

La boucle P est une zone très flexible qui ne se stabilise qu'en présence de l'ATP (Taylor et Radzio-Andzelm 1997). Dans certaines structures sans ligand, la boucle P présente une distorsion de telle façon que l'accès au site de liaison de l'ATP est bloqué comme dans le cas de la kinase CK2alpha (code PDB: 3FWQ, Raaf, Issinger, et Niefind 2009). Cependant d'autres structures sans ligand présentent un site de fixation accessible comme dans le cas de la kinase LCK (code PDB: 3LCK, Yamaguchi et Hendrickson 1996).

Cette boucle semble donc jouer un rôle régulateur mais cela reste encore très débattu.

(d) Régulation par phosphorylation

La phosphorylation des kinases se présente comme un mécanisme de leur propre régulation et peut donc être responsable de leur activation ou de leur inhibition. Dans le cas du récepteur de l'insuline INSR, la phosphorylation de l'une des trois tyrosines se trouvant sur la boucle A est déterminante pour l'activation de la kinase, cette phosphorylation stabilise la boucle pour la fixation du substrat (Hubbard, Mohammadi, et Schlessinger 1998). D'autre part, pour la tyrosine kinase Src, la phosphorylation d'un résidu tyrosine situé sur son extension C-terminale permet son interaction avec le domaine SH2 ce qui pousse la kinase à adopter une conformation inactive C-helix out (Xu, Harrison, et Eck 1997).

(e) Dérégulation des kinases

La dérégulation des kinases est à l'origine de plusieurs pathologies cancéreuses, cardiovasculaires, neurologiques, métaboliques ou inflammatoires. Dans le cas des cancers hématologiques, l'activation des tyrosine kinases peut se produire par plusieurs mécanismes.

L'activation excessive des tyrosine kinases augmente la survie, la prolifération des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse et le pouvoir invasif des tumeurs (Krause et Van Etten 2005).

La leucémie myéloïde chronique est le premier cancer de sang à être traité par un inhibiteur de kinase. Cet inhibiteur de kinases est «l'imatinib» (Blay et al, 2005; l'autorisation de mise en marché en Europe et aux Etats-Unis est accordée en 2001). Cette molécule est capable de stopper efficacement la leucémie avec peu d'effets secondaires. Depuis cette découverte, les kinases sont considérées comme des cibles thérapeutiques, et il y a de plus en plus des programmes de recherche qui visent à trouver des molécules pouvant jouer le rôle d'inhibiteurs de kinases.

La majorité des inhibiteurs découverts pour l'instant ciblent le site de fixation de l'ATP. Ils doivent d'une part présenter une affinité importante pour remplacer l'ATP intracellulaire et d'autre part être sélectif pour une kinase définie, ceci est rendu difficile par la forte conservation du site de fixation de l'ATP parmi les différentes kinases (Karaman et al. 2008; Knight et Shokat 2005).

c) *La famille SRC (SRC Family Kinases: SFK)*

La découverte de cette famille revient aux travaux de Peyton Rous qui étudiait les tumeurs (sarcome) chez les poules (Rous 1911). Quand les tumeurs sont retirées, homogénéisées et filtrées, leurs filtrats injectés à des poules saines induisent le développement de la même tumeur. Il conclue que le cancer peut être causé par un agent transmissible. Ce n'est que quelques années plus tard qu'on a découvert que cette transmission est due à un virus nommé Rous Sarcoma Virus (RSV) et plus précisément à un gène viral nommé v-Src (viral Src).

Huebner et Todaro ont proposé que toutes les cellules animales possèdent des «oncogènes viraux» qui leur sont transmis sous forme réprimée, les proto-oncogènes (Huebner et Todaro 1969). Cette idée a été confirmée par les travaux de Varmus, Bishop, Cooper et Hanafusa. Ces proto-oncogènes altérés par des agents physiques ou chimiques peuvent déclencher un cancer (Krishnan, Miller, et Goldberg 2012).

(1) Les différents membres

Cette famille de protéines contient 9 membres de tyrosine kinases non récepteurs: Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes et Yrk. Src, Fyn et Yes ont une expression ubiquitaire alors que les autres sont exprimées dans différents types cellulaires (Voir tableau II). Les SFK ont un rôle important dans la régulation des signaux provenant des récepteurs de surface, elles sont impliquées dans la croissance cellulaire, la différentiation, la morphologie cellulaire, la migration ou la survie (Krishnan, Miller, et Goldberg 2012).

Membres de la famille Src	**Lieu d'expression.**
Blk	Lymphocytes B
Fgr	Lymphocytes B, cellules myéloïdes
Fyn	Ubiquitaire
Hck	Cellules myéloïdes
Lck	Lymphocytes T, NK, cerveau
Lyn	Cerveau, lymphocytes B, cellules myéloïdes
Src	Ubiquitaire
Yes	Ubiquitaire
Yrk	Ubiquitaire

Tableau II. Expression des différents membres de la famille Src dans les divers types cellulaires (d'après (S. M. Thomas et Brugge 1997).

(2) Structure

Les membres de cette famille possèdent 4 domaines: un domaine N-terminal qui est unique pour chaque membre de la famille, et qui est responsable de l'association des SFK avec la membrane; le domaine SH3 qui reconnaît les motifs polyprolines (PxxP, section les interactions PxxP/SH3); le domaine SH2 qui reconnaît les protéines ayant des tyrosines phosphorylées avec une séquence consensus pYEEI; et le domaine SH1 qui correspond au domaine catalytique de la kinase (ePK) est responsable de l'activité enzymatique et contient une boucle d'activation contenant une tyrosine Y_A (Y_A pour activating tyrosine) dont l'autophosphorylation active la kinase (Figure 13, et Guiet et al. 2008)

(3) Activation / inactivation

Deux mécanismes majeurs pour l'inactivation de la famille Src ont été identifiés (Sicheri et Kuriyan 1997; Xu, Harrison, et Eck 1997). Le premier dépend de l'interaction du domaine SH3 avec le motif polyproline situé entre les domaines SH1 et SH2, le second dépend de l'interaction du domaine SH2 avec une tyrosine Y_T régulatrice localisée dans le domaine C-terminal («T» pour Tail). L'inhibition de ces interactions permet l'activation de la kinase (Figure 13).

L'activation des membres de la famille Src dépend de la levée des interactions SH3/PxxP, elle a lieu suite à l'engagement des SFK avec d'autres interactants. Par exemple c'est le cas de $p130^{cas}$ (Pellicena et Miller 2001) et du récepteur de la progestérone (Boonyaratanakornkit et al. 2001) qui interrompent l'interaction SH3/PxxP de Src. Un autre exemple très important est celui de la protéine Nef de HIV-1 qui interagit avec les domaines SH3 des SFK avec différentes affinités, la meilleure étant avec Hck et Lyn (Arold et al. 1998).

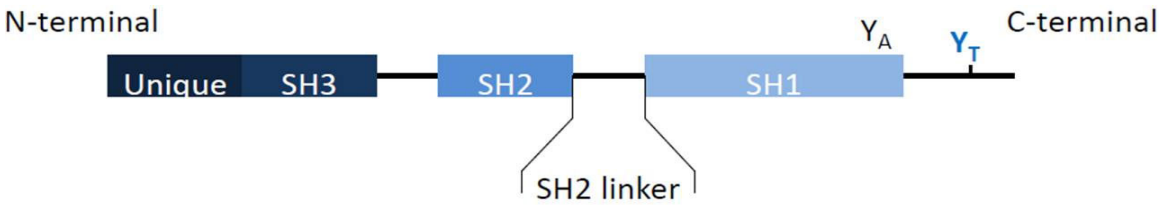


Figure 13. Représentation des domaines de la famille Src
Les SFK possèdent un domaine unique pour chaque kinase, suivi d'un domaine SH3, SH2, et SH1. Le domaine SH3 interagit avec les motifs polyprolines, le domaine SH2 interagit avec des tyrosines phosphorylées, le domaine SH1 est responsable de l'activité kinase de la protéine. Le linker entre les domaines SH2 et SH1 contient un motif polyproline, le domaine SH1 contient une boucle d'activation avec une tyrosine Y_A, et le domaine C-terminal possède une tyrosine régulatrice Y_T.

L'activation peut dépendre aussi des modifications enzymatiques effectuées par des kinases et des phosphatases. La famille Src est inhibée par la phosphorylation de la tyrosine Y_T et la déphosphorylation de la tyrosine Y_A. Les kinases responsables de la phosphorylation de la tyrosine Y_T localisée dans le domaine C-terminal sont les Csk (C-terminal Src Kinase) et leurs homologues les CHK (C-terminal Src kinase homologous kinase). Les CHK inhibent la kinase Src en formant un complexe stable (Chong et al. 2004).

Dans l'état actuel des connaissances, quatre phosphatases sont impliquées dans la déphosphorylation de Y_A et l'inactivation consécutive des SFK, il s'agit de la tyrosine phosphatase des cellules T (TCPTP, T-cell protein tyrosine phosphatase) qui régule Src, la tyrosine phosphatase riche en proline (PEP, Proline-enriched tyrosine phosphatase) et la tyrosine phosphatase SHP1 (SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase) qui régulent Lck ou encore CD45 qui régule à son tour Hck et Lyn. D'une façon intéressante, CD45 et SHP1 peuvent également activer les SFK en déphosphorylant Y_T en levant l'interaction SH2/ Y_T (Seavitt et al. 1999; Somani et al. 1997).

Parmi les membres de la famille Src, on s'intéresse surtout à la kinase hématopoiétique Hck qui joue, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, un rôle important dans les fonctions des phagocytes.

d) Hck: une tyrosine kinase spécifique des phagocytes

Hck est une kinase qui a été découverte en 1987 suite aux travaux indépendants de deux groupes, Quintrell et collaborateurs (Quintrell et al. 1987) et Ziegler et collaborateurs (Ziegler et al. 1987). Hck joue un rôle important dans différentes fonctions des macrophages comme la phagocytose, la migration, l'adhésion, et la formation des podosomes. Elle est spécifique de la lignée myéloïde et existe sous 2 isoformes exprimées simultanément à des quantités équivalentes suite à la traduction alternative d'un même ARN messager: il s'agit de p61Hck et p59Hck.

L'isoforme p61Hck présente 20 acides aminés en plus du côté N-terminal qui peut être myristoylée alors que p59Hck peut être myristoylée ou palmitoylée sur son extrémité N-terminale.

L'expression ectopique de Hck a montré que les deux isoformes sont présentes dans l'appareil de Golgi mais que p59Hck est également localisée à la membrane plasmique, alors

que p61Hck est associée à la face cytoplasmique de la membrane des lysosomes. (Guiet et al. 2008). Une mutation ponctuelle dans le site de palmitoylation de p59Hck la redirige vers le lysosome (Carreno et al. 2000).

Dans les phagocytes humains stimulés par des microorganismes ou des particules comme les billes de zymosan opsonisées, les lysosomes fusionnent avec les phagosomes. Hck est activée dans le lysosome puis transloquée vers la membrane (Astarie-Dequeker et N'Diaye 1999; H. Welch et Maridonneau-Parini 1997). La corrélation entre l'activation de Hck et sa translocation dépend du récepteur qui joue le rôle de médiateur dans l'internalisation des particules (Astarie-Dequeker et N'Diaye 1999; Peyron et al. 2000). Le dynamisme des deux isoformes après la phagocytose a été étudié dans des cellules CHO qui expriment d'une façon stable le récepteur Fcγ. Suite à l'internalisation des billes de zymosan opsonisées par les IgG, p59Hck est d'abord detectée dans les coupes phagocytaires alors que p61Hck reste intracellulaire. Assez rapidement (~15 minutes plus tard), p61Hck s'accumule à la membrane des phagosomes où elle colocalise avec p59Hck. Après 3 heures, alors que les particules de zymosan sont quasiment digérées, p59Hck ne se trouve plus à la membrane des phagosomes contrairement à p61Hck. Ces données suggèrent que les deux isoformes ont des rôles distincts dans la formation des phagolysosomes suite à l'internalisation des microorganismes (Guiet et al. 2008; Downey et al. 1999).

(1) Fonctions de la kinase Hck dans les phagocytes

(a) Dans la transduction des signaux par des immunorécepteurs

Les kinases de la famille Src (SFK, Src Family Kinase), Hck incluse, partagent une fonction commune avec la kinase Syk («spleen tyrosine kinase», exprimée dans les cellules hématopoiétiques) dans la transduction des signaux dépendant des immunorécepteurs.

Le rôle de ces kinases dépend d'un motif protéique nommé ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) qui joue un rôle important dans l'initiation du signal. Suite à l'engagement du récepteur, les kinases de la famille Src phosphorylent les ITAM permettant le recrutement et l'activation de Syk. Le complexe de signalisation ainsi formé contrôle la phosphorylation par Syk de plusieurs protéines adaptatrices comme SLP-76 aboutissant à l'activation des voies de signalisation en amont ainsi que les différentes fonctions (Figure 14). Des macrophages KO Hck$^{-/-}$, Fgr $^{-/-}$, Lyn$^{-/-}$ présentent une phosphorylation faible des ITAM et une phagocytose réduite. La perte des kinases de la famille Src réduit la

polymérisation de l'actine dans la coupe phagocytaire. De plus, la perte de Hck, Fgr et Lyn réduit mais ne bloque pas totalement la phagocytose médiée par les récepteurs Fcγ (Fitzer-Attas, Lowry, et Crowley 2000).

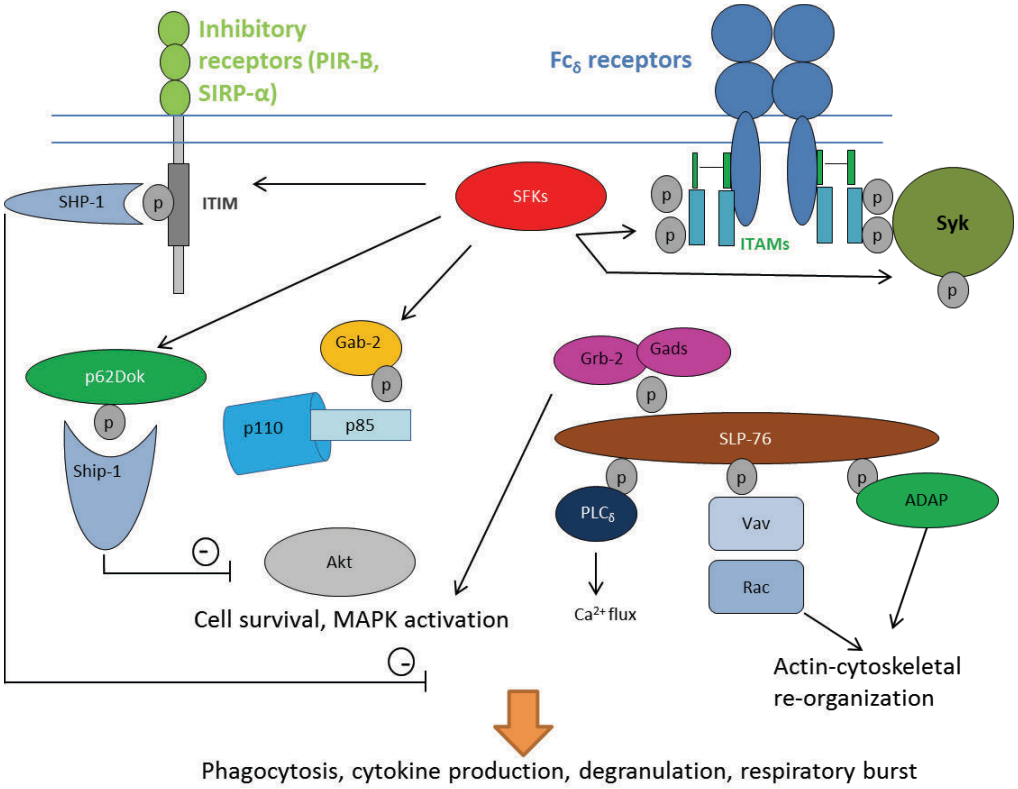


Figure 14. Les SFK dans les voies de signalisation dépendant des immunorécepteurs
Suite à la fixation du domaine Fc des anticorps sur les récepteurs Fcɣ, les résidus ITAM sont phoshorylés par les kinases de la famille Src (SFKs). La phosphorylation des résidus ITAM permet leur interaction avec les domaines SH2 de la famille Syk ce qui permet leur activation (de plus, les SFK peuvent contribuer directement à l'activation de Syk). Syk activé, phosphoryle plusieurs substrats qui vont intervenir dans différentes fonctions cellulaires. Les séquences ITIM, substrats des SFKs se trouvent sur des récepteurs ou sur des protéines cytoplasmiques comme p62Dok. Les SFKs phosphorylent également les Gabs, contribuant ainsi à l'activation d'Akt ou de Rac qui sont impliquées dans la survie cellulaire (Akt), et le remodelage du cytosquelette d'actine (Rac), respectivement (d'après (Berton, Mócsai, et Lowell 2005).

D'autre part, la kinase Lyn phosphoryle des motifs protéiques appelés ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs) présents dans certains récepteurs. Dans les lymphocytes B, Lyn phosphoryle les domaines ITIM des récepteurs FcγRIIb et CD22 qui recrutent des phosphatases comme SHP1 et SHIP1 qui inhibent les voies de signalisation (DeFranco, Chan, et Lowell 1998).

(b) Dans la signalisation dépendant des intégrines

Les SFKs jouent un rôle dans la transduction du signal à travers les intégrines dans les cellules des lignées hématopoïétiques. Des neutrophiles ou des macrophages défectifs en Hck ou Fgr sont incapables de réguler les réponses dépendant de l'intégrine (Mócsai et al. 2002; Meng et Lowell 1998; Continolo et al. 2005). Plusieurs substrats des kinases Src et Syk ont été identifiés, ils incluent la paxilline, la tensine, Cbl, SLP-76, Vav1 et p190RhoGAP (Mócsai et al. 2002; Meng et Lowell 1998; Continolo et al. 2005). La phosphorylation de certains de ces substrats comme la paxilline et Cbl est augmentée chez des granulocytes déficients en inhibiteur Csk (C-terminal Src kinase) ou des macrophages qui expriment une forme constitutivement active de Hck (Ernst et al. 2002; R. M. Thomas et al. 2004). Parmi ces protéines, il a été confirmé que Cbl, SLP-76 et Vav1/3 jouent un rôle fonctionnel dans la signalisation intégrine-dépendante chez les macrophages ou les neutrophiles (Meng et Lowell 1998; Newbrough et al. 2003; Caveggion et al. 2003; Gakidis et al. 2004).

Un autre substrat important des kinases Src est Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) apparentée à FAK (Focal adhesion kinase). Pyk2 est phosphorylée en réponse à l'activation de la voie intégrine-dépendante chez les neutrophiles, cette phosphorylation est réduite chez les macrophages $Hck^{-/-}$ et $Fgr^{-/-}$ étalés sur les ligands d'intégrines (Suen et al. 1999). D'une façon intéressante, les macrophages $Pyk2^{-/-}$ ont le même phénotype que celles $Hck^{-/-}$ et $Fgr^{-/-}$, ils accumulent l'actine à la périphérie des cellules et forment des lamellipodes dans différents directions en même temps (Suen et al. 1999; Okigaki, Davis, et Falasca 2003). Suite à l'engagement de l'intégrine β1, la phosphorylation de Cbl par les kinases Src est essentielle pour le recrutement de Cbl ainsi que la PI3 kinase à la membrane plasmique des macrophages, ainsi que la formation et la localisation du PIP3 qui régule l'étalement cellulaire (Suen et al. 1999). De plus, la phosphorylation de Cbl par les kinases de la famille Src régule la migration des macrophages (Caveggion et al. 2003).

(c) Dans la migration et la formation des podosomes

Hck est activée durant l'exocytose des lysosomes, une fonction importante des phagocytes. Ces lysosomes fusionnent soit avec les phagosomes pour former des phagolysosomes qui permettent la dégradation des microorganismes, soit avec la membrane plasmique pour la sécrétion des protéases dans le milieu extracellulaire qui dégradent la matrice et détruisent les agents infectieux.

L'expression de Hck^{ca} (Hck constitutivement active) induit la formation de rosettes de podosomes similaires à celles observées chez les fibroblastes transformés par v-Src. Chez les macrophages, les podosomes jouent un rôle important dans l'adhésion et la migration cellulaire (Evans et al. 2003; Linder et Aepfelbacher 2003). Ces podosomes possèdent une activité protéolytique capable de dégrader la matrice extracellulaire.

La formation des podosomes est attribuée à l'isoforme p61Hck activée et elle est dépendante de son association avec les lysosomes. L'isoforme p59 quant à elle induit la réorganisation des filaments d'actine pour former des protrusions de membrane plasmique. Cette réorganisation est dépendante de Cdc42 et Rac mais si elle est redirigée vers les lysosomes, p59Hck induit la formation des podosomes (Carreno et al. 2002; Poincloux et al. 2006). Des macrophages Hck$^{-/-}$ sont en effet incapables de former des podosomes, de dégrader la matrice ou de migrer (Cougoule et al. 2010).

(d) Conséquences des dérégulations de Hck

(i) Sur le recrutement des phagocytes aux sites inflammatoires

Des études réalisées *in vivo* confortent l'idée que Hck régule le recrutement des phagocytes aux sites inflammatoires. L'inactivation de Csk (C-terminal Src kinase) dans les granulocytes entraine l'hyperactivation des kinases Src et le développement des inflammations pulmonaires chez la souris. Il en est de même pour les souris qui expriment la forme constitutivement active de Hck (R. M. Thomas et al. 2004; Ernst et al. 2002). L'augmentation de la réponse inflammatoire peut être la conséquence de la migration excessive des phagocytes et de l'augmentation de leur pouvoir d'adhésion intégrine dépendant.

(ii) Sur l'infiltration des macrophages et le pouvoir invasif des tumeurs

Les macrophages sont sensibles aux différents stimuli de leur environnement qui sont dus à des infections et des cancers. Suite à ces stimuli, les macrophages se polarisent en type 1 ou 2.

Les macrophages infiltrant les tumeurs sont majoritairement de type 2 et favorisent la croissance tumorale. Ces macrophages sont appelés TAM (Tumor associated macrophages), ils peuvent présenter jusqu'à 50 % de la masse tumorale. L'infiltration des TAM est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers comme le cancer du sein et du colon.

Le caractère invasif des TAM dépend d'une migration importante vers le site tumoral. En plus, la surexpression des métalloprotéases par les TAM résidents au niveau du site tumoral peut être un indice de leur implication dans l'invasion des cellules tumorales. Les métalloprotéases étant nécessaires pour la dégradation de la matrice extracellulaire, il a été suggéré que les cellules tumorales profitent de la sécrétion de ces MMP surtout MMP-9 par les macrophages pour augmenter leur pouvoir invasif (Shih et al. 2006).

Malgré le fait que des macrophages $Hck^{-/-}$ présentent une expression, une activité et une sécrétion normale des protéases dédiées à la dégradation de la matrice (les métalloprotéases de la matrice extracellulaire MMP2 et MMP9; (Cougoule et al. 2010)), ils sont incapables de former des podosomes, élément nécessaire à leur migration et leur arrivée au site tumoral.

La progression ou la régression tumorale peut être dépendante de la qualité des cellules infiltrant la tumeur, donc le contrôle de l'infiltration des macrophages sans affecter la migration des autres cellules pourra mener à un contrôle de la croissance tumorale.

e) Hck et ses partenaires

Au vu du rôle de Hck dans les différentes fonctions cellulaires, plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier des partenaires et des cibles de la kinase. Une étude visant à rechercher les protéines interagissant avec Hck a permis d'identifier WIP, WASP et ELMO comme des partenaires du domaine SH3 de la kinase (Scott et al. 2002).

WASP et WIP sont requis pour la polymérisation de l'actine (Section III A.3.2). Hck et WASP interagissent une fois surexprimées dans les cellules CHO, et Hck phosphoryle WASP sur des résidus tyrosine dans ce modèle (Scott et al. 2002), ce qui implique Hck dans la régulation du cytosquelette d'actine. Au cours de mon travail, je me suis intéressée à l'interaction de Hck avec ELMO. Les données publiées à propos de cette interaction sont détaillées dans le paragraphe suivant.

(1) ELMO et Hck: partenaires mais pourquoi ?

ELMO étant un partenaire du domaine SH3 de Hck, il a été suggéré que cette interaction implique le domaine polyproline d'ELMO (Scott et al. 2002). La co-expression d'ELMO avec Hck conduit à la phosphorylation d'ELMO. Cinq sites de phosphorylations sur des tyrosines

ont été identifiés: il s'agit des tyrosines Y^{18}, Y^{216}, Y^{511}, Y^{395} ,Y^{720} (Figure 15). Par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine, la tyrosine la plus phosphorylée *in vitro* (plus de 70%) est la Y^{720}.

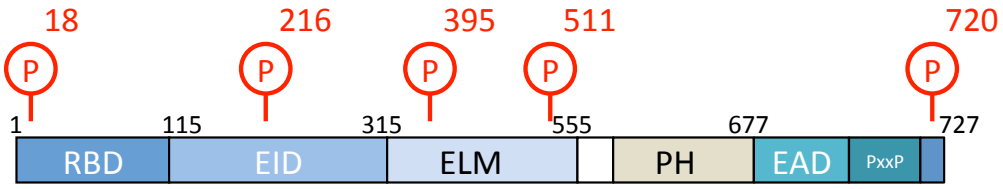


Figure 15. Phosphorylations d'ELMO
Positions des différentes tyrosines d'ELMO phosphorylés par Hck (Yokoyama et al. 2005).

Après l'identification de ces sites, des études fonctionnelles ont été réalisées pour comprendre le rôle de ces phosphorylations dans les fonctions cellulaires. Les cellules ont été transfectées avec DOCK180, ELMO (séquence sauvage, WT) ou ses mutants non phosphorylables sur une ou plusieurs tyrosines (mutations ponctuelles des tyrosines en alanines), et leur capacité à effectuer la phagocytose a été mesurée. Les mutants sur une seule tyrosine, et particulièrement Y^{720}A coopèrent avec DOCK180 pour promouvoir une phagocytose du même ordre qu'ELMO WT contrairement aux mutants couvrant plusieurs des tyrosines (18, 216 et 511, ou 18, 216 ,511 et 395) qui inhibent largement la capacité de phagocytose. Quant à leur pouvoir de migration, si les mutants Y^{18}A, Y^{216}A, Y^{720}A présentent un niveau de migration comparable à celui exprimant ELMO WT. Les cellules exprimant le mutant Y^{511}A sont incapables de migrer, ce qui suggère un rôle particulier de la phosphorylation de cette tyrosine située en amont du domaine PH d'ELMO. D'une façon intéressante, les mutations non phosphorylables sur les différentes tyrosines n'affectent pas la capacité d'ELMO à interagir avec DOCK 180 ni la formation du complexe DOCK180/CrkII. De plus, la mutation des tyrosines Y^{18}A, Y^{216}A, Y^{511}A n'affectent pas l'interaction entre DOCK180 et Rac mais influencent l'activation de Rac (Yokoyama et al. 2005). Il faut noter qu'aucune donnée n'est présente dans la littérature sur l'effet des phosphorylations d'ELMO, et que les études publiées ne portent que sur des mutants non phosphorylables.

Le mécanisme par lequel Hck régule le complexe ELMO/DOCK180 et son activité GEF reste à éclaircir. La phosphorylation de différentes tyrosines semble influencer l'activation de Rac, ainsi que la capacité des cellules à effectuer leurs fonctions. La phosphorylation d'ELMO et son interaction avec Hck pourraient en effet moduler l'activation de DOCK180, en particulier dans les cellules des lignées hématopoïétiques.

D. Objectifs de la thèse

Hck joue un rôle dans la phagocytose et la migration cellulaire et il faut noter que des macrophages dépourvus de Hck sont incapables de réaliser une phagocytose efficace. D'autre part, la phagocytose est dépendante, comme nous l'avons vu, de la voie de signalisation CrkII/DOCK180/ELMO.

Les voies de la phagocytose, et en particulier celle des cellules apoptotiques, dépendent des intégrines qui participent au recrutement du complexe $p130^{cas}$/crkII/DOCK180 ce qui permet l'activation de Rac. ELMO est décrit comme un activateur de ce complexe. D'autre part, Hck est un acteur important dans la signalisation de l'intégrine (voir section signalisation dépendant des intégrines), et est également impliquée dans les voies de signalisation en aval du récepteur FcγRII (Suen et al. 1999). Ces données suggèrent qu'ELMO puisse être l'un des substrats de Hck activé suite à la stimulation du récepteur FcγRII. Hck est également un composant des podosomes, qui joue avec ELMO un rôle important dans la régulation de la migration cellulaire.

Le fait qu'ELMO et Hck soient partenaires dans deux fonctions essentielles des phagocytes, la migration et la phagocytose, dont les dérégulations sont à l'origine de plusieurs pathologies, en font des cibles importantes. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée au mode d'interaction d'ELMO avec Hck, son influence sur les fonctions cellulaires et sur l'interaction avec DOCK180. D'autre part, j'ai mis au point une stratégie de TAP-tag qui vise à identifier des nouveaux partenaires potentiels d'ELMO.

II. MATERIELS & METHODES

Les travaux réalisés portent sur deux objectifs essentiels, d'abord caractériser l'interaction d'ELMO avec Hck et ensuite essayer d'identifier de nouveaux partenaires d'ELMO. L'approche utilisée pour répondre au premier objectif consiste à identifier les sites d'interaction, comprendre le mode d'interaction d'ELMO ou de ses sous-domaines avec Hck et plus particulièrement son domaine régulateur SH3 N-terminal, et d'établir une comparaison avec l'interaction d'ELMO de l'activateur de Rac, DOCK180, dont ELMO est le régulateur physiologique principal. Pour atteindre le second objectif, nous avons cherché à développer une nouvelle stratégie basée sur la purification en mode tandem (TAP-tag).

Cette stratégie TAP-tag consiste à purifier des complexes protéiques à partir de lysats de cellules de mammifères qui expriment la construction cible TAP-tag, à l'aide de deux purifications par affinités basées sur deux étiquettes différentes jumelées. L'intérêt ainsi que la mise au point de cette technique particulière sont développés dans la section «III-Résultats et analyses» de ce document. Les différents outils utilisés pour l'application des deux approches sont développés dans les différentes sections de ce chapitre.

A. Biologie Moléculaire

A mon arrivée au laboratoire, les vecteurs d'expression de la protéine ELMO (basés sur la séquence de la protéine murine Q8BPU7) ainsi que ses domaines N-terminal et C-terminal avec ou sans l'extension polyproline avaient été clonés dans des vecteurs permettant leur expression en système procaryote.

Dans le cadre de mon travail, j'ai réalisé un certain nombre de nouveaux clonages d'ELMO ou de certains partenaires et de leurs domaines pour leur expression dans les cellules eucaryotes ou procaryotes. Ces protéines ont été clonées sous formes fusionnées avec des étiquettes spécifiques dont les propriétés seront, comme nous le verrons dans ce chapitre, d'une grande importance dans les expériences de FRET et dans la stratégie de TAP-tag.

Je décrirai ci-contre les techniques générales de biologie moléculaire utilisées ainsi que les détails de la production des constructions particulières que j'ai eu à réaliser.

1. Méthodes générales de biologie moléculaire

a) Transformation bactérienne et préparation d'ADN plasmidique

La transformation bactérienne est le transfert de matériel génétique (ADN plasmidique) à des bactéries réceptrices, dites en état de compétence. Les bactéries compétentes (E.coli : Top10 ou DH5α, préparées au laboratoire et perméabilisées par l'action du $CaCl_2$ et $MgCl_2$) sont mises en présence de 1 à 100ng d'ADN puis incubées pendant 15 minutes sur la glace avant de subir un choc thermique pendant 6 minutes à 37°C. Elles sont ensuite incubées pendant 60 minutes dans du milieu LB à 37°C. Les cultures sont étalées sur des boites de LB-Agar (Invitrogen) en présence de l'antibiotique (Sigma) adéquat et incubées sur la nuit à 37°C.

Les bactéries ainsi transformées poussent et forment des colonies sur les boites de LB-Agar. Une colonie est piquée et mise en culture dans 5ml du milieu LB sur la nuit à 37°C en présence d'antibiotique. La purification d'ADN (Miniprep ou Midiprep) réalisée à partir de cette culture est faite selon le kit de «Nucleo Spin Plasmid» de chez Macherey Nagel en appliquant le protocole du fournisseur.

b) Techniques de sous-clonage : préparation du vecteur et de l'insert

(1) Amplification par PCR

La réaction de polymérase en chaine est une technique enzymatique basée sur la thermo-résistance de la polymérase issue d'organismes hyperthermophiles, qui permet de sélectionner et d'amplifier une séquence d'ADN spécifique *in vitro*, elle est basée sur une répétition de cycles de transition de température pendant lesquels l'ADN cible est amplifié à partir d'amorces spécifiques des brins direct et indirect. Elle comporte 3 étapes essentielles: la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation d'amorces spécifiques et l'élongation des amorces par l'ADN polymérase dans le sens 5'- 3'. Sauf spécification particulière, nous avons utilisé le protocole suggéré par le fournisseur (voir tableau III et IV).

Echantillon	Quantité
Matrice d'ADN	1 ng
Amorce sens	0,5 µM
Amorce anti sens	0,5 µM
DMSO	0,6 µl
H_2O	Qsp 20 µl
Master fusion 2X	10 µl

Tableau III. Préparation de l'échantillon de PCR. Le Master mix 2X Phusion fourni par Finenzymes contient l'ADN polymérase Phusion®, le tampon Phusion® GC approprié et 400µM de chaque dNTP.

Etapes	Température (°C)	Durée
Etape1 : Dénaturation initiale	98	30 secondes
Etape2 : Dénaturation	98	10 secondes
Etape3 : Hybridation	Tm+3	20 secondes
Etape4 : Elongation	72	15s/Kb
Etape5 : Elongation finale	72	5min
	4	1min

Tableau IV. Programme de PCR utilisé pour amplifier les différents vecteurs ADN utilisés pour faire les clonages. Les étapes 2 à 5 sont répétées sur 20 à 35 cycles. Après cette étape, le thermocycleur est maintenu à 15°C jusqu'à son arrêt manuel afin de préserver l'ADN sans dégrader le système de mise de température «Peltier». Tm représente la température de fusion des amorces.

Une fois l'amplification de l'ADN effectuée, l'ADN est déposé sur gel d'agarose où il migre pendant 30 minutes à 100 volts dans un tampon Tris Acétate EDTA (TAE 50X, 2M Tris pH8,3; 5M acétate; 50mM EDTA, Euromedex). Il est ensuite incubé dans un bain du même tampon en présence du bromure d'éthidium (typiquement 0,5µg.ml^{-1}) puis révélé sous UV (350nm) afin de vérifier si l'ADN est bien amplifié.

(2) Par réaction enzymatique simple

Afin de cloner un insert d'un gène donné dans un vecteur de choix, on peut procéder à une digestion des deux par les mêmes enzymes de restriction ou par des enzymes qui génèrent des extrémités compatibles. Cette digestion permet de linéariser le vecteur et de créer des extrémités cohésives ou à bouts francs permettant la ligation avec l'insert préparé de la même manière. Les enzymes de restriction choisies reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN (sites de restriction). Ces sites peuvent déjà exister dans les séquences d'ADN ou être introduites par PCR en choisissant les amorces convenables (section II-A.1.b.1).

L'ADN (1 à 2 µg) est digéré par l'enzyme de restriction dans un tampon optimal pendant une heure à 37°C en présence de BSA selon les recommandations du fournisseur (sauf mention spécifique, New-England Biolabs). Dans le cas des digestions simultanées (double digestion), il faut choisir un tampon compatible avec les deux enzymes. Le cas échéant, la première digestion est réalisée dans un premier temps puis l'ADN est déposé sur gel d'agarose (Invitrogen) et purifié selon le kit de «Nucleospin Gel and PCR clean-up» de Macherey Nagel. Ensuite, on procède à la deuxième digestion de la même manière.

(3) Insertion par clonage topo

L'insert double brin venant d'une PCR est sous-cloné dans le vecteur pCRTM-Blunt II- TOPO® grâce au kit zero Blunt® TOPO® PCR Cloning kit. Cette technique est basée sur l'activité de la topoisomérase1 qui génère des coupures transitoires dans l'ADN tout en catalysant le passage d'autres segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. L'insertion de l'ADN dans le vecteur TOPO permet d'ajouter de nouveaux sites de restriction qui étaient absents dans le plasmide d'origine (Figure 16), et permettent également de cloner directement les fragments issus des PCR dont les digestions directes des extrémités peuvent être peu efficaces.

Pour cloner l'insert d'ADN dans le vecteur TOPO, selon les recommandations du fournisseur on prépare un mélange de 4µl de produit de PCR purifié avec 1µl de vecteur TOPO et 1µl de la solution saline (1,2M NaCl; 60mM MgCl2) du fournisseur.

Le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. Ensuite 100µl de bactéries compétentes (E. coli) seront transformées par ce mélange et étalées sur des boites LB-Agar en présence de Kanamycine (15µg.ml^{-1}).

L'ADN est ensuite purifié à partir de cultures bactériennes (section II-A.1.a) L'ADN purifié est ensuite digéré par des enzymes de restriction afin de générer des fragments cohésifs (section II-A.1.b).

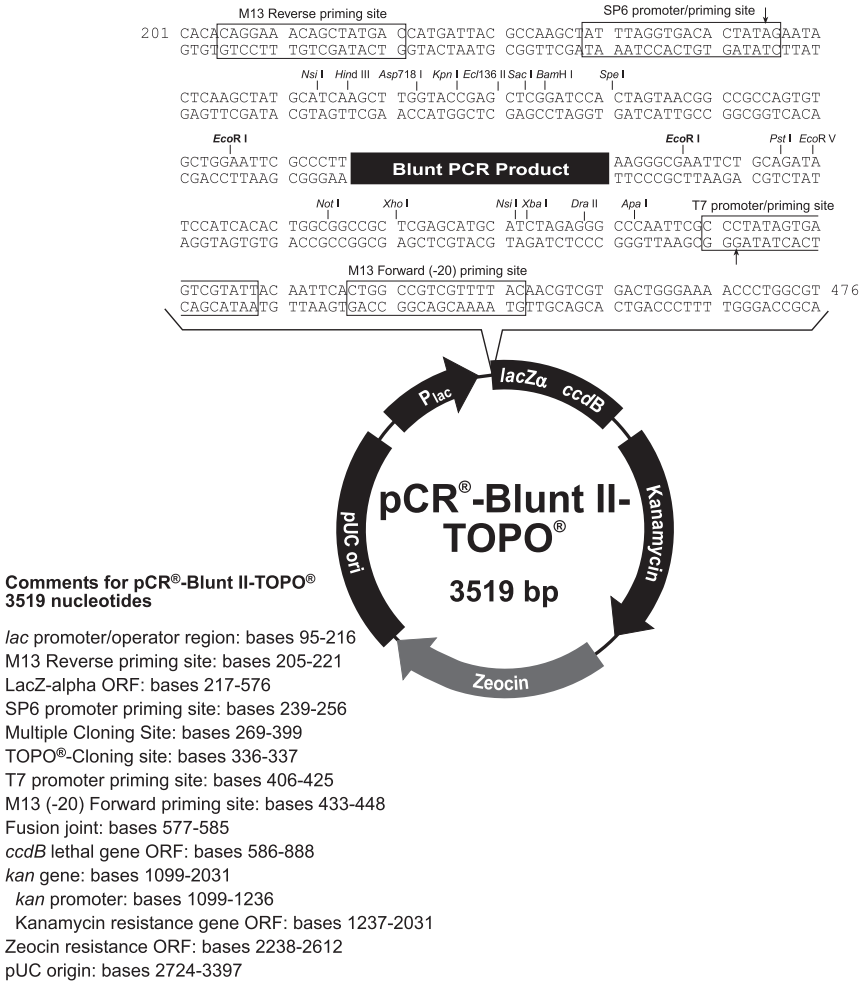


Figure 16. Carte du vecteur pCR™-Blunt II-TOPO (Invitrogen)
L'insert est sous-cloné dans le vecteur pCRTM-BluntII-TOPO, les sites de restriction du vecteur peuvent être utilisés selon le besoin pour générer l'insert après digestion et purification.

c) *Ligation*

(1) Déphosphorylation du vecteur

Pour empêcher le vecteur linéarisé de se religuer sur lui même, il est traité avec la phosphatase alcaline («Alkaline Phosphatase, Shrimp» de Roche). Cet enzyme élimine les groupements phosphate présents aux extrémités 5' du vecteur linéarisé, ce qui empêche la ligase de catalyser la formation de la liaison phosphodiester entre les extrémités déphosphorylées du vecteur. La réaction a lieu pendant une heure à 37°C. Une fois la réaction terminée, l'ADN est purifié en utilisant le kit «Nucleospin Gel and PCR clean-up» de Macherey Nagel selon les recommandations du fabriquant.

(2) Ligation entre le vecteur linéarisé et l'insert

Pour les extrémités cohésives, la ligation débute par l'hybridation (formation de liaisons hydrogènes) entre les extrémités cohésives complémentaires, suivant les lois de complémentarité des bases (A/T et C/G).

La ligase va créer des liaisons phosphodiester entre les extrémités 3'-OH du plasmide linéarisé et déphoshorylé avec les extrémités 5'-P de l'insert rendues adjacentes par l'hybridation des extrémités cohésives. Le plasmide obtenu, de nouveau circulaire, est dit recombinant s'il a intégré un insert.

La ligation du vecteur avec l'insert se fait avec un rapport molaire vecteur/insert de 1/3. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être transformé dans des bactéries compétentes E.coli (Quick-ligase kit de New-England Biolabs selon les recommandations du fabricant). Un contrôle avec le vecteur linéarisé et déphosphorylé sans insert est réalisé en même temps pour éliminer des faux positifs dus à la circularisation du vecteur sur lui-même.

L'ADN purifié à partir des colonies obtenues est d'abord vérifié par digestion contrôle (pour s'assurer qu'il contient l'insert) avant de le séquencer (Macrogen).

2. Clonage d'ELMO et de ses domaines dans le vecteur pTAP-SNAP PxxS WT

Les différents domaines d'ELMO sont amplifiés selon le protocole décrit dans la section II-A.1 en utilisant les amorces décrites dans le tableau suivant.

Nom des amorces	**Séquence**	**Tm (°C)**
ELMO-αpH-Xho1-F (1)	ACTCGAGAAGATTTCCAGTCTCGC	57,4
ELMO-TAG-BamH1-R (2)	GTTATCTAGATCCGGTGGATCCC	57,1
ELMO-ATG-Xho1-F (3)	CTGTACAAGTCTCGAGTCAGATCT	55,7
ELMO EAD-BamH1-R (4)	CGGAGGTGGATCCGGGATCTAGATGTT	64,4

Tableau V. Amorces des PCR. les amorces 2 et 3 sont utilisés pour amplifier l'ADN d'ELMO complet, les amorces 3 et 4 pour l'ADN ΔC (N-terminal), les amorces 1 et 2 pour l'ADN ΔN(C-terminal), et finalement les amorces 1 et 4 pour l'ADN ΔN-ΔPxP (C-terminal sans le domaine polyprolines), elles sont utilisées à une concentration finale de 1 µM.

Les différents inserts sont ensuite clonés par la méthode de sous-clonage en TOPO (section II-A.1.b.3).

3. Clonage d'ELMO et des domaines dans le vecteur pmGFPC1

Les clones GFP ELMO sont obtenus en se basant sur les vecteurs pTAP-SNAP ELMO décrits dans la section B ci dessous et le vecteur pmGFPC1 par digestion enzymatique simple et ligation (Section II-A.1.b.2 et A.1.c)

4. Clonage des inserts SH3 de Hck et SH3 de DOCK180 dans le vecteur pCLIP C1

Les inserts SH3 de Hck et DOCK180 sont amplifiés par PCR selon le protocole suivant à partir des vecteurs pGEX SH3 de Hck et pGEX SH3.1 respectivement. Une fois les inserts amplifiés, ils sont préparés ainsi que le vecteur pCLIP-C1 comme décrit dans les sections (A.b.2 et A.c) de ce chapitre.

	Nom des amorces	**Séquence**	**Tm (°C)**
Hck	FOR Precission Xho	TCGA CTGGAAGTTCTGTTC	55,2
	REV -SH3	TTATGTCTCCAGAGAG	45,6
DOCK 180	FOR DOCK-TEV-Xho	TCGACTGGTTCCGCGTGG	60,7
	REV DOCK-SH3	GGGTTAGGGTCTCAC	48,8

Tableau VI. Amorces utilisées pour amplifier les ADN des 2 domaines SH3 de Hck et de DOCK180.

Etapes	**T (°C)**	**Durée**
Etape 1 : Dénaturation initiale	98	30 secondes
Etape2 : Dénaturation	98	10 secondes
Etape3 : Hybridation	58	20 secondes
Etape 4 : Elongation	72	15 secondes
Etape 5 : Dénaturation	98	10 secondes
Etape 6 : hybridation	63	20 secondes
Etape 7 : Elongation finale	72	15 secondes
	15	0 secondes

Tableau VII. Programme de PCR utilisé pour amplifier les inserts SH3 de Hck et le SH3 de DOCK180 utilisés pour faire les clonages. Les étapes 2 à 4 sont répétées sur 5 cycles et les étapes 5 à 7 sont répétées sur 30 cycles. Après cette étape, le thermocycleur est maintenu à 15°C jusqu'à son arrêt manuel afin de préserver l'ADN sans dégrader le système de mise de température «Peltier».

5. Clonage de SH3(Hck) dans le vecteur pmCherry C1 et CLIP dans pTAP-SNAP C1

Le vecteur pmCherry SH3 de Hck est obtenu à partir du vecteur pCLIP SH3 de Hck en changeant l'étiquette CLIP par la séquence de la protéine fluorescente mCherry. L'étiquette

CLIP est insérée dans le vecteur pTAP-SNAP C1 pour former une protéine de fusion CLIP-SNAP par digestion enzymatique simple (section II-A.1.b.2 et A.1.c).

6. Clonage du vecteur GST-CBP-TEV-Protéine A

Le domaine CBP-TEV-Protéine A est sous-cloné après digestion enzymatique du vecteur pZome1-C. Ce domaine est ensuite inséré par ligation dans le vecteur pGEX4T3 préalablement digéré avec les mêmes enzymes.

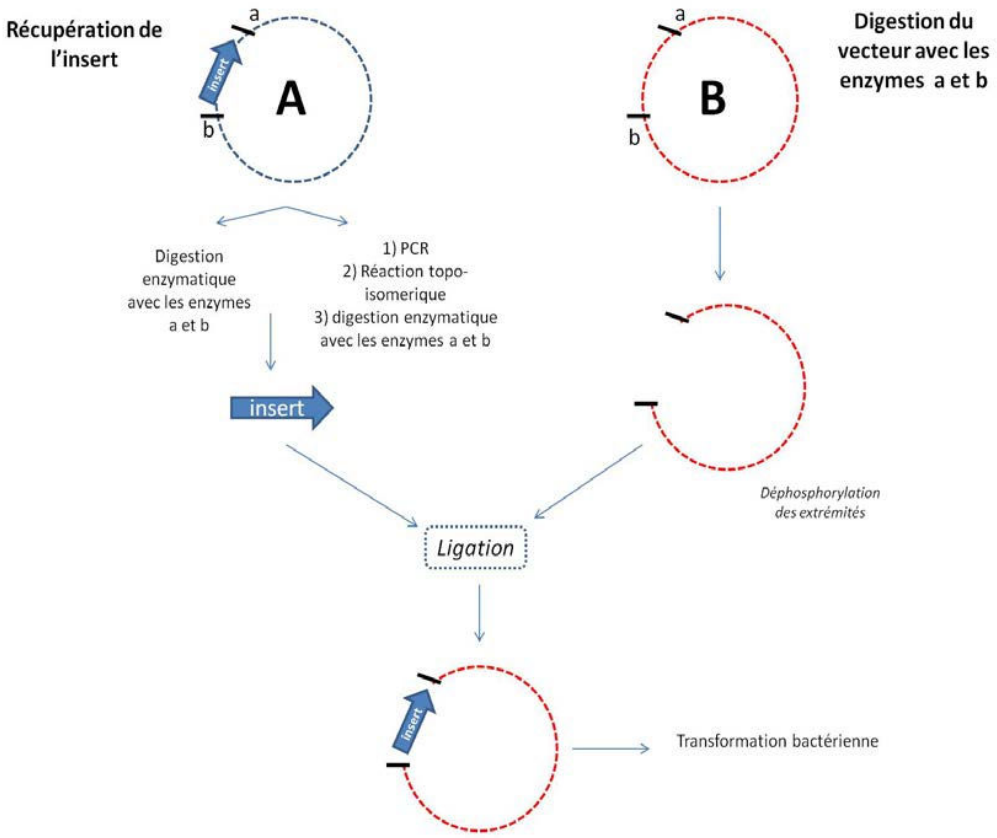


Figure 17. Méthode générale du clonage
Méthodologie générale appliquée pour la réalisation des différents plasmides. L'insert se trouvant dans le plasmide A est récupéré directement par digestion enzymatique ou après la réalisation de la réaction TOPO qui permet de créer les sites de restriction voulus pour réaliser ensuite la digestion. Le plasmide B est digéré avec les mêmes enzymes puis déphosphorylé. L'insert récupéré est ensuite placé dans le plasmide B par ligation.

B. Biologie cellulaire

1. Culture des cellules eucaryotes

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée HEK293T (Human embryonic kidney cells). Nous avons choisi cette lignée pour sa capacité à réaliser la phagocytose, ainsi qu'à être aisément transfectée pour surexprimer d'une façon transitoire ou stable des protéines d'intérêt et ainsi étudier leurs interactions dans le contexte physiologique, ou après purification. Les cellules seront marquées (Section II-D.6.a.2) et utilisées pour réaliser des expériences de FRET (Section II-D.6).

a) Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont stockées à long terme dans l'azote liquide, en suspension dans du sérum de veau fœtal et 7,5% de DMSO. Après décongélation, elles sont cultivées dans du milieu DMEM complet (Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax, Invitrogen) dans un incubateur à 37°C sous 80% d'humidité en présence de 5% de CO_2. Le milieu de culture est complémenté par ajout du sérum de veau fœtal 10% et des antibiotiques (solution de pénicilline-streptomycine 1%, Invitrogen).

b) Mode de culture

Pour la multiplication des cultures, les cellules confluentes sont lavées avec du PBS préalablement chauffé, puis décollées à l'aide de la trypsine-EDTA (Invitrogen). L'action de la trypsine est bloquée par ajout du milieu complet, les cellules sont ensuite récupérées et centrifugées pendant 5 min dans une centrifugeuse à godets mobiles (900g, température ambiante). Elles sont remises dans du milieu DMEM complet en les diluant au 1/10ème.

2. Transfection des cellules

a) Principe

La transfection des cellules eucaryotes consiste en l'introduction d'un ADN plasmidique dans les cellules en culture. Le but est de faire exprimer par la machinerie de la cellule le gène choisi, souvent fusionné avec une étiquette (tag) spécifique. Cette surexpression va

permettre la traduction soit d'une protéine endogène modifiée (mutants ponctuels ou de délétions) ou d'une protéine normalement absente de la cellule, permettant ensuite une étude *in situ*, ou à partir d'un lysat protéique.

Il existe plusieurs méthodes de transfection : parmi les plus classiques, l'électroporation, la transfection par le phosphate de calcium ou par les liposomes artificiels. La transfection établie peut être transitoire ou stable.

Dans une transfection transitoire, l'ADN est dans le noyau où il peut être transcrit mais n'est pas intégré dans le chromosome. Cependant puisqu'il n'est pas intégré, il peut être perdu au cours des divisions cellulaires. L'analyse doit donc être faite rapidement ; classiquement entre 24 à 72 heures après transfection. Dans une transfection stable, on sélectionne les cellules qui ont intégré le gène de résistance porté par le plasmide. La sélection se fait grâce à l'antibiotique correspondant. Seules les cellules exprimant cette résistance et capables de transmettre l'ADN exogène aux cellules filles seront capables de proliférer dans un milieu contenant cet antibiotique, les autres cellules vont mourir. Parmi ces cellules résistantes, certaines exprimeront également la protéine choisie, codée par le même plasmide. L'intérêt est de créer une population cellulaire qui exprime d'une façon stable le gène de la protéine étudiée et s'affranchir du taux de transfection parfois limitant dans les transfections transitoires. De plus, l'expression stable est souvent plus proche des taux d'expression physiologiques des protéines étudiées.

b) Transfection transitoire d'ADN

La méthode de transfection choisie au laboratoire utilise les liposomes artificiels. L'agent de transfection est le Jet Prime (Polyplus). Nous avons appliqué le protocole recommandé par le fournisseur en modifiant les quantités d'ADN et de produit Jet Prime utilisés afin d'optimiser la transfection pour notre modèle cellulaire (tableau VIII). En bref, les cellules sont mises en culture le jour de la transfection à la concentration indiquée dans le tableau ci-dessous. L'ADN est ensuite dilué dans le tampon «Jet Prime» fourni, mélangé vigoureusement (vortex) puis centrifugé. On ajoute ensuite le réactif. Le mélange est mélangé brièvement, centrifugé rapidement puis maintenu à température ambiante pendant 10min. Il est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu (DMEM en présence de sérum) des cellules en culture. Quatre heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM complet frais.

Récipient	Nb de cellules	Tampon Jet-prime (µl)	Réactif Jet-prime (µl)	ADN (µg)	Volume final du milieu
24 puits	100 000	1	50	0,5	500 µl
6 puits	300 000	4	200	2	2 ml
100 mm	1000 000	20	500	10	10 ml

Tableau VIII. Différentes conditions utilisées pour la transfection des HEK293T.

c) Transfection stable des cellules HEK293T

Les cellules HEK293T sont transfectées avec les vecteurs pTAP-SNAP ELMO (Séquence complète) ainsi que ses différents domaines (*Cf.* figure 44 dans le chapitre «Tandem-Affinity Purification» des résultats). Elles sont sélectionnées 48 h après leur transfection avec 1mg/ml de G418 pendant deux semaines, le milieu est renouvelé et l'antibiotique ajouté à la même concentration toutes les 48 heures. Les cellules sont ensuite diluées à une concentration de 0,7 cellules/50µl pour obtenir une dilution limite, puis réparties dans une plaque de 96 puits par fractions de 50µl afin d'établir des clones à partir d'une cellule unique. Une fois confluentes, elles sont transférées dans une plaque de 6 puits et finalement dans une boite de 10cm.

Les clones établis sont ensuite sont vérifiés par western blot spécifique de l'étiquette SNAP. A ces fins, les cellules sont reprises dans le tampon de lyse (20mM Hepes, 150mM NaCl, 0,5% triton, 5% glycérol pH=7,5 en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases) et incubées pendant 30 min sur la glace. Elles sont ensuite centrifugées pendant 5 min dans une centrifugeuse à angle fixe à vitesse maximale. Le surnagent est récupéré puis déposé sur gel SDS polyacrylamide afin d'être analysé par western blot en utilisant l'anticorps anti-SNAP (New England Biolabs, Section II-D.1.a).

C. Biochimie

1. Production de protéines

Les différentes constructions d'ELMO (Figure 18) ont été clonées au laboratoire par Marion Sévajol durant sa thèse. La construction de pGex-Tev-SH3.1 a été produite par Julien Pérard. La construction GST-SH3 de Hck a été fournie par Sophie Feuerstein (groupe de RMN, IBS).

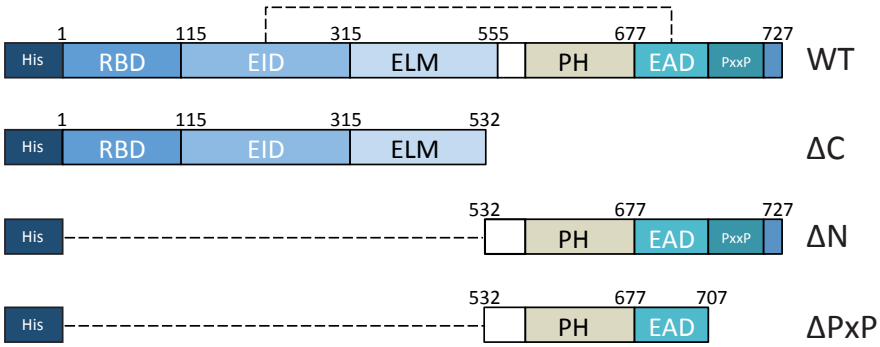


Figure 18. Constructions représentant les différents domaines d'ELMO.
Sont représentés la protéine complète (WT), le domaine N-terminal (ΔC), le domaine C-terminal (ΔN), le domaine C-terminal sans le domaine polyproline (ΔPxP) utilisés dans la suite de ce travail. RBD : Rho binding domain ; EID : ELMO inhibithory domain ; PH : Pleckstrin Homology ; EAD : ELMO autoregulatory domain ; PxxP : polyproline.

Nom	**Etiquette**	**Masse molaire (kDa)**	**Coefficient d'extinction ε (0,1%)**	**Vecteur d'expression bactérienne**	**Résistance**	**Fragment (séquence protéique)**
ELMO WT	6HIS	87,36	0,775	pPROEX-HTb	Amp	1-727
ELMO ΔC	6HIS	64,7	0,734	pPROEX-HTb	Amp	1-532
ELMO ΔN	6HIS	26,2	0,995	pPROEX-HTb	Amp	532-727
ELMO ΔN-ΔPxP	6HIS	24	0,962	pPROEX-HTb	Amp	532-707
SH3 de Hck	GST	7,53	2,3	PGEX-TEV	Amp	77-141
SH3 de DOCK180	GST	7,15	2,2	PGEX-TEV	Amp	9-69

Tableau IX. Table des différentes protéines ainsi que leurs caractéristiques principales, produites et purifiées au cours de ce travail.

a) Surexpression des protéines

Des bactéries BL21 DE3 sont transformées par choc thermique avec les différentes constructions d'ADN mentionnées ci-dessus puis étalées sur des boites de LB Agar plus antibiotique. Une colonie est mise en culture dans 50mL LB plus antibiotique sur la nuit à 37°C sous agitation. Des cultures de 1l, toujours en milieu sélectif, sont inoculées au 1/50ème à partir des pré-cultures à saturation à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique (DO) à 600nm comprise entre 0,6 et 0,8. Elles sont ensuite induites avec de l'IPTG 1mM final pendant 3 heures à 37°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 6000 g pendant 15 min et gardées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

b) *Extraction des protéines*

Toutes les protéines utilisées dans le cours de ma thèse ont été produites sous forme soluble. Le culot est repris dans le tampon de lyse à raison de 20 ml pour 1l de culture initiale, supplémenté par de la DNAse (Sigma) à 25 µg/ml et d'un cocktail antiprotéases (Complete®, Roche Diagnostics). Dans le cas des constructions des domaines SH3, on utilise (50mM Hepes, 100mM Nacl, 10mM EDTA pH=7,5) alors que pour les domaines d'ELMO ou le domaine C-terminal en complexe avec le SH3 de DOCK180 le tampon utilisé est le PBS (25mM Phosphate de sodium pH8, 140mM NaCl, 10mM KCl).

Le mélange de lyse est ensuite soniqué pendant 3 minutes à 60% de la puissance, puis centrifugé pendant 30 minutes à 45000g. Le surnageant contient les protéines solubles extraites.

c) *Purification des protéines*

Pour purification de la protéine d'intérêt, le surnageant de lyse est déposé sur une colonne spécifique de l'étiquette de fusion utilisée. Les domaines SH3 ayant une étiquette GST sont purifiés sur une colonne Protino-Gluthation Agarose 4B (Macherey-Nagel) pré-équilibrée avec le tampon de lyse. On fait passer le surnageant de lyse 3 fois de suite sur la colonne afin d'optimiser la rétention de la protéine d'intérêt, puis on lave avec 30 CV (CV: volumes de colonne) de tampon de lyse. En cas de besoin, la protéine est éluée de la colonne avec le tampon d'élution (100 mM Tris-HCl pH=8, 20mM Glutathion réduit GSH). Si la protéine est utilisée sur la colonne (par exemple en pull-down, section D.10), la colonne non éluée est conservée dans le tampon de lyse à 4°C en présence d'inhibiteurs de protéases jusqu'à son utilisation.

Les domaines d'ELMO ayant une étiquette hexa-Histidines sont purifiés sur colonne de nickel (Ni-NTA, Qiagen) de la même manière que celle décrite dans le paragraphe précédent. La colonne est ensuite lavée avec un volume de tampon PBS équivalent à 10 fois le volume de la colonne. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 0% à 25 % d'imidazole 2M préparé dans le PBS. L'imidazole entre en compétition avec les étiquettes hexa-Histidines pour le nickel porté par la résine, ce qui permet l'élution des protéines. Les fractions d'élution sont ensuite rassemblées et dialysées contre du PBS porté à pH=8 (pour éliminer les traces d'imidazole) et conservés à -20°C.

Afin d'évaluer la qualité de la purification, des échantillons correspondant aux différentes étapes de purification sont déposés pour migrer sur gel SDS-polyacrylamide. La révélation est faite par coloration du gel au bleu de Coomassie.

d) Clivage de l'étiquette GST du GST SH3 de Hck

Il existe en 3' de la séquence de la GST du vecteur pGEX-SH3 de Hck un site de clivage spécifique de la protéase Precission 3C (Figure 19). L'activité de la Precission, une protéase à cystéine ayant comme origine le Rhinovirus Humain, permet de produire du SH3 de Hck dépourvu de son étiquette.

Afin de cliver le domaine SH3 de Hck de son étiquette GST, on agit directement sur la résine de glutathion sur laquelle est chargée la protéine. La résine est d'abord dosée et diluée avec de la résine vierge pour avoir une concentration finale de 8mg/ml. On équilibre la résine en «batch» avec 10 mL de tampon de clivage (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT pH=7).

La résine est ensuite resuspendue dans 1mL le tampon de clivage par mL de résine auquel on ajoute 100 µl de la protéase Precission. La digestion est réalisée pendant 4 heures à 4°C.

Une fois la digestion terminée, on centrifuge pendant 5 min à 500 g pour récupérer la protéine, puis on lave avec 3CV. Les différentes fractions sont déposées sur gel et celles contenant la protéine sont regroupées et gardées à 4°C. La Précission étant exprimée elle même sous forme de fusion avec la GST, elle est retenue par la colonne, et on ne récupère que le SH3 clivé dans le surnageant de clivage.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGD
VKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLS
KLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI
PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFQGPLGSEDIIVVALYDYEAIHHE
DLSFQKGDQMVVLEESGEWWKARSLATRKEGYIPSNYVARVDSLET*

Figure 19. Séquence de la protéine GST SH3 de Hck
la séquence marquée en rouge correspond au site de clivage de la Precission 3C.

e) Détermination de la concentration des protéines

La concentration d'une protéine (si elle possède suffisamment de résidus aromatiques) peut être déterminée directement à partir de l'absorbance à 280nm en utilisant le coefficient d'extinction spécifique E (0,1%) calculé selon la formule suivante :

$$E(0{,}1\%) = \varepsilon_{280nm} \cdot \frac{1}{M}$$

*où M est la masse molaire de la protéine, et **ε** le coefficient d'extinction molaire*

Le coefficient d'extinction molaire théorique est utilisé. Il est obtenu aisément par le programme protparam (Wilkins et al. 1999) disponible sur le serveur Expasy (http://web.expasy.org/protparam/). Les mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre nanodrop™ qui fournit les concentrations en prenant en compte la valeur E (0,1%).

f) Préparation de la GST-Precission

La surexpression de la protéine est réalisée comme décrit dans la section (C.9.a). Le culot est repris dans le tampon de lyse (PBS, 0,5% triton ,5mM DTT pH=7.3), soniqué pendant 3 minutes à 60% de la puissance maximale puis centrifugé pendant 30 minutes à 45000g (4°C). La purification de la protéine est faite comme décrit dans la section (C.9.c). Après élution, la protéine est dialysée sur la nuit contre le tampon (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT) puis stockée dans le même tampon en présence de 20% glycérol à -20°C.

D. Méthodes d'étude des interactions entre les protéines

1. «Pull-down»

Les «pull-down» permettent d'identifier un partenaire d'une protéine préalablement immobilisée sur une colonne. Nous avons utilisé cette technique pour définir les domaines d'ELMO capables d'interagir avec différents domaines SH3 produits et immobilisés sous forme de fusion avec la GST. En pratique, les protéines de fusion sont produites et immobilisées sur une colonne Glutathion Sepharose dans le tampon Hepes (50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM EDTA 1% triton 10% glycérol pH=7,5). Elle est ensuite dosée et les

échantillons de résine sont standardisés par dilution à 1mg de protéine par mL de résine avant utilisation.

Les domaines d'ELMO, N-terminal, ΔN, ΔN-ΔPxP ainsi que ELMO WT exprimés en fusion avec une étiquette hexa-Histidines sont élués et dialysés contre le PBS puis dilués dans le tampon Hepes (50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM EDTA 1% triton 10% glycérol pH=7,5) afin d'obtenir une concentration standardisée de 1μM de la protéine dans 50µl final. La protéine ainsi diluée est mise sous agitation lente à 4°C pendant 1 heure puis on centrifuge (20000g 4°C) pendant 5 minutes afin de faire tomber tous les précipités qui peuvent s'être formés pendant l'incubation précédente et peuvent interagir avec la résine de façon aspécifique. En parallèle, on prend 50µl de la résine chargée par les constructions GST-SH3 que l'on place dans des colonnes micro-spin (Thermo Scientific Pierce). Après équilibre dans le tampon Hepes, on incube la résine avec 50µl de la solution à 1μg/µl de protéine ELMO (ou de ses sous-domaines) pendant une heure à 4°C.
Après 3 lavages avec 5CV du tampon, on fait une première élution avec 50µl (50mM Tris, 10mM glutathion réduit pH=8) puis une seconde élution avec 50µl du bleu de dépôt concentré 2x (tampon de charge d'électrophorèse en conditions réduites, voir ci-dessous).
Les différentes fractions sont déposées sur gel, séparées par électrophorèse, transférées puis analysées par western blot. Ces étapes sont décrites dans le paragraphe suivant.

a) SDS et western blot

(1) Electrophorèse sur gel

Les échantillons sont dénaturés dans le tampon de charge d'électrophorèse (contenant du SDS et du ß-mercaptoéthanol) pendant 5 min à 98°C. Puis ils sont soumis à une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) selon le protocole classique dérivé des travaux originaux de Laemmli (Laemmli 1970).

(2) Western blot.

Après électrophorèse, les protéines séparées dans le gel sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene Di-Fuoride) ou de nitrocellulose par transfert semi-sec. Le transfert est réalisé entre les deux électrodes planes à travers une succession de papiers filtres imbibés de la solution d'électrolyte. Six papiers filtres sont imbibés dans le tampon A (voir

tableau X), et 6 autres dans le tampon C. La membrane et 3 papiers filtres sont imbibés dans le tampon B (dans le cas d'une membrane PVDF, la membrane est préalablement mouillée dans du méthanol et rincée à l'eau avant d'être mise en présence du tampon B).

	0,4M acide ε-aminocaproic **0,25M Tris base**	**1,25 M Tris base**	**Isopropanol**	**H_2O**
A	12,5ml	0ml	25ml	87,5ml
B	0ml	2,5ml	25ml	100ml
C	0ml	25ml	25ml	75ml

Tableau X. Composition des tampons de transfert utilisés pendant le Western-Blot.

La membrane est déposée entre les papiers filtres sous forme d'un sandwich composé respectivement de 6 papiers filtres C puis 3 papiers filtres B puis la membrane puis le gel et finalement 6 papiers A selon le diagramme suivant (Figure 20).

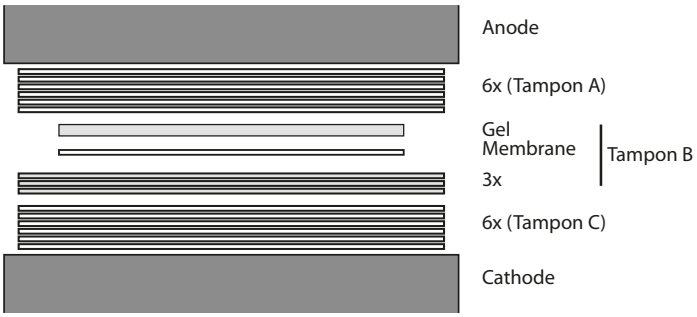


Figure 20. Montage pratique du western blot
Diagramme de l'assemblage des papiers filtres, du gel d'acrylamide et de la membrane de transfert dans un transfert semi-sec.

Le transfert est réalisé à température ambiante pendant 1 heure à 45mA par gel à l'aide d'un appareil de transfert (ECL semi-dry, Amersham/GE Healthcare).

La membrane est ensuite saturée dans une solution contenant 5% de lait écrémé dans le tampon «TNT-Low» (100mM Tris pH=7,5 ; 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) pendant une heure à température ambiante. Elle est ensuite lavée à 3 reprises avec le TNT-Low avant d'être incubée avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C à la dilution recommandée selon l'anticorps utilisé (Voir tableau des anticorps ci dessous).

Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution Ac primaire	Dilution Ac secondaire
Anti-SNAP (New England Biolabs)	Anti-lapin (Sigma)	1/1000	1/5000
Anti-ELMO N-20 (Santa Cruz Biotechnology)	Anti-chèvre (Epitomics)	1/1000	1/5000
Anti-histidine couplé Hrp (Sigma)	Non applicable	1/2000	Non applicable
Anti-GSTcouplé Hrp (Sigma)	Non applicable	1/2000	Non applicable

Après trois lavages de 5 min avec une solution de «TNT-High» (100mM Tris pH=7,5 ; 150mM Nacl, 0,5% Tween 20), elle est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué à la dilution de travail (voir tableau des anticorps) dans du TNT-Low.

Après 6 lavages de 5 minutes en TNT-High, la révélation s'effectue à l'aide du Kit du chimioluminescence ECL, et exposition de film photographique ou alternativement utilisation d'un lecteur de chimioluminescence (BioRad).

2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Principe

La RMN se révèle une méthode particulièrement efficace pour cartographier les régions d'interaction entre macromolécules. Pour cela, il est nécessaire d'enregistrer un spectre à deux dimensions HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) d'une protéine uniformément marquée à l'azote ^{15}N en absence et en présence d'un partenaire biologique non marqué comme un ADN, un ARN, une autre protéine, ou encore un petit ligand chimique. Le spectre 2D HSQC ^{1}H-^{15}N permet de corréler chaque azote avec le ou les hydrogènes qui lui sont liés covalemment, chaque pic correspond à l'interaction magnétique de l'azote en fonction de celle du proton provenant du même groupement amide[3]. Il constitue en quelque sorte l'empreinte de la protéine. L'environnement électronique des protons module leurs fréquences de résonance qui varient de quelques parties par million (ppm) par rapport à une fréquence de référence. La valeur de la fréquence de résonance rapportée à une fréquence de référence et exprimée en ppm est appelée déplacement

[3] L'amide est une molécule contenant un groupement carbonyle C=O lié à une amine NH_2. Les acides aminés adjacents dans une molécule protéique sont liés par des groupements amides

chimique. Les déplacements chimiques des protons NH sont particulièrement sensibles à leur environnement (pH, température, proximité d'autres atomes dans l'espace). Ainsi, il est possible de visualiser la surface impliquée dans l'interaction grâce aux signaux modifiés par l'ajout du partenaire.

Les expériences de RMN ont été réalisées en collaboration avec Pierre Gans du groupe RMN à l'IBS.

b) Préparation de protéines marquées

Le principe du marquage isotopique consiste à faire produire la protéine par surexpression dans un milieu minimum dont la seule source de l'isotope choisi, l'azote par exemple, est apportée par le ^{15}N-chlorure d'ammonium. Le domaine protéique SH3 de Hck, marqué à l'azote lourd ^{15}N, a été produit par surexpression dans des bactéries E. Coli cultivées dans du milieu minimum M9 supplémenté par du glucose, du $MgSO_4$, du $CaCl_2$,$MnCl_2$, $ZnSO_4$,$FeCl_3$ et des vitamines. Les peptides du domaine polyproline d'ELMO D28N, phosphorylé ou sauvage, ont été synthétisés chimiquement et fournis par la société Protéogenix.

Les spectres ^{15}N-HSQC ont été enregistrés avec un échantillon de la protéine SH3 marquée à une concentration de 100µM auquel on ajoute jusqu'à 55 équivalents du peptide polyproline afin de saturer l'interaction. Les spectres RMN ont été enregistrés à 25°C sur un spectromètre Varian Inova 800MHz. Toutes les expériences RMN ont été acquises en utilisant des séquences d'impulsion standard fournies dans le «Varian Protein Pack» (disponible sur www.varianinc.com) avec une durée expérimentale comprise entre 42 et 44 minutes. Les données ont été traitées et analysées grâce à la suite logicielle nmrPipe/nmrDraw par P. Gans.

Les mesures de déplacement chimiques ont été réalisées par Pierre Gans, ces mesures correspondent à la distance entre la position initiale d'un résidu contenant au moins un NH lorsqu'il est seul par rapport à sa nouvelle position une fois qu'elle se trouve avec un partenaire.

3. Chromatographie d'exclusion stérique SEC-MALLS

a) Principe

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode qui permet de séparer les macromolécules suivant leurs tailles ou plus exactement leur volume hydrodynamique en

solution. Pour cela, les solutions de polymères sont injectées puis éluées sur des colonnes remplies de matériaux poreux non adsorbant. A la sortie de la colonne (colonne de filtration sur gel superdex 200 GE Healthcare), les fractions sont détectées en fonction de leurs propriétés. La SEC classique à simple détection de concentration (indice de réfraction et UV) ne permet pas la détermination du poids moléculaire absolu. L'ajout d'une deuxième détection par diffusion de la lumière multi-angles sensible aux masses molaires permet d'accéder aux variations instantanées du rayon de giration et de la masse molaire moyenne de l'espèce éluée à chaque temps d'élution et de remonter à la distribution massique globale. Le principe de cette méthode est que l'intensité de la lumière diffusée (I_d) est proportionnelle à la masse du composé, mais aussi au paramètre $dn/_{dc}$ (variation de l'indice de réfraction avec la concentration), selon la formule :

$$I_d = K.C.\left(dn/_{dc}\right)^2.M$$

Où K est une constante d'appareillage et C la concentration.

Ainsi, si on connait la valeur $dn/_{dc}$ on peut calculer la masse molaire.

b) *Préparation des échantillons*

Nous avons utilisé cette méthode pour étudier l'interaction des domaines ΔN et ΔC d'ELMO avec le domaine SH3 de Hck. Le SH3 de Hck est produit comme décrit dans la section (II-C.1.c), de même les domaines d'ELMO sont produits dans du PBS comme décrit précédemment (section II-C.1.c). Toutes les protéines sont dialysées contre le tampon (50mM Hepes, 100mM NaCl et 10mM EDTA pH=7,5) puis incubées ensemble pendant une heure à 4°C avant injection dans la colonne.

4. Spectrométrie de masse

a) *Principe*

La spectrométrie de masse est une méthode d'identification de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans un échantillon. Une petite partie de l'échantillon est transformée en ions. Ces derniers

sont ensuite soumis à des champs électriques et éventuellement magnétiques et leur trajectoire dépendra du rapport entre leur masse et leur charge ($^{m}/_{z}$).

Elle dépend d'une première étape d'ionisation où l'échantillon est porté à l'état gazeux ou liquide et ionisé dans la source de l'appareil. Ils sont ensuite accélérés et focalisés par des lentilles électroniques pour accroitre leur énergie cinétique. Puis ils sont séparés suivant leur rapport m/z par l'analyseur et finalement détectés par le capteur.

b) Expérience et préparation d'échantillons

Les expériences de spectrométrie de masse sont réalisées en collaboration avec Elisabetta Boeri-Erba dans la plateforme de spectrométrie de masse à l'IBS. Le but est de détecter l'absence ou la présence d'un complexe potentiel entre le SH3 de Hck, le domaine C-terminal (ELMO ΔN) et le domaine N-terminal d'ELMO (ELMO ΔC). Les protéines purifiées sont contrôlées par électrospray afin d'évaluer la qualité du spectre obtenu avant la réalisation de la manipe.

Vu les problèmes rencontrés avec l'Hepes, le NaCl et le PBS lors des analyses en spectrométrie de masse, des tests d'expression ont été réalisés afin de produire les protéines dans un tampon à base de Tris avec des quantités minimales de NaCl. Les protéines sont exprimées comme décrit dans la section II-C.1.a. Le culot est ensuite lysé soit dans le tampon A (20mM Tris, 20mM NaCl pH=8) ou le tampon B (20mM Tris, 100mM NaCl pH=8) puis purifiées sur une colonne Ni-NTA comme décrit dans la section C.9.c. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 0% à 25% d'imidazole 2M préparé soit dans le tampon A ou le tampon B ou dans le tampon 20mM Tris pH=8 dépourvu de sel. Les différentes fractions sont ensuite analysées par électrospray dans la plateforme de spectrométrie de masse.

5. Résonance plasmonique de surface (SPR)

a) Principe

La technologie de résonnance plasmonique de surface permet d'étudier en temps réel des interactions moléculaires sans aucun marquage des molécules. L'intérêt majeur est de pouvoir visualiser la cinétique d'une interaction et de mesurer les constantes d'association et de dissociation. Afin de détecter cette interaction, une molécule (le ligand) est

immobilisée sur une sensorchip alors que son partenaire (l'analyte) est injecté dans un flux continu de tampon par un système microfluidique à la surface de la puce.

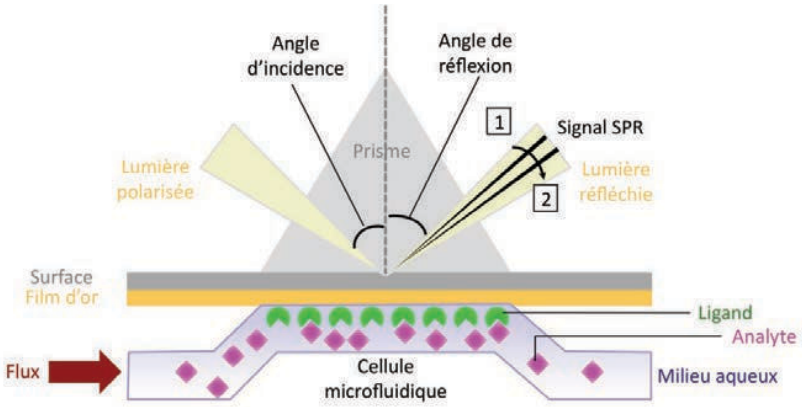


Figure 21. Principe de la résonance plasmonique de surface
Le ligand est fixé sur la sensor chip, un flux continu assure le passage de l'analyte. La formation des complexes modifie la réflexion du rayon d'incidence, les positions 1 et 2 correspondent aux variations de l'angle de réflexion ou de résonance en fonction de la concentration en analyte à côté du sensorchip.

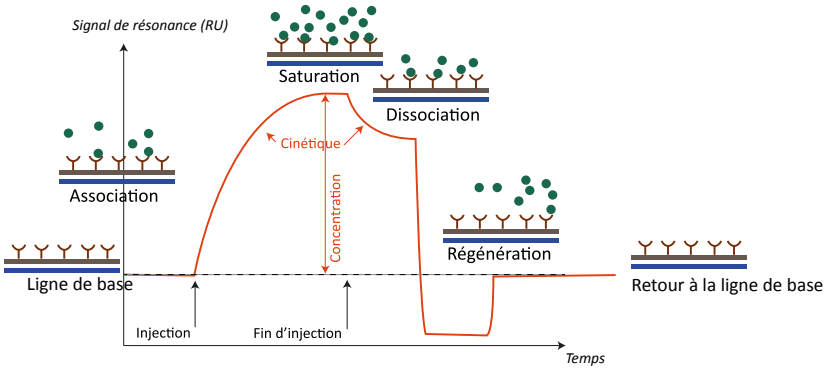


Figure 22. Exemple de sensogramme
Un sensorgramme permet de suivre en temps réel la fixation des molécules sur la puce. La ligne de base au début de l'expérience correspond à un débit de tampon sur le sensorchip où se trouve le ligand. Lorsque l'analyte est injecté, la formation des complexes est suivie par l'augmentation de masse au voisinage de la surface, c'est la phase d'association. La dissociation est observée lorsque le tampon de réaction remplace l'analyte dans le circuit fluidique. La dernière étape consiste en une régénération de la surface pour décrocher les complexes et revenir à la ligne de base.

La sensorchip est une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or de 50nm d'épaisseur, qui est recouverte à son tour par une couche de dextran carboxyméthylé sur laquelle est fixé le ligand. Lors du passage de l'analyte sur le ligand, une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre en contact avec la lamelle, l'association ou la dissociation des complexes à la surface modifie le milieu dans lequel baigne le dextran. Ce changement de milieu entraine une modification de l'indice de réfraction et de l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est mesuré et le signal est exprimé en unité

arbitraire RU, chaque RU représente la fixation de 1pg protéine/mm^2 (Figure 21 et 22). L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance s'appelle sensogramme (Figure 22).

b) Immobilisation des ligands sur la sensorchip

Les expériences de SPR ont été réalisées sur le biacore T200 à l'IBS par Jean –Baptiste Reiser. Les protéines sont purifiées comme décrit dans la section C et se trouvent dans le tampon (50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH=7,4).

(1) Couplage amine de l'anti GST

La sensorchip utilisée est la CM5, elle est constituée de quatre canaux indépendants contenant chacun une matrice de dextran carboxyméthylé. Les groupements carboxyle du dextran sont tout d'abord activés sous forme d'ester de succinimide par injection d'un mélange de 1-éthyl-N'-(diéthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et du N-hydroxy-succinimide (NHS). La fixation de l'anticorps anti GST a été réalisée à l'aide du kit GST Capture Kit (GE Healthcare). Le ligand est préparé à 30 µg/ml dans le tampon d'immobilisation du kit (10mM acétate de sodium pH=5) puis injecté sur la matrice activée. Ensuite, il y a la saturation des sites inoccupés avec de la GST recombinante. Finalement, les protéines de fusion de la GST (GST SH3 de DOCK180 ou GST SH3 de Hck) sont injectées afin d'être capturées par l'anticorps.

Ces expériences ont été réalisées afin de comparer l'interaction du domaine C-terminal d'ELMO avec les SH3 de DOCK180 et de Hck, et pour investiguer la possibilité de la formation d'un complexe ternaire entre les trois partenaires.

6. Les interactions dans un contexte physiologique

a) Définition de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'étude précise de cellules d'une façon qualitative ou quantitative. Grace à un système fluidique, les cellules isolées et séparées sont entraînées les unes derrière les autres à grande vitesse devant une source lumineuse. Les signaux lumineux sont ensuite séparés par des filtres, collectés par des photomultiplicateurs puis

traités grâce à un système électronique. Les paramètres mesurés par un cytomètre sont la lumière diffusée et la fluorescence.

La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. FSC (Forward Scattered Light) est la diffusion de la lumière mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec le volume. Alors que SSC est la diffusion de la lumière mesurée sous un angle de 90° (Side Scattered Light), la mesure correspond à la complexité de la structure de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, forme du noyau, rugosité de la membrane plasmique). La fluorescence (FL) peut être intrinsèque, mais le plus souvent, elle est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée sous forme de photons d'une longueur d'onde plus élevée.

L'utilisation de ces 3 paramètres permet de classer une population en différentes sous-populations.

(1) Etiquettes des protéines d'intérêt

Dans nos expériences, les protéines d'intérêt sont munies soit d'une étiquette directement fluorescente, GFP ou mCherry, ou d'une étiquette enzymatique SNAP ou CLIP.

Les étiquettes SNAP ainsi que CLIP sont des formes mutantes issues de la protéine de réparation d'ADN O6–alkylguanine DNA alkyltransferase (hAGT) humaine de 20kDa. Ces 2 étiquettes SNAP et CLIP-tag (New England Biolabs) représentent de nouveaux outils permettant une variété de marquages des protéines en fusion avec eux. En effet, le SNAP-tag réagit spécifiquement avec un substrat possédant des dérivés benzylguanine (BG) et benzylochloropyrimidine (CP), conduisant à l'association covalente de la protéine SNAP avec la sonde synthétique fluorescente. Le CLIP-tag quant à lui interagit de la même façon mais avec un substrat possédant des dérivés benzylcytosines (BC, Figure 23). La variété des substrats (Tableau XI) pouvant se lier à l'étiquette permet de l'exciter avec différents lasers et de le voir dans différents canaux. Ces substrats peuvent être perméants ou non et autorisent une imagerie sur cellules vivantes ainsi que des études de localisation comme la détection de protéines intracellulaires (les tags SNAP-Cell) ou exposées à la surface de la cellule (les tags SNAP-Surface). La spécificité d'interaction du SNAP-tag ainsi que le CLIP-tag avec leurs substrats permet une utilisation simultanée de ces deux étiquettes afin de localiser plusieurs protéines simultanément.

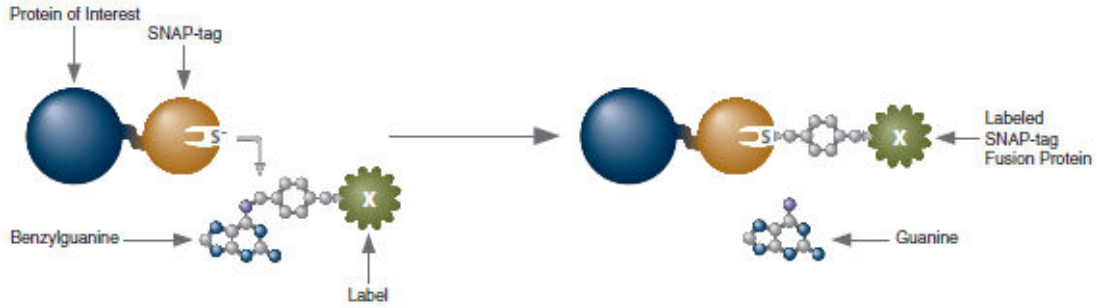


Figure 23. Réaction de la protéine SNAP avec son substrat.
L'étiquette SNAP-tag réagit spécifiquement avec un substrat possédant des dérivés benzylguanine (BG) et benzylochloropyrimidine (CP), conduisant à l'association covalente de la protéine SNAP avec la sonde synthétique fluorescente, ou d'autres molécules portant ces dérivés. Le même principe s'applique pour l'étiquette CLIP lorsqu'on utilise les substrats spécifiques de la forme CLIP de l'hAGT (benzylcytosine BC).

(2) Protocole de marquage

Les cellules sont incubées avec le substrat dilué au 1/200 dans du milieu complet pendant 30 min à 37°C. Elles sont ensuite lavées 3 fois avec du milieu complet puis incubées de nouveau avec ce milieu pendant 30 min à 37°C. Après un lavage avec du PBS, les cellules peuvent être directement observées ou fixées au méthanol ou au para formaldéhyde (PFA).

La fixation est obtenue soit dans du méthanol 90% préparé dans du PBS pendant 5 minutes à -20°C ou avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes à 37°C. Suite à la fixation, on procède à trois lavages avec du PBS.

	Max Excitation (nm)	**Max Emission (nm)**
SNAP-cell Oregon green	490	514
SNAP-cell 505	504	532
SNAP-cell 430	421	484
SNAP-cell TMR	554	580
CLIP-cell 505	504	532
CLIP-cell 430	421	484
CLIP-cell TMR	554	580

Tableau XI. Différents substrats des protéines SNAP et CLIP utilisés au cours de mon travail, ainsi que leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ces substrats proviennent de chez New England Biolabs.

b) Analyse par microscopie et par cytométrie

Les cellules sont observées au microscope optique à épifluorescence de la plateforme d'imagerie cellulaire de l'IBS. Les cellules sont mises en culture dans des boites de culture

adaptées à la microscopie (fond verre de 150µm d'épaisseur) comme les lames multipuits lab-tek, Ibidi ou Sarstedt. Les cellules sont transfectées avec les vecteurs de choix et visualisées après 48 heures. Le marquage, lorsqu'il est nécessaire, est réalisé comme décrit dans la section (II-C.6.a.2).

(3) Etude du signal de FRET

(a) Principe

Le FRET est devenu une méthode de choix pour l'analyse des interactions protéiques dans les cellules. Le FRET (**Fluorescence Resonance Energy Transfer)** est le transfert d'énergie de fluorescence par résonance entre un donneur fluorescent dans son état excité, à un composé excitable, l'accepteur, par une interaction non radiative.

Le signal de FRET dépend de plusieurs facteurs, tout d'abord la durée de vie du donneur doit être suffisamment longue, le transfert ne doit pas inclure de résorption effective de la lumière par l'accepteur, et le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins d'une façon partielle le spectre de l'accepteur (Figure 24). Enfin, la distance entre le donneur et l'accepteur doit être faible (inférieur à 10nm). C'est cette dernière propriété qui permet au FRET d'être un outil de choix dans l'analyse des interactions entre des partenaires respectivement marqués par les fluorophores donneur et accepteur.

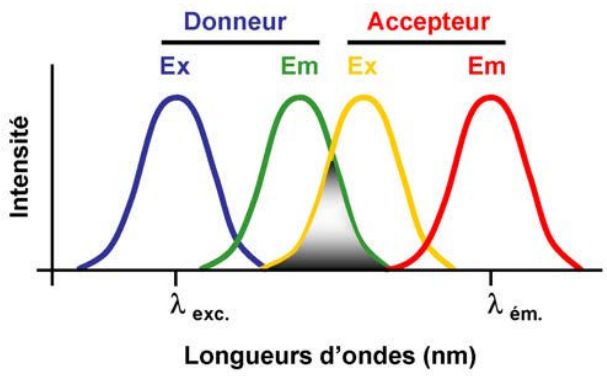


Figure 24. Schéma des spectres de fluorescence
Les spectres d'excitation et d'émission des donneurs et des accepteurs du couple de FRET sont représentés. Le chevauchement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur doit être suffisant pour obtenir un signal de FRET.

(b) Différentes méthodes de détection du FRET

Il existe plusieurs méthodes pour visualiser ou mesurer un FRET. Dans les paragraphes suivants, ne seront développées que les plus classiques :

1. **FRET direct, ou «sensitized emission»** : le donneur est excité à une certaine longueur d'onde, et les émissions du donneur et de l'accepteur sont collectées dans des canaux bien choisis. Malgré la simplicité de cette méthode, elle présente un grand désavantage dû au recouvrement pouvant exister entre les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Afin de surmonter ce problème, plusieurs contrôles sont nécessaires : le donneur seul, l'accepteur seul ainsi que le potentiel de FRET. Ces canaux seront visualisés indépendamment afin d'estimer le chevauchement entre les différents spectres.

2. **Photoblanchiment de l'accepteur** : Lors du FRET, une partie de la fluorescence du donneur est récupérée par l'accepteur, on observe alors une diminution de l'intensité de la fluorescence émise du donneur (quenching). Un photoblanchiment de l'accepteur doit éliminer le «quenching» et ainsi augmenter proportionnellement au niveau de photoblanchiment, le niveau de fluorescence observable du donneur. En absence de FRET, on n'observe aucun changement. Cette méthode présente le désavantage d'être destructive, les cellules ne pourront être utilisées qu'une seule fois. En plus, le processus est un peu long, le photoblanchiment de l'accepteur pouvant durer plusieurs minutes, mais il permet de s'affranchir des chevauchements des spectres des fluorophores.

3. «**Fluorescence live Imaging microscopy» (FLIM)** : Cette méthode est basée sur la mesure des durées de vie des fluorophores. Les fluorophores présentent un déclin exponentiel de leur fluorescence sur une échelle de quelques nanosecondes, ce déclin est dépendant de plusieurs facteurs comme le «quenching» de la fluorescence. Comme pendant le FRET, une partie de la fluorescence du donneur subit l'effet de quenching, ce dernier peut être déterminé en mesurant la vitesse du déclin de la fluorescence. Cette méthode dépend seulement de la fluorescence du donneur ce qui permet d'utiliser un accepteur non fluorescent mais en même temps elle est limité par l'auto-fluorescence des cellules et nécessite des molécules fluorescentes dont le déclin de fluorescence est mono exponentiel.

(c) Réalisation des expériences de FRET

Les expériences de FRET peuvent être réalisées soit à l'aide d'un microscope confocal, soit à l'aide d'un cytomètre en flux. On a choisi d'utiliser le cytomètre en flux car il permet d'avoir une étude statistique regroupant l'ensemble de la population cellulaire contrairement au microscope où seules certaines cellules choisies sont analysées. L'approche par FRET a été developpée dans le but de visualiser dans le contexte physiologique les interactions analysées *in vitro*.

Les expériences de FRET sont réalisées avec les constructions d'ELMO munies d'une étiquette SNAP ainsi que le domaine SH3 de Hck muni de l'étiquette CLIP. Plusieurs marquages ont été testés afin de trouver le meilleur couple donneur / accepteur.

En parallèle, les mêmes expériences sont réalisées avec les constructions d'ELMO à étiquette GFP et SH3 de Hck ayant un étiquette mCherry. La GFP est donneur et le mCherry accepteur dans le couple de FRET obtenu.

c) Le réglage et la compensation

Toute expérience réalisée en se servant de la cytométrie en flux nécessite d'une part le réglage de la machine incluant le choix des canaux, des voltages et des compensations, et d'autre part le choix des paramètres d'analyse qui permet l'interprétation des résultats.

Dans un premier temps, les populations de cellules analysées sont déterminées à partir des canaux FSC et SSC. On s'intéresse à la fluorescence des évènements de la région correspondant aux cellules. On définit grâce à ce marquage la valeur du seuil de fluorescence entre les évènements positifs (cellules transfectées et marquées) et négatifs (cellules naïves pour le marqueur du canal de fluorescence considéré). Cette valeur du seuil dépend des paramètres utilisés lors de l'acquisition des évènements, voltage et compensation.

Les compensations peuvent être nécessaires dès qu'on utilise deux fluorophores (ou plus) dont les spectres d'émission se chevauchent. Ces compensations consistent à retrancher des mesures d'un canal donné, la contribution des autres fluorophores qui résulte de la fuite de leurs émissions dans le canal considéré. Pour la mesure du FRET, il est indispensable de compenser correctement la fuite du donneur dans le canal de FRET afin de pouvoir mesurer la contribution réelle du transfert d'énergie recherché.

(d) Analyse des données de FRET par cytométrie

La méthode d'analyse des données de FRET sera traitée dans le chapitre «Analyse des interactions dans un contexte physiologique» dans la section résultats.

E. Tandem Affinity Purification

La méthode du TAP-Tag ou Tandem Affinity Purification a été développée grâce aux travaux de Bertrand Séraphin (Rigaut et al. 1999). Cette technique consiste à purifier les complexes de protéines dont l'un des partenaires connus est exprimé en conditions natives en fusion avec une étiquette double (TAP-tag). Le TAP-tag permet ainsi une purification rapide des complexes sans la nécessité de connaitre leur composition, leur activité ou leur fonction. Cette méthode a été développée chez les levures mais peut être appliquée pour d'autres types cellulaires comme les cellules des mammifères. Nous avons choisi de développer cette stratégie dans le but d'identifier des partenaires de domaines pertinents de la protéine ELMO.

1. Vue d'ensemble sur la méthode du TAP-Tag

La méthode du TAP-tag exige dans un premier temps la fusion de l'étiquette double «TAP» du côté N ou C-terminal de la séquence codant pour la protéine d'intérêt puis l'introduction du plasmide codant pour la protéine dans les cellules hôtes. Les lysats cellulaires sont ensuite préparés et la protéine d'intérêt et ses partenaires sont purifiés grâce aux différents tags. Dans une première étape, les complexes dans lesquels sont présents la protéine d'intérêt sont purifiés sur une colonne spécifique pour le premier tag de l'étiquette TAP. Après clivage par une enzyme protéolytique dont le site est inséré entre les deux étiquettes, l'éluat est purifié par une seconde étape spécifique du deuxième tag. Après purification sur cette seconde résine, l'éluat obtenu est ensuite concentré, puis fractionné sur gel dénaturant avant d'être caractérisé par spectrométrie de masse par exemple (Figure 25).

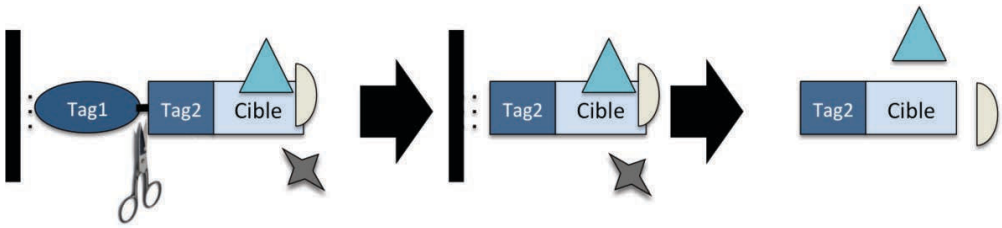


Figure 25. Schéma du principe du TAP-tag
Représentations des étapes de la purification en mode tandem. La protéine cible et ses partenaires sont tout d'abord purifiés grâce à la première étiquette (tag1), on procède ensuite à une élution par digestion à la TEV qui clive la protéine de fusion qui est finalement purifiée une seconde fois sur une colonne spécifique de la seconde étiquette (tag2). Les protéines associées spécifiquement au complexe sont ainsi purifiées et peuvent être éventuellement identifiées.

Cette technique possède néanmoins quelques limites. Le taux d'expression et la localisation de la protéine d'intérêt doivent être contrôlés. Il est préférable d'exprimer la protéine à des niveaux proches de son taux d'expression normale, une surexpression peut entrainer la formation des complexes avec des partenaires non physiologiques. De la même manière, une localisation non physiologique de la protéine peut entraîner la formation de complexes non pertinents.

2. Mise au point de la méthode de TAP-tag au laboratoire

c) Choix des tags

Nous avons choisi de modifier les étiquettes TAP classiques en créant pour nos besoins spécifiques une étiquette double qui code pour la protéine SNAP et le domaine CBP (calmodulin binding protein) séparés par un site de coupure à la protéase TEV (Tabacco Etch Virus). Le vecteur construit est appelé dans la suite de ce document pTAP-SNAP-C1. Il est basé sur le vecteur pEGFP-C1 modifié, et permet la fusion en 3' de la séquence codante d'intérêt.

Le tag SNAP présente un double intérêt :

1) Il sert à la purification d'une protéine à partir d'un lysat cellulaire suite à son interaction avec des billes magnétiques. En effet, la protéine SNAP est issue de la protéine de réparation d'ADN humain O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT), elle interagit d'une façon covalente avec des groupements benzyl greffés sur les billes magnétiques ce qui permet l'immobilisation de la protéine sur les billes. Suite à

la fixation, la protéine sera éluée après digestion par la protéase TEV dont le site est situé du côté C-terminal de la protéine SNAP.

2) La protéine SNAP peut être rendue fluorescente (Voir Matériels et méthodes, section Etiquettes des protéines d'intérêt), ce qui permet sa visualisation par les techniques d'imagerie cellulaire ou en cytométrie en flux.

Ce tag ne permet ainsi pas seulement la purification de la protéine par la technique du TAP-tag mais également un suivi *in cellulo* de la protéine afin de mesurer plus directement son taux d'expression par cytométrie, et connaitre sa localisation par microscopie, afin d'étudier ses fonctions.

Le deuxième tag (CBP) permet la seconde purification sur une résine de calmoduline. Malgré le fait que la fixation des protéines du lysat cellulaire d'une façon non spécifique sur les billes est peu probable, la deuxième purification doit éliminer tout risque de fixation non spécifique.

Dans les tests décrits ci-dessous nous avons utilisé un clonage de la protéine ELMO de souris dans le vecteur pTAP-SNAP-C1 réalisé par les méthodes classiques décrites dans ce chapitre. Dans le cours de mon travail de thèse, j'ai également cloné les domaines pertinents d'ELMO dans ce même vecteur pTAP-SNAP-C1 (Voir chapitre «Tandem-Affinity purification» dans la section III «Résultats et analyses»).

d) Purification grâce au tag SNAP

Afin de tester la première étape de la purification grâce à l'étiquette SNAP, nous avons réalisé une transfection transitoire des cellules HEK293T par le vecteur pTAP-SNAP-ELMO (transfection Jet Prime™ II-B.2). Les cellules (3x 10^5 cellules) sont lysées 24 à 48 heures après la transfection dans 100µl du tampon (20mM Hepes, 150mM NaCl, 0,5% triton, 5% glycérol pH=7,5 en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases); puis centrifugées pendant 30 minutes à 4 degrés sous 20000g. Le surnageant de lyse est dilué dans le tampon d'immobilisation dans un volume final de 500µl (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0,1% tween, pH=7,5) puis incubé pendant 1 heure avec des billes magnétiques (50µl) présentant le substrat de SNAP (SNAP-Capture, New England Biolabs), pré-équilibrées avec le même tampon. En effet, le SNAP-tag réagit spécifiquement avec un substrat possédant des dérivés benzylguanine (BG) et benzylochloropyrimidine (CP), conduisant à l'association covalente de la protéine SNAP avec les billes magnétiques recouvertes. Les billes sont

ensuite lavées avec 3 ml du tampon d'immobilisation avant élution de la protéine par clivage protéolytique.

Le clivage de la protéine de fusion SNAP-ELMO est obtenu en incubant les billes avec la protéase TEV dans une dilution 1/20 dans le tampon de clivage de la TEV (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,5% NP40, 0,5mM EDTA, 1mM DTT pH= 8) pendant la nuit sous agitation à 4°C.

Les billes sont récupérées par contact avec un portoir magnétique, et la fraction solubilisée par la digestion à la TEV est testée par western blot en utilisant un anticorps anti-ELMO afin de vérifier si la protéine était fixée puis éluée de la colonne.

e) Purification sur résine de calmoduline

Comme mentionné auparavant, les constructions TAP-tag que nous avons utilisées possèdent une seconde étiquette constituée d'un domaine CBP qui interagit avec la calmoduline en présence de calcium. Nous avons donc voulu optimiser la purification de la protéine ELMO en fusion avec l'étiquette TAP exprimée après transfection transitoire des cellules HEK293T en utilisant cette seconde étiquette CBP

(1) Tests initiaux à partir des extraits cellulaires après transfection.

La protéine SNAP-ELMO obtenue après la lyse des cellules HEK293T est diluée soit dans le tampon d'immobilisation (voir la composition dans la section 2.1), soit dans le tampon de liaison (10mM Tris pH=8, 150mM NaCl, 1mM MgOAc, 1mM imidazole, 0,1% NP-40, 10 mM β-mercaptoéthanol, 2mM $CaCl_2$) dans un volume final de 3ml. La résine de calmoduline (Phosphodiesterase activator-agarose, Sigma) est équilibrée avec le tampon de dilution correspondant en présence de 4 mM $CaCl_2$. On incube pendant une heure à 4°C.

Après rinçage, les protéines retenues sont éluées en présence de 4mM EGTA, puis les fractions sont analysées par western blot comme précédement. Cependant aucune protéine n'a été détectée (SNAP-ELMO) après passage sur la colonne de calmoduline (données non montrées), et cela même en augmentant les quantités de cellules transfectées ou en faisant varier la concentration d'EGTA à l'élution. Cela suggère que la quantité de cellules utilisées reste insuffisante, ou bien que le domaine CBP de notre étiquette est incapable de se lier à la résine de calmoduline.

Nous avons donc décidé de cloner dans un vecteur d'expression bactérien une protéine de fusion qui possède une étiquette CBP clivable à la TEV, dans une position similaire à celle du TAP-tag. En produisant ce vecteur, nous avons voulu reproduire au mieux le vecteur pTAP-SNAP-ELMO en nous servant des constructions présentes au laboratoire. Les informations en relation avec ce clonage sont décrites plus haut (II-A.2). Le vecteur réalisé code pour la protéine GST-CBP-TEV-Protéine A, et permet donc sa purification initiale sur glutathion. L'expression en système procaryote permet de produire une quantité suffisante de la protéine pour mettre au point l'interaction du domaine CBP avec la résine de calmoduline et de s'affranchir des limitations dues à l'expression en cellule eucaryote.

(2) Purification de la protéine contrôle GST-CBP-TEV-Protéine A.

Afin de purifier la protéine GST-CBP-TEV-Protéine A, nous avons optimisé son expression dans un système d'expression bactérien. La protéine est exprimée sous forme soluble après induction classique de bactéries BL21(DE3) pendant trois heures en présence de 1mM IPTG à 37°C. Les tampons utilisés pour la lyse des bactéries sont ceux utilisés habituellement dans le laboratoire pour la purification des protéines fusionnées avec la GST, il s'agit du tampon 50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 10% glycérol, 1% triton, pH=7,5.

Une fois la protéine exprimée, elle est purifiée classiquement sur une colonne de gluthation via son domaine GST (avec le tampon de lyse). Avant son élution le domaine Protéine A est supprimé par clivage à la TEV dans les mêmes conditions que précédemment.

Suite à cette digestion, la fusion GST-CBP est éluée avec le tampon (50mMTris pH=8, 10mM gluthation réduit). Elle est dialysée contre le tampon de liaison (10mM Tris pH=8, 150mM NaCl, 1mM MgOAc, 1mM imidazole, 0,1% NP-40, 10 mM β-mercaptoéthanol, 2mM $CaCl_2$) ; puis purifiée sur colonne de calmoduline selon le protocole décrit dans les travaux de B. Séraphin (Rigaut et al. 1999). La protéine est éluée avec le tampon 50mM ammonium bicarbonate pH=8, 25 mM EGTA. Les différentes fractions sont déposées sur gel SDS polyacrylamide.

III. RESULTATS & ANALYSES

Chapitre I: Mode d'interaction ELMO/DOCK180/Hck

A. Identification des domaines d'interaction entre ELMO et le domaine SH3 de Hck

ELMO a été identifiée dans un criblage visant à découvrir des partenaires de Hck, et pourrait interagir avec le domaine SH3 de la kinase (Scott et al. 2002). Il a été suggéré dans ces travaux que cette interaction pourrait dépendre du motif polyproline d'ELMO, puisque l'interaction est inhibée après saturation à l'aide d'un peptide polyproline.

En prenant en compte ces données nous avons voulu dans un premier temps vérifier la spécificité de l'interaction entre la protéine ELMO et la kinase Hck par pull-down contre le domaine SH3 de Hck. Nous avons ensuite cherché à localiser cette interaction sur ELMO en réalisant des pull-down des différents mutants de délétion d'ELMO contre le SH3 de Hck immobilisé. Notre objectif était de déterminer l'implication du domaine polyproline d'ELMO dans l'interaction. En parallèle, les mêmes expériences ont été réalisées contre le domaine SH3 de DOCK180; DOCK180 est un partenaire essentiel d'ELMO dont nous avons précédemment montré au laboratoire que le domaine SH3 présente une liaison atypique avec ELMO.

1. Saturation de l'interaction d'ELMO sur le domaine SH3 de Hck immobilisé

Afin de vérifier la spécificité de l'interaction d'ELMO avec le domaine SH3 de Hck, nous avons mis au point une technique de pull-down en utilisant une construction GST-SH3 de Hck immobilisée sur une colonne de glutathion. J'ai ainsi pré-saturé ELMO avec des concentrations croissantes du domaine SH3 de Hck avant de charger le mélange sur une résine de glutathion en présence ou en absence de GST-SH3 de Hck. Après rinçage, les fractions retenues sur les résines sont déposées sur gel SDS-PAGE et analysées.

En comparant les différentes bandes obtenues, nous observons que la quantité d'ELMO qui interagit avec la GST-SH3 diminue avec l'augmentation de la pré-saturation d'ELMO par le domaine SH3 libre. Par comparaison avec le contrôle réalisé sur une résine vierge, les résultats obtenus en présence de GST-SH3 confirment que le domaine SH3 de Hck est bien un ligand d'ELMO (Figure 26). Ces résultats sont également en accord avec les données publiées sur l'interaction d'ELMO avec le SH3 (Scott et al. 2002).

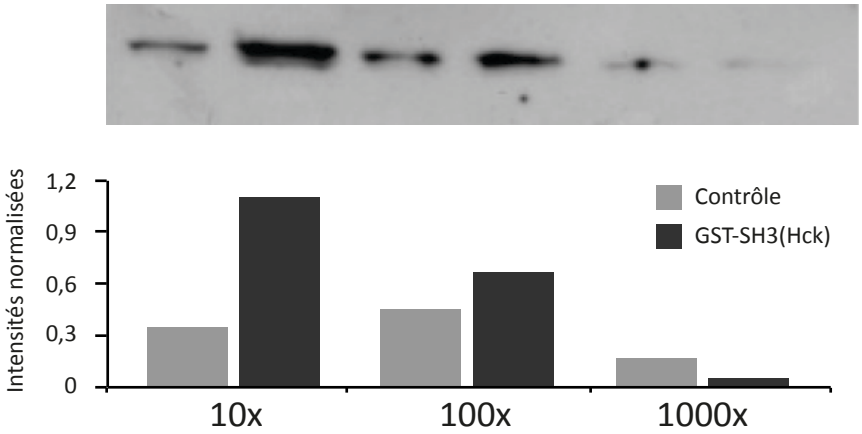


Figure 26. Pull-down d'ELMO recombinant sur GST-SH3 de Hck.
ELMO est présaturé avec des concentrations croissantes du SH3 de Hck, le mélange est chargé sur une résine GST-SH3 de Hck ou sur une résine vierge (contrôle). Le Western blot (anti-His) montre les protéines éluées après pré-saturation par les rapports molaires indiqués de SH3/ELMO (10x, 100x ou 1000x). La quantification du signal (unités arbitraires normalisées) illustre la saturation spécifique de l'interaction en présence de SH3 libre.

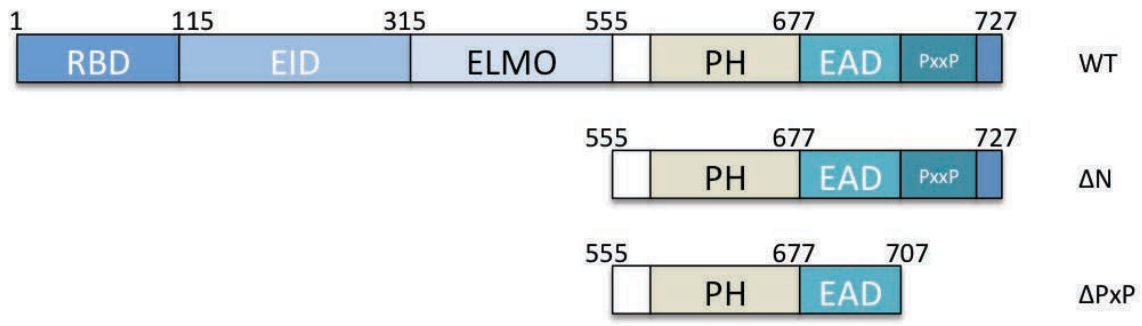
Comme on peut l'observer une petite quantité d'ELMO interagit de façon non spécifique avec la résine vierge. Afin de minimiser cette interaction non spécifique, nous avons cherché à améliorer les conditions pour éviter une telle interaction. Plusieurs pistes ont ainsi été testées en partant de l'état de la protéine, la quantité d'ELMO à utiliser, le temps d'incubation avec la résine et le tampon de réaction. Les essais réalisés (données non figurées) ont mené à sélectionner le tampon adéquat dans lequel la présence du triton est un facteur important pour éliminer les interactions non spécifiques. Il est également apparu important d'utiliser la protéine le plus tôt possible après sa purification pour empêcher son agrégation liée au vieillissement. Pour minimiser la présence des agrégats, les préparations d'ELMO ont été systématiquement centrifugées à vitesse maximale pendant 5 min à 4°C avant leur utilisation.

2. Comparaison par pull-down de l'interaction d'ELMO et de ses domaines sur les régions SH3 de Hck ou de DOCK180 immobilisés

Nous savons que l'interaction du domaine SH3 de DOCK180 est atypique. En effet, nos travaux précédents ont montré que le motif polyproline présent dans le domaine C-terminal d'ELMO n'était pas nécessaire à cette interaction, mais permettait de stabiliser le complexe en augmentant son temps de demi-vie (Sévajol et al. 2012). Nous avons donc cherché à identifier la région d'ELMO responsable de l'interaction avec le domaine SH3 de Hck en le comparant avec l'interaction du domaine SH3 de DOCK180. Afin de voir la spécificité de l'implication du polyproline d'ELMO dans les interactions avec le domaine SH3 de Hck et de

DOCK180, des pull-down de la protéine ELMO complète ou le domaine C-terminal avec ou sans le domaine polyproline contre les domaines SH3 immobilisés sont réalisés.

A



B

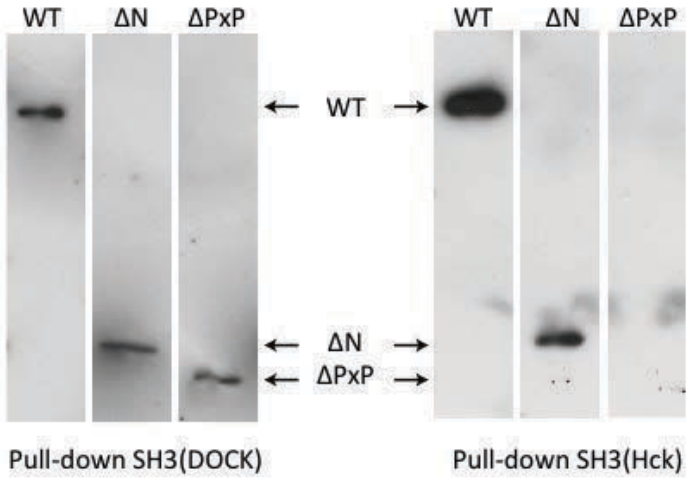


Figure 27. Pull-down d'ELMO par les domaines SH3
A- Différents domaines d'ELMO utilisés pour le pull-down : la protéine complète WT, le domaine C-terminal ΔN, le domaine C-terminal dépourvu du motif polyproline ΔPxP. B- Pull-down des domaines d'ELMO sur les GST-SH3 immobilisés. Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide 10% et révélées par un anticorps anti-histidine couplé à la peroxydase après transfert sur nitrocellulose.

Dans cette expérience, le domaine SH3 de DOCK180 immobilisé interagit avec la protéine ELMO complète ainsi qu'avec le domaine C-terminal seul (ΔN). La délétion du motif polyproline du domaine C-terminal (ΔPxP) ne semble pas détruire cette interaction, ce qui est conforme aux données précédemment publiées. Au contraire, dans le cas du domaine SH3 de Hck, on observe un pull-down efficace de la protéine ELMO complète et de son domaine C-terminal mais la délétion du motif polyproline aboutit à la perte de l'interaction,

ce qui suggère que ce motif est indispensable à l'interaction de Hck au domaine C-terminal d'ELMO (Figure 27).

Nos résultats indiquent que les domaines SH3 de DOCK180 et de Hck interagissent tous deux en pull-down avec le domaine C-terminal d'ELMO, mais de manière différente. Dans le cas du domaine SH3 de Hck l'interaction est strictement dépendante de la présence du motif polyproline. Au contraire, les données obtenues avec le domaine SH3 de DOCK180 sont en accord avec les données obtenues précédemment au laboratoire qui montre par SPR une interaction atypique entre le SH3 de DOCK180 et le domaine C-terminal d'ELMO dépourvu du polyproline (Sévajol et al. 2012).

3. Caractérisation préliminaire des interactions du domaine C-terminal d'ELMO avec les SH3 de DOCK180 et de Hck par SPR.

Afin de mieux caractériser les différences d'interaction des domaines SH3 de DOCK180 ou de Hck avec ELMO, nous avons très récemment engagé avec JB Reiser une série d'expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) entre le domaine C-terminal d'ELMO et les deux domaines SH3. Notre but est à terme de pouvoir obtenir des valeurs précises des constantes d'affinités des couples considérés.

Pour ces expériences, les protéines de fusion GST-SH3 de Hck et de DOCK180 sont immobilisées sur la puce par couplage secondaire sur un anticorps anti-GST préalablement couplé à la surface de Dextran par couplage amine. Les domaines SH3 de Hck et de DOCK180 sont ainsi immobilisés à des niveaux de 780 et 700 RU respectivement. La piste de référence est constituée de GST et d'anticorps anti-GST immobilisés avec des niveaux comparables. L'analyte (domaine C-terminal d'ELMO, ΔN) est injecté à une concentration de 10µM pendant 600 secondes. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 28.

Au premier abord et de façon surprenante, le domaine C-terminal d'ELMO (ΔN) semble interagir plus fortement avec le SH3 de DOCK180. En effet, même si nous n'observons pas la réponse à l'équilibre, la réponse après 600s d'association est plus élevée pour SH3-DOCK180 alors que des quantités similaires de SH3 de Hck et DOCK180 immobilisées. Cependant, la dissociation du complexe ELMO ΔN/SH3 de Hck semble beaucoup plus lente, ce qui indique que le complexe pourrait être plus stable dans le temps (la vitesse de dissociation est directement liée au temps de demi-vie). La plus forte interaction avec le domaine SH3 de

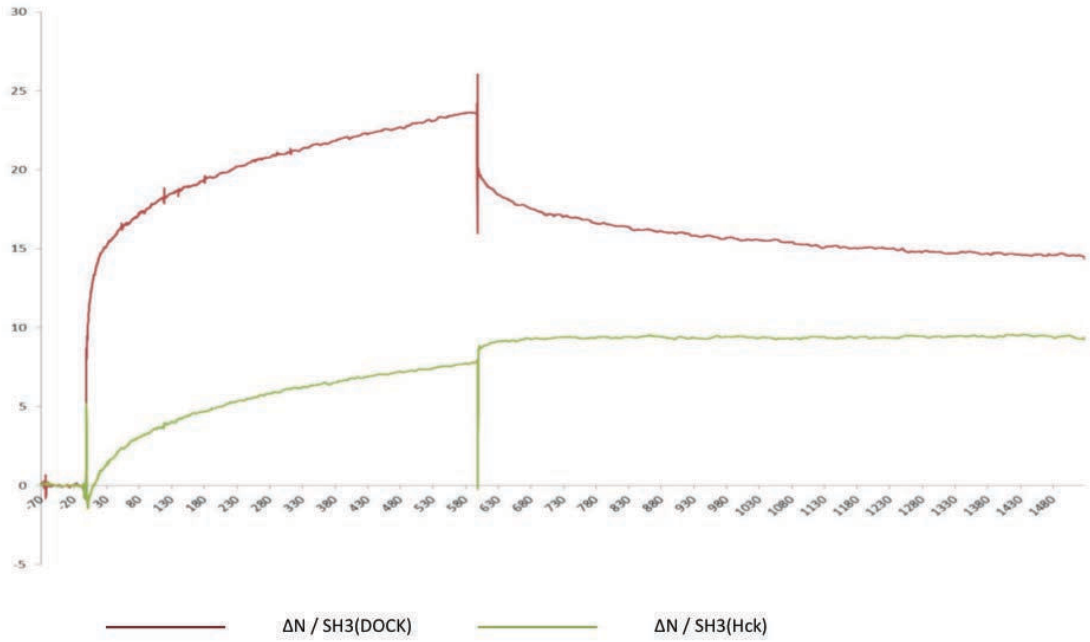


Figure 28. SPR : interaction ELMO ΔN sur SH3 (DOCK180)
Sensogrammes de l'interaction du domaine C-terminal d'ELMO sur le GST-SH3 de DOCK180 (en rouge) et le GST-SH3 de Hck (en vert). Le domaine C-terminal d'ELMO est injecté sur la puce où le GST-SH3 de DOCK180 et le GST-SH3 de Hck ont été immobilisés. Les courbes représentées sont obtenues après soustraction de la piste de référence (GST seule). Abcisses, temps (s), Ordonnées, Résonance (R.U.). Le temps 0 correspond à l'injection du ligand (ELMO ΔN). Assciation 600s, dissociation 900s.

DOCK180 serait alors due à une association plus rapide. Néanmoins, il n'est pas à exclure que la plus faible réponse observée pour la piste contenant SH3 de Hck soit de l'ordre expérimental. Malgré l'immobilisation de quantités équivalentes de GST-SH3 de DOCK180 et de GST-SH3 de Hck sur la surface SPR, une quantité moindre du domaine C-terminal d'ELMO capable de se lier à GST-SH3 de Hck n'est pas à exclure pour expliquer la faible réponse de 10RU obtenue; des problèmes liés à l'encombrement stérique ou des conformations peu favorables de la fusion GST-SH3 de Hck pourraient en être l'origine. Des expériences complètes de cinétiques SPR sont nécessaires pour pouvoir confirmer ces hypothèses et pour mesurer les constantes cinétiques de cette association.

B. Caractérisation de l'interaction du peptide polyproline avec les domaines SH3 par RMN

Les expériences de pull-down réalisées montrent une dépendance de la présence du domaine polyproline dans l'interaction entre le SH3 de Hck et la partie C-terminale d'ELMO. En collaboration avec Pierre Gans du laboratoire de RMN (IBS), nous avons voulu

caractériser par RMN l'interaction entre le SH3 de Hck et le motif polyproline C-terminal d'ELMO. Pour cela nous avons utilisé des peptides synthétiques (Protéogenix) issus de la séquence d'ELMO D_{700}-N_{727} (Tableau XII). La mesure des déplacements chimiques permet d'obtenir des valeurs d'affinités.

Peptide	Séquence
E15E	702 ENIQIPDAPPPIPKE 716
D28N	700 DLENIQIPDAPPPIPKEPSNYDFVYDCN 727

Tableau XII. Séquences des peptides polyprolines issus de la séquence d'ELMO générés pour cette étude. La tyrosine Y720 est une cible *in vitro* de la phosphorylation par la kinase Hck (rouge)

Lors d'une étude précédente (Sévajol et al. 2012; Sévajol 2012) Pierre Gans, a étudié l'interaction du domaine SH3 de DOCK180 (marqué à l'azote ^{15}N) avec le peptide C-terminal d'ELMO D28N comprenant le motif polyproline ou un peptide plus court E15E centré sur le motif polyproline (Tableau XII). Le spectre 2D des déplacements chimiques obtenus en ajoutant jusqu'à 7 équivalents du peptide D28N est présenté sur la figure suivante.

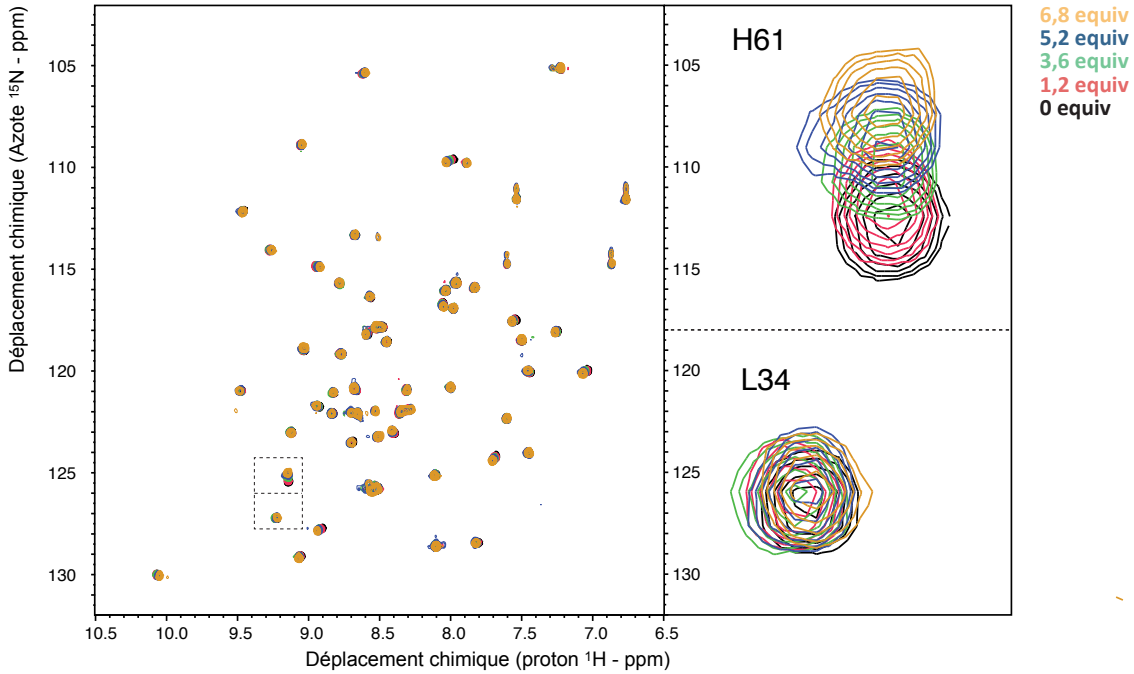


Figure 29. RMN : Interaction du SH3 de DOCK180 avec le peptide polyproline d'ELMO D28N
Spectre 2D ^{15}N-HSQC du domaine SH3 de DOCK180 marqué à l'azote ^{15}N. A gauche, on trouve le spectre complet de la protéine SH3 marqué (en noir) et en présence d'environ 7 équivalents du peptide D28N (en jaune). A droite sont figurés les détails des changements dans la fréquence de résonnance de l'histidine 61 et de la leucine 34 en réponse à l'addition d'une quantité croissante du peptide.

De faibles variations dans les déplacements chimiques sont observées lorsque de grandes quantités du peptide sont ajoutées. Ces changements n'impliquent que quelques résidus et présentent des variations de faible amplitude. Ces données suggèrent que l'affinité est très faible (Kd élevé). Cependant, les résidus affectés par ces modifications, tels qu'identifiés grâce à l'attribution réalisée par P. Gans pendant cette collaboration, montrent qu'ils appartiennent majoritairement au sillon des domaines SH3 qui est classiquement impliqué dans l'interaction avec les peptides polyproline. De plus l'expérience réalisée en présence du peptide court E15E (données non figurées) ne modifie pas ni les résidus affectés, ni l'amplitude des variations de manière significative, suggérant que le motif restreint à la forme courte est suffisant pour l'interaction.

Au cours de mon travail de thèse, nous avons reproduit cette dernière expérience mais en présence du domaine SH3 de Hck marqué à l'azote ^{15}N avec le peptide polyproline D28N. Dans une première expérience, le domaine SH3 de Hck a été titré jusqu'à 5 équivalents avec le peptide polyproline.

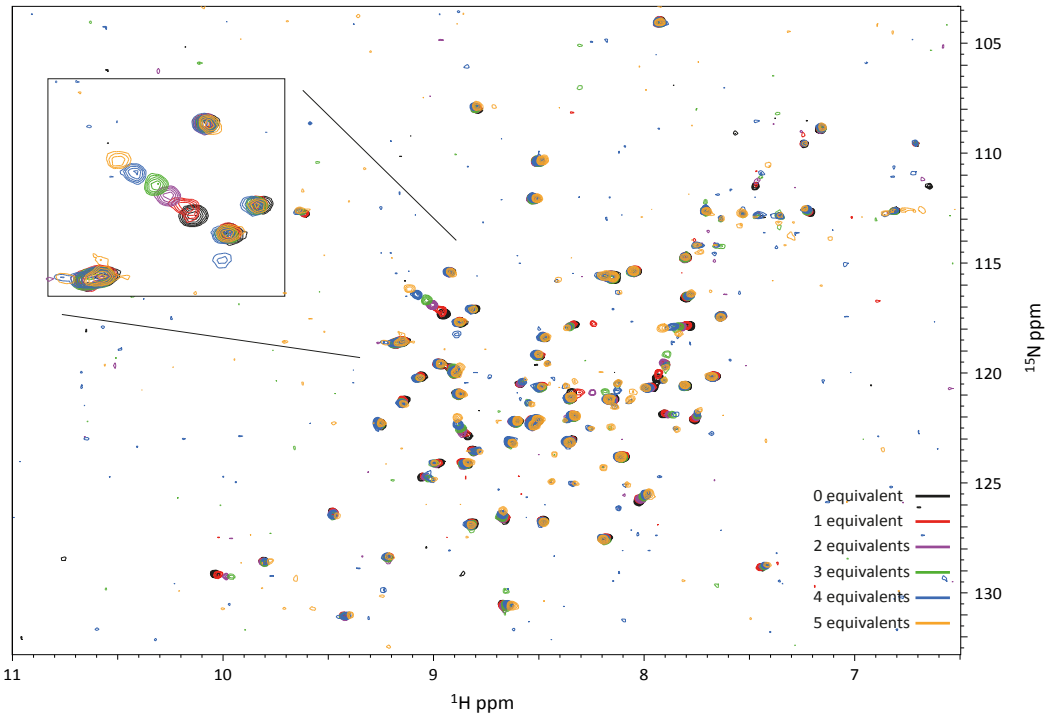


Figure 30. RMN : Titration du SH3(Hck) avec le motif polyproline d'ELMO D28N
Superposition des spectres 2D ^{15}N-HSQC de SH3 de Hck marqué ^{15}N obtenus avec quantités croissantes du peptide D28N ajouté. Le spectre complet de la protéine SH3 (en noir) est réalisé en l'absence de peptide ajouté. Les spectres superposés (allant du rouge jusqu'au jaune) représentent des quantités croissantes du peptide polyproline ajouté (de 1 à 5 équivalents).

On observe des déplacements chimiques qui impliquent plusieurs résidus, ces déplacements sont faibles mais néanmoins plus importants que ceux observés dans le cas du domaine SH3 de DOCK180 (Figure 30). Ces résultats obtenus par RMN sont en accord avec ceux du pull-down, et démontrent que le domaine SH3 de Hck peut interagir directement avec le polyproline d'ELMO. Cette conclusion permet de mieux comprendre la dépendance stricte vis à vis du motif polyproline de l'interaction de la construction C-terminale d'ELMO avec le SH3 de Hck.

Ces données suggèrent également une meilleure affinité pour cette interaction par rapport à celle observée avec le domaine SH3 de DOCK180 dans les travaux antérieurs du laboratoire. Nous calculerons cette constante dans la suite de ce chapitre.

1. Attribution et calcul de la constante d'affinité

Afin de calculer la valeur de la constante d'affinité, Pierre Gans a procédé à une titration du domaine SH3 de Hck avec le peptide polyproline jusqu'à se rapprocher de la saturation (55 équivalents du peptide polyproline synthétique D28N). Le principe de ce calcul est de mesurer le déplacement d'une série de résidus représentatifs en fonction de la concentration de ligand ajouté. La courbe obtenue par régression permet de mesurer la constante d'affinité. La figure 31 illustre ces déplacements (A) et les courbes de régression (B) de quelques uns des pics correspondant aux résonnances des résidus indiqués (L'attribution des pics a été obtenue par comparaison avec celle publiée par le groupe de Willbold ; (Schmidt et al. 2007). Les résidus qui se déplacent le plus sur les spectres 2D sont analysés et les constantes associées ont été calculés (Tableau XIII). La moyenne des constantes calculée en prenant en compte ces 5 déplacements parmi les plus significatifs est de 1,8±0,19mM. Ces déplacements significatifs, comme ceux par exemple du tryptophane 113 (W113sc) et de la sérine 129, sont figurés et les variations de leurs déplacements chimiques tracés en fonction du ratio de ligand ajouté (Figure 31 A et B).

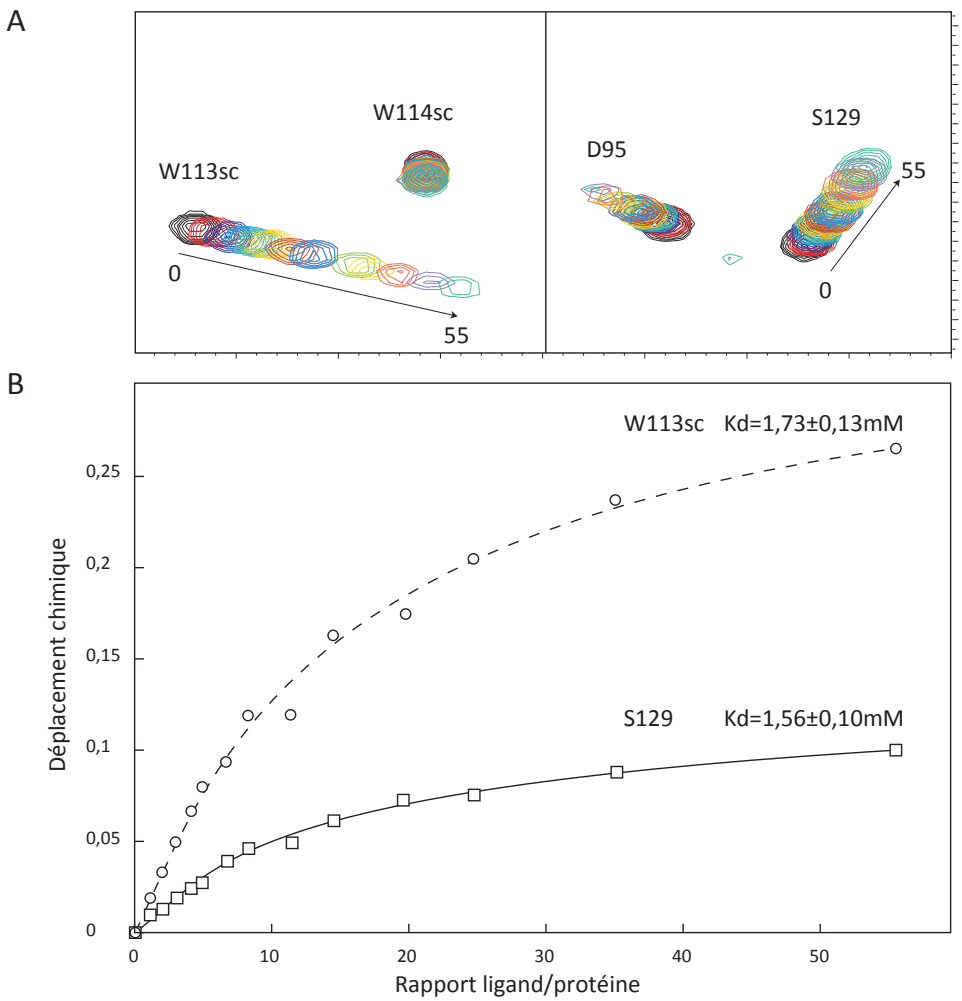


Figure 31. RMN : Déplacements chimiques SH3(Hck) en présence de D28N
A) Extrait des spectres qui montrent les déplacements chimiques des résidus tryptophanes W113sc, W114, D95 et S129 du SH3 de Hck avec des concentrations croissantes identiques (de 0 à 55 équivalents du peptide D28N). B) courbes comparées des déplacements du tryptophane W113sc (cercles) et de la sérine 129 (carrés). Les constantes indiquées sont celles calculées pour le résidu W113 et le résidu S129, mais sont représentatives de la constante moyenne (voir tableau XIII).

Résidu	Kd (mM)	Coefficient R	χ^2
D95	1,7±0.18	0,995	$5\ 10^{-5}$
S110	1,97±0,39	0,981	$8\ 10^{-4}$
E112	1,84±0.14	0,997	$1\ 10^{-4}$
W113sc	1,73±0.13	0,997	$5\ 10^{-4}$
S129	1,56±0.1	0,998	$8\ 10^{-5}$

Tableau XIII. Calculs des constantes d'affinités de l'interaction du domaine SH3 de Hck avec le peptide D28N. Les résidus indiqués sont ceux dont les déplacements chimiques observés sont les plus significatifs. Les mesures statistiques des coefficients de régression (R) et du χ^2ont été calculés.

C. Effet de la phosphorylation sur l'interaction

Comme nous l'avons noté dans l'introduction de ce travail, ELMO est une cible de la phosphorylation par Hck. Les fonctions associées à ces phosphorylations sont pourtant encore peu étudiées. Parmi les 5 tyrosines phosphorylables *in vitro* par Hck, la tyrosine Y720 a attiré notre attention. Cette tyrosine est la plus phosphorylée parmi les 5 tyrosines cibles de Hck, mais sa mutation contre une phénylalanine non-phosphorylable ne modifie pas la capacité de phagocytose des fibroblastes LR73 co-transfectés avec DOCK180 (Yokoyama et al. 2005). Cette observation montre que cette phosphorylation n'est pas nécessaire à la phagocytose, cependant la position de cette tyrosine qui est proche du motif polyproline n'exclut pas la possibilité d'un rôle dans la régulation fine du recrutement de Hck ou d'autres partenaires dépendant de la région C-terminale d'ELMO. Nous avons donc voulu profiter de notre approche par RMN pour étudier l'influence de la phosphorylation sur l'interaction entre le domaine C-terminal d'ELMO et le SH3 de Hck.

A ces fins, nous avons fait synthétiser un peptide D28N phosphorylé sur la position 720 (Proteogenix, voir ci dessous et Tableau XII) afin d'étudier l'influence de celle-ci sur l'interaction du peptide avec le domaine SH3 de Hck par RMN.

Nous avons donc procédé en collaboration avec P. Gans, à la titration du domaine SH3 de Hck marqué, par des concentrations croissantes du peptide Phospho-D28N. La comparaison des déplacements chimiques des résidus du SH3 de Hck titrés par le peptide phosphorylé ou non, montre d'une part que les mêmes résidus sont affectés dans les deux circonstances, ce qui implique que la liaison reste de nature similaire malgré la phosphorylation, mais que ces déplacements sont moins importants si la tyrosine 720 est phosphorylée (Figure 32).

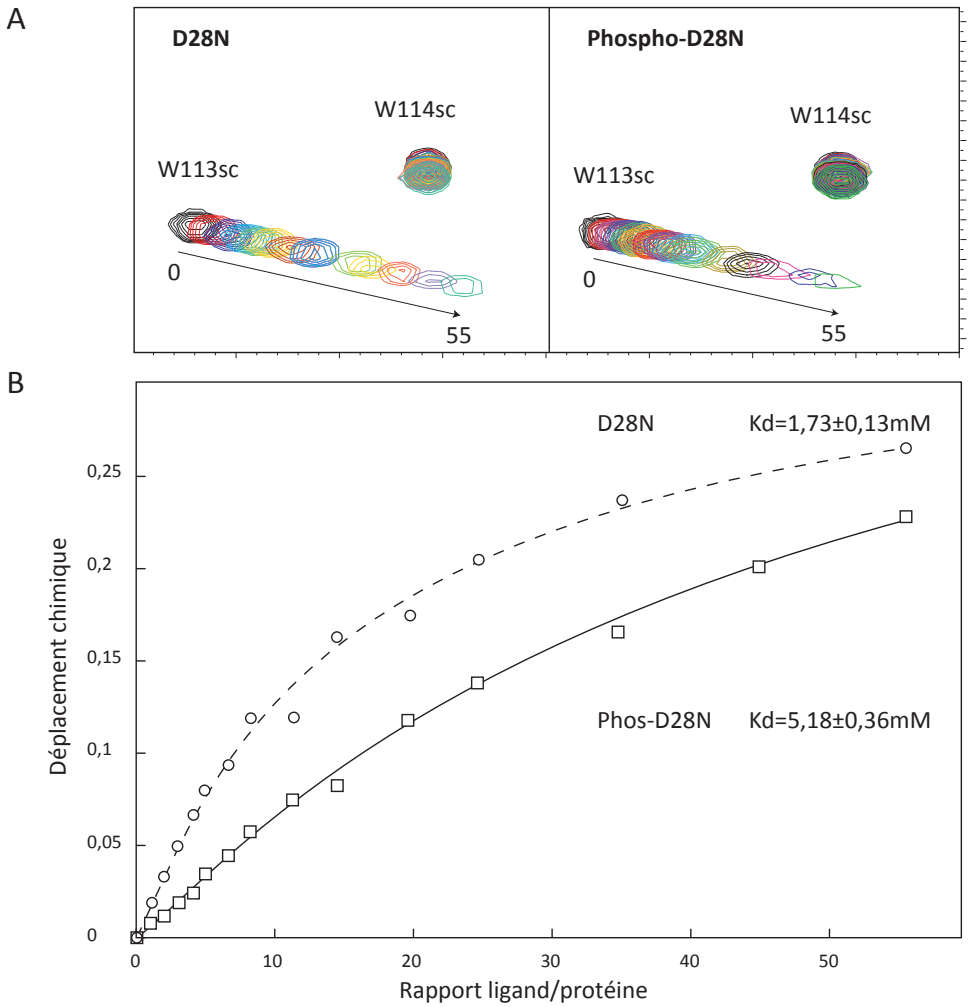


Figure 32. RMN : Déplacements chimiques SH3(Hck), Phospho-D28N (ELMO)
A) Extrait des spectres qui montrent les déplacements chimiques des résidus tryptophanes W113sc et W114 du SH3 de Hck avec des concentrations croissantes identiques (de 0 à 55 équivalents) du peptide D28N (à gauche) et de sa forme phosphorylée (à droite). B) courbes comparées des déplacements du tryptophane W113sc pour le phospho-peptide (carrés) ou du peptide non phosphorylé (cercles). Les constantes indiquées sont celles calculées pour le résidu W113 figuré, mais sont représentatives de la constante moyenne (voir tableau XIV).

Comme pour les spectres précédents, la constante d'affinité a été calculée à partir des régressions des fonctions des déplacements chimiques en fonction des concentrations de peptide ajouté (Tableau XIV). La constante d'affinité obtenue à partir de ces calculs est de 4,9±0,26mM. Cette valeur quasiment 3 fois plus grande que pour le peptide non-phosphorylé montre que la phosphorylation de la tyrosine 720 diminue l'interaction entre le domaine C-terminal d'ELMO et le SH3 de Hck, ce qui suggère qu'elle pourrait moduler négativement l'interaction des partenaires dans le contexte physiologique.

Résidu	Kd(mM)	Coefficient R	χ^2
D95	7,9±0,17	0,994	$1\ 10^{-4}$
S110	5,08±0,18	0,999	$1\ 10^{-5}$
E112	4,68±0,29	0,999	$5\ 10^{-5}$
W113sc	5,18±0,36	0,999	$1,5\ 10^{-4}$
S129	4,55±0,3	0,999	$2,5\ 10^{-5}$

Tableau XIV. Calculs des constantes d'affinités de l'interaction du domaine SH3 de Hck avec le peptide Phospho-D28N. Les résidus indiqués sont parmi les positions dont les déplacements chimiques observés sont les plus significatifs. Les mesures statistiques des coefficients de régression (R) et du χ^2ont été calculés.

Cet effet inhibiteur de la phosphorylation est en accord avec les données publiées mais non exploitées par Yokoyama et collaborateurs (Yokoyama et al. 2005). Dans leurs travaux, des mutants de phosphorylation de la protéine ELMO sont exprimés en présence de Hck par transfection transitoire, la protéine ELMO est ensuite immunoprécipitée et révélée par un anti-phosphotyrosine. Dans le cas du mutant tyrosine Y720F (et dans une moindre mesure la tyrosine 395) on observe une augmentation de la phosphorylation de la protéine ELMO (*Cf.* Discussion générale, Figure 50).

D'une part nos résultats montrent que la phosphorylation de la tyrosine 720 défavorise l'interaction entre le peptide polyproline (domaine C-terminal d'ELMO) et le SH3 de Hck, et d'autre part que la mutation de ce site favorise la phosphorylation des autres tyrosines par Hck. Or l'activation de Hck est dépendante de l'engagement de son domaine SH3 qui joue un rôle régulateur (Superti-Furga et Courtneidge 1995). Ces données semblent suggérer que la tyrosine 720 puisse être impliquée dans une boucle d'autorégulation négative de la phosphorylation d'ELMO par phosphorylation du site d'interaction avec Hck.

D. Interaction avec le domaine N-terminal d'ELMO

Au cours de nos expériences de co-précipitation (pull-down) réalisées précédemment (voir paragraphe A de ce chapitre), nous avions pu mettre en évidence une interaction du domaine C-terminal d'ELMO avec les domaines SH3 de Hck et de DOCK180. Nous avions également testé l'interaction d'un mutant de délétion d'ELMO dont la partie C-terminale est supprimée (ΔC) qui devait être un témoin négatif. De façon surprenante, nous avons pu observer une interaction inattendue de ce mutant avec le domaine SH3 de Hck. Dans la suite de cette partie, nous avons cherché à mieux caractériser cette interaction atypique

1. Mise en évidence de l'interaction par pull-down

Le pull-down du domaine N-terminal d'ELMO (1-532) a été réalisé contre le domaine SH3 de DOCK180 ou de Hck exprimés en fusions avec la GST, et immobilisés dans les mêmes conditions que celles décrites auparavant.

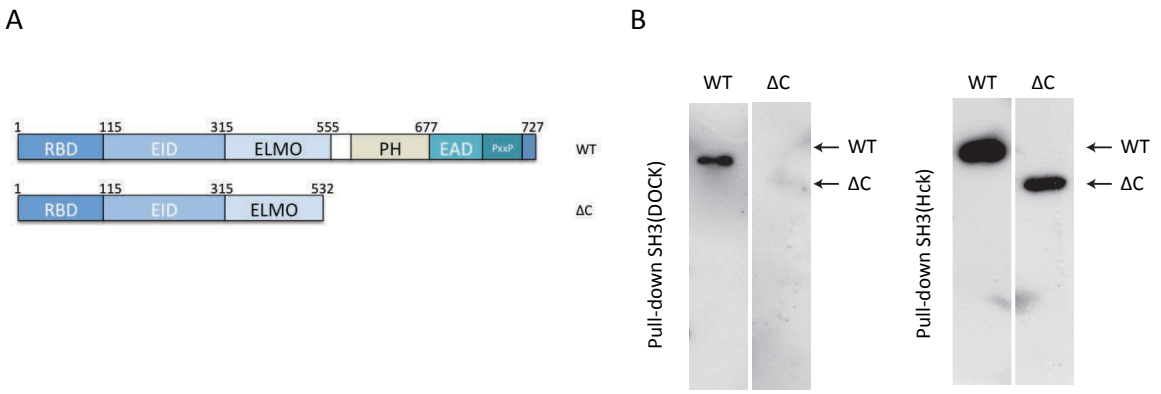


Figure 33. Pull-down d'ELMO par les domaines SH3 de DOCK 180 et d'ELMO
A) constructions d'ELMO sauvage (WT) ou de délétion C-terminale (ΔC) utilisées dans l'expérience. B) Blot des élutions des pull-down d'ELMO sauvage (WT) ou muté (ΔC) après interaction sur les GST-SH3 immobilisés spécifiées. Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide 10% et révélées par un anticorps anti-histidine couplé à la peroxydase.

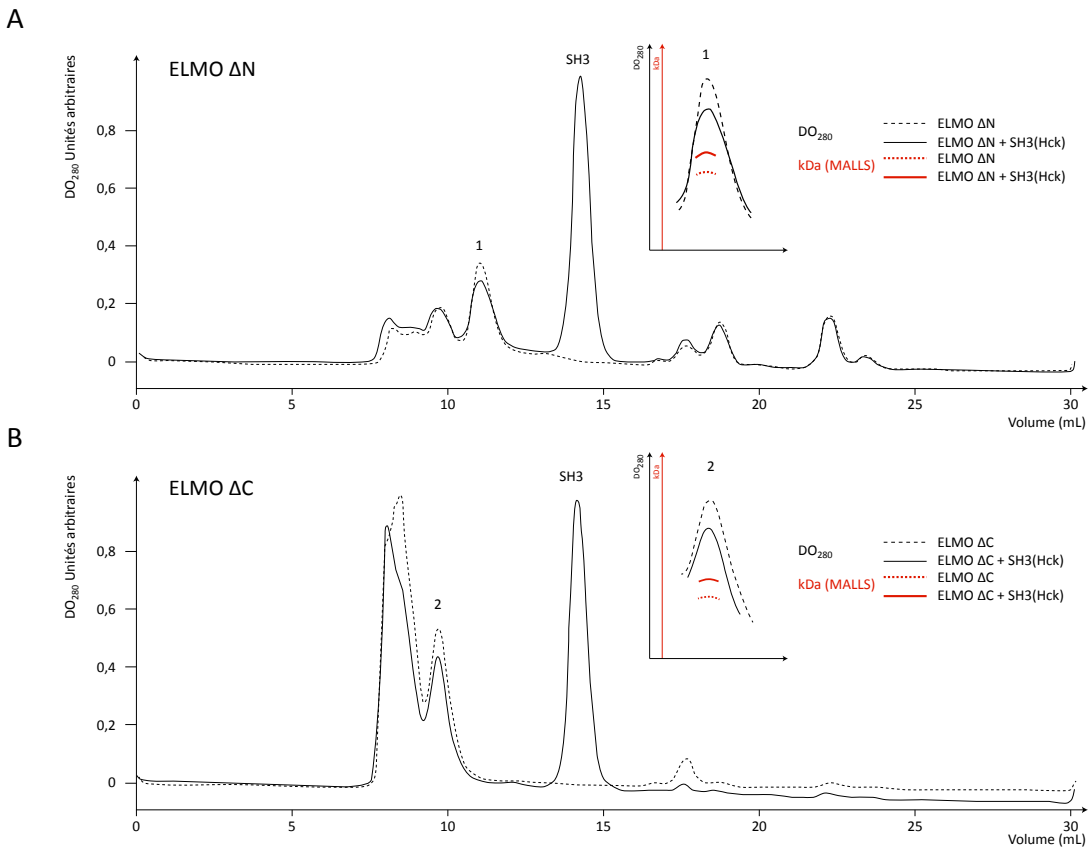
D'après ce blot (Figure 33), on observe que le domaine N-terminal d'ELMO interagit avec le domaine SH3 de Hck, mais pas avec le domaine SH3 de DOCK180. Les plus faibles quantités retenues d'ELMO sauvage sur le domaine SH3 de DOCK180 laissent penser que la faible trace observée cependant à la hauteur de migration du mutant ΔC pourrait être le résultat d'une faible interaction avec le domaine SH3 de DOCK180. Nous ne pouvons en tout cas pas écarter cette hypothèse, mais elle reste cependant largement moins efficace que l'interaction observée pour Hck.

Cette interaction était très inattendue puisqu'il n'y a pas de motif polyproline conventionnel dans cette région N-terminale d'ELMO. Nous avons donc souhaité vérifier cette interaction par une autre méthode : le SEC-MALLS.

2. Complexe ELMO N-terminal /SH3 de Hck par SEC-MALLS

La technique de SEC-MALLS (voir Matériel et Méthodes) permet d'associer grâce à la mesure de la diffraction de la lumière à différents angles (MALLS, Multiple Angle Laser Light Scattering), la mesure de la masse molaire avec la séparation de protéines ou de complexes

d'intérêt par chromatographie d'exclusion (SEC, Size Exclusion Chromatography). Nous avons utilisé cette technique afin de vérifier la présence des complexes des mutants de délétions d'ELMO avec le domaine SH3 de Hck (Figure 34).



Pics	Protéine(s)	Masse observée (Da)	Masse attendue (Da)
1	ELMO ΔN	2,5 10^4±2%	2,6 10^4
1 (+SH3)	ELMO ΔN + SH3	4,3 10^4±9%	3,5 10^4
2	ELMO ΔC	7,8 10^4±0,3%	6,4 10^4
2 (+SH3)	ELMO ΔC + SH3	9,9 10^4±2%	7,2 10^4

Figure 34. Etude par SEC-MALLS des complexes d'ELMO
Séparation par SEC-MALLS des mélanges des domaines C (ΔN ; A) et N-terminaux (ΔC ; B) d'ELMO en présence du domaine SH3 de Hck. Le signal MALLS (kDa) permettant de mesurer les masses moléculaires sous les pics 1 et 2 est présenté en rouge dans l'agrandissement du détail de chaque pic. Les masses molaires identifiées sous les pics indiqués ont été calculées à partir des courbes du signal de diffraction (table). Ces données et les fractions déposées sur gel (non figurées) confirment la présence de complexe entre les espèces en solutions. On note que la colonne utilisée ne permet pas de visualiser une différence notable de temps de rétention des espèces seuls (domaines d'ELMO) ou en complexes (ELMO + SH3).

Le pic correspondant au complexe sort avant celui du SH3 libre et possède le poids moléculaire attendu (Figure 34). Les fractions correspondant aux pics des complexes ont été déposées sur gel SDS-PAGE afin de vérifier la présence des deux protéines (données non figurées). Les données obtenues, sans permettre de confirmer les stœchiométries précises, indiquent la présence de ces complexes, et confirment les résultats obtenus en pull-down.

Puisque l'interaction *in vitro* du domaine N-terminal d'ELMO avec le domaine SH3 de Hck est bien confirmée par nos analyses, il serait intéressant maintenant de localiser la région du domaine N-terminal responsable de cette interaction atypique afin d'en comprendre la nature. Ces données pourront permettre plus facilement d'étudier si cette interaction biochimique peut avoir une signification biologique. Nous pensons en particulier à un rôle dans l'activation de la kinase Hck, et dans sa capacité à phosphoryler ELMO sur les tyrosines 18, 216 et 511 qui pourraient avoir un rôle dans l'efficacité de la phagocytose (Yokoyama et al. 2005). La phosphorylation de la tyrosine 720, comme nous l'avons précédemment suggéré, pourrait être impliquée dans une boucle d'autorégulation de la kinase.

E. Interaction d'ELMO avec Hck et activation de DOCK180.

Les données de la littérature suggèrent que l'interaction de Hck avec ELMO ou sa phosphorylation par la kinase ne modifie pas la capacité d'ELMO à interagir avec DOCK180 (Yokoyama et al. 2005). Comme nous l'avons illustré dans ce travail, le domaine SH3 de Hck est un ligand spécifique du motif polyproline d'ELMO. Au contraire, l'interaction de DOCK180 avec ELMO ne nécessite pas la présence du domaine SH3 qui peut par ailleurs interagir avec ELMO en absence du polyproline. Nous nous sommes donc demandé si ces deux domaines SH3 pouvaient ou non interagir ensemble avec le domaine C-terminal d'ELMO.

1. Complexe ternaire du domaine C-terminal d'ELMO avec les domaines SH3 de DOCK180 et Hck par pull-down.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons voulu utiliser notre essai par pull-down sur le domaine SH3 de DOCK180 en pré-incubant le ligand avec le domaine SH3 de Hck dont la GST a été clivée et purifiée (Protéase Precission, voir Matériels et Méthodes, II-C.1.d). A ces fins, les domaines C-terminal d'ELMO ΔN ou ΔPxP dépourvu du domaine polyproline sont pré-incubés avec le domaine SH3 de Hck. Le mélange est mis ensuite en interaction avec le GST-SH3 de DOCK180 dans les conditions de pull-down décrites auparavant. Les élutions sont analysées par western blot anti-histidine afin de détecter le domaine d'ELMO retenu dans les différentes conditions expérimentales (Figure 35).

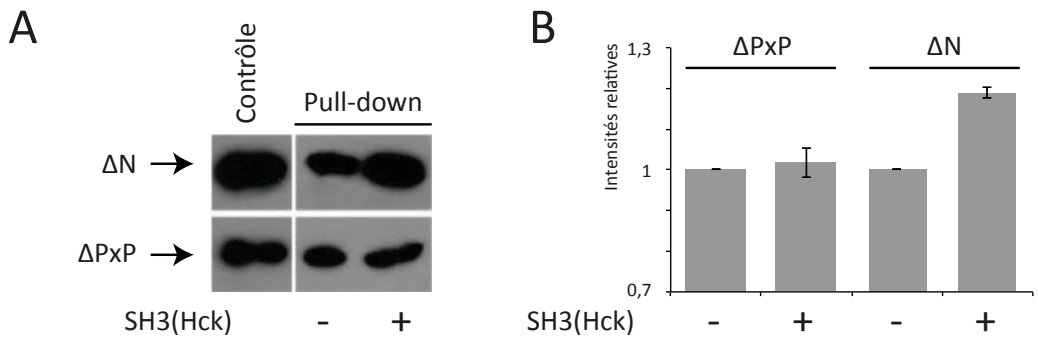


Figure 35. Analyse des interactions du domaine C-terminal d'ELMO.
Pull-down du domaine C-terminal complet (ΔN) ou sans le polyproline (ΔPxP) avec SH3 de DOCK180. Avant l'interaction, les domaines d'ELMO sont pré-incubés une heure à 4 degrés en présence ou en absence du domaine SH3 de Hck. A) blot et B) quantification (3 mesures indépendantes) des bandes visualisées sur le blot (ImageJ / FiJi, (Schindelin et al. 2012). Les valeurs sont normalisées par l'intensité du contrôle sans pré-incubation. En présence du domaine SH3 de Hck, le domaine ΔN mais pas le domaine ΔN dépourvu du polyproline (ΔPxP) semble plus efficacement retenu par le domaine SH3 de DOCK180 immobilisé.

Conformément aux résultats présentés précédemment, le domaine C-terminal est capable d'interagir avec le domaine SH3 de DOCK180 même en l'absence du motif polyproline. En présence du domaine SH3 de Hck, l'interaction des partenaires reste possible, ce qui suggère que les sites d'interaction des domaines SH3 sont distincts sur ELMO ΔN, et qu'un complexe ternaire puisse être formé entre les partenaires. De plus, l'interaction globale semble être améliorée pour le domaine ΔN qui possède l'extension polyproline, mais pas en l'absence de ce motif.

Ces données suggèrent que l'interaction avec le SH3 de Hck stabilise l'interaction du domaine C-terminal d'ELMO avec le SH3 de DOCK180 immobilisé sur la colonne. Si cette hypothèse était confirmée, cela suggèrerait que ces trois protéines pourraient interagir ensemble pour former un complexe ternaire plus stable et influencer l'activation de DOCK180 dépendante d'ELMO.

2. Etude du complexe ternaire par SPR

Dans l'optique de confirmer l'établissement d'un complexe stabilisé entre ELMO et DOCK180 en présence du domaine SH3 de Hck, nous avons souhaité étudier les caractéristiques de cette interaction par SPR. Dans cette expérience, nous avons co-exprimé le domaine C-terminal d'ELMO avec le domaine SH3 de DOCK180 élargi à ses hélices alpha adjacentes (SH3-H). En effet, Dans des travaux récents décrivant l'interaction d'ELMO avec la protéine DOCK2 (Hanawa-Suetsugu et al. 2012), il est clairement établi que le domaine structural de

DOCK2 comprenant le domaine SH3 N-terminal et les hélices alpha adjacentes interagit dans son ensemble avec le C-terminal d'ELMO.

Pour notre expérience, nous avons donc utilisé ce domaine SH3 élargi de DOCK180 (1-177, SH3-H) afin de confirmer qu'un complexe ternaire pouvait toujours se former dans des conditions expérimentales où le domaine ΔN d'ELMO est purifié en complexe avec le domaine SH3-H puis injecté sur la puce chargée avec le domaine SH3(Hck) immobilisé. En parallèle, sur une autre piste, le domaine ΔN d'ELMO purifié seul est injecté sur une puce chargée avec une quantité équivalente du domaine SH3 de Hck immobilisé. Le couplage de GST-SH3(Hck) (1900RU) est obtenu comme décrit précédemment grâce à un anti-GST immobilisé sur la puce. La piste de référence est constituée du couplage secondaire de la GST seule sur l'anticorps anti-GST. L'analyte qui correspond au domaine C-terminal d'ELMO (ΔN) ou en complexe avec le domaine SH3-H de DOCK180 comprenant les hélices adjacentes est injecté à une concentration de 10 µM. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante.

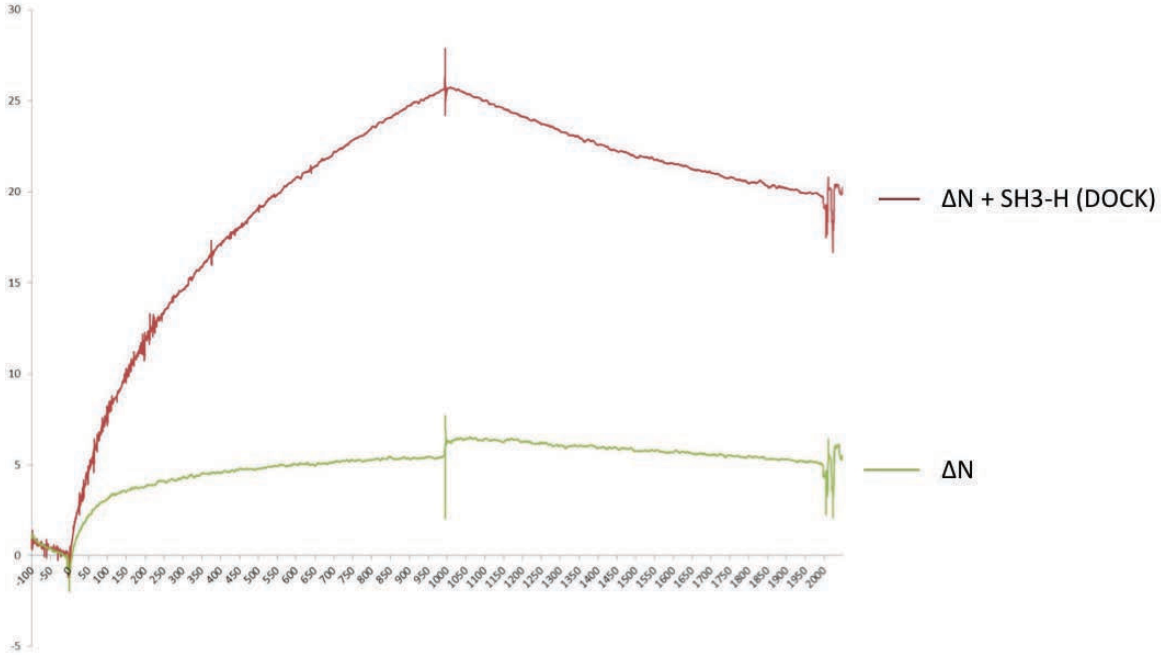


Figure 36. SPR : Interaction des complexes ELMO/DOCK180/Hck
Sensorgrammes de l'interaction sur la fusion GST-SH3(Hck) immobilisée avec le domaine C-terminal d'ELMO tout seul ou en complexe avec le domaine SH3-H de DOCK180. Le domaine C-terminal d'ELMO tout seul (ΔN) en vert ou en complexe avec le domaine SH3-H de DOCK180 comprenant les hélices adjacentes (1-177) en rouge est injecté sur une puce où la GST-SH3 de Hck a été immobilisé. Les courbes représentées sont obtenues après soustraction de la piste de référence (GST seule). Abcisses, temps (s), Ordonnées, Résonance (R.U.). Le temps 0 correspond à l'injection du ligand (ELMO ΔN ou ELMO ΔN en complexe avec SH3-H(DOCK180). Association et dissociation, 1000s.

Le domaine C-terminal d'ELMO interagit comme attendu avec le SH3 de Hck (courbe verte). En examinant le sensorgramme du complexe ΔN+SH3-H, on voit qu'il interagit également avec le SH3 de Hck et que cette interaction présente une valeur de résonnance (RU) plus importante que dans le cas du domaine C-terminal seul. L'augmentation de la réponse est en partie explicable par la masse supérieure du complexe, mais cette différence, de l'ordre de 50% de la masse totale, est moins importante que l'augmentation mesurée de la réponse en SPR. En effet, la réponse dans le cas du complexe ΔN+SH3-H (25 RU) est 5 fois plus importante que celle obtenue avec le domaine C-terminal ΔN (5 RU) alors que le rapport de masse est proche de 2 (SH3-H 20,76kDa et ELMO ΔN 22,63kDa, Figure 36).

Ces données préliminaires obtenues avec une seule concentration de ligand ne permettent cependant pas de calculer des valeurs cinétiques. Néanmoins, elles confirment le pull-down présenté dans le paragraphe précédent, et suggèrent que le domaine C-terminal d'ELMO peut former un complexe ternaire avec le SH3 de Hck et la partie N-terminale de DOCK180 (1-177). L'existence d'un tel complexe dans le contexte biologique pourrait permettre de participer à la régulation de l'activation de DOCK180 par ELMO, à la fois en modulant les affinités entre les partenaires, mais peut-être également en participant à l'activation même de la kinase Hck à travers un mécanisme d'autorégulation qui pourrait impliquer la tyrosine Y720 d'ELMO, comme cela est suggéré par nos expériences de RMN.

Chapitre II: Analyse des interactions dans un contexte physiologique

Analyse des interactions

Les données biochimiques obtenues au cours de mon travail et présentées précédemment, montrent que le domaine C-terminal d'ELMO interagit avec le domaine SH3 de Hck et que cette interaction est strictement dépendante de la présence du domaine polyproline d'ELMO. Il est important de pouvoir vérifier, dans le contexte physiologique, si la présence du motif polyproline est également importante pour l'interaction ELMO-Hck et si cela influence des fonctions cellulaires comme la phagocytose. Dans les différentes expériences réalisées, on utilise les constructions d'ELMO munies d'une étiquette SNAP et le domaine SH3 de Hck muni d'une étiquette CLIP. Ces étiquettes SNAP et CLIP permettent avec les mêmes constructions la purification à partir de lysat (voir le chapitre Tandem-Affinity purification de cette section), le marquage sur western blot, et les applications de la fluorescence (voir Matériels et Méthodes, Section II-D.6.a.2). Alternativement, l'une ou l'autre des constructions peuvent être également utilisées en fusion avec une protéine fluorescente comme la GFP. L'utilisation de ces constructions particulières sera précisée dans les paragraphes correspondants.

Afin de vérifier l'interaction des protéines dans le contexte cellulaire, nous avons tout d'abord utilisé un simple pull-down des lysats cellulaires des cellules HEK293T transfectées par les constructions d'ELMO et de Hck, en utilisant les étiquettes SNAP et CLIP pour séparer puis analyser les complexes ainsi purifiés.

1. Pull-down par immobilisation des domaines SNAP-ELMO sur les billes magnétiques

Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec la construction CLIP-SH3 (Hck) et la protéine ELMO complète (WT) ou ses mutants de délétion ΔN (domaine C-terminal) ou ΔPxP (domaine C-terminal sans le domaine polyproline). Les cellules sont lysées puis incubées avec les billes magnétiques (SNAP-Capture magnetic beads) afin d'immobiliser la protéine ELMO et ses différents domaines via le tag SNAP. Les protéines sont ensuite éluées

(Matériels et Méthodes) et la présence du CLIP-SH3(Hck) retenu en cas d'interaction avec ELMO sera vérifiée par western blot.

Deux contrôles importants sont faits: le premier consiste à vérifier que la protéine CLIP-SH3 ne se lie pas non spécifiquement sur les billes magnétiques (contrôle avec des cellules HEK293T qui expriment simplement le CLIP-SH3); le deuxième consiste à vérifier que l'interaction n'est pas détectée par pull-down si les protéines sont mélangées après la lyse de cellules exprimant séparément les deux partenaires (premier puits).

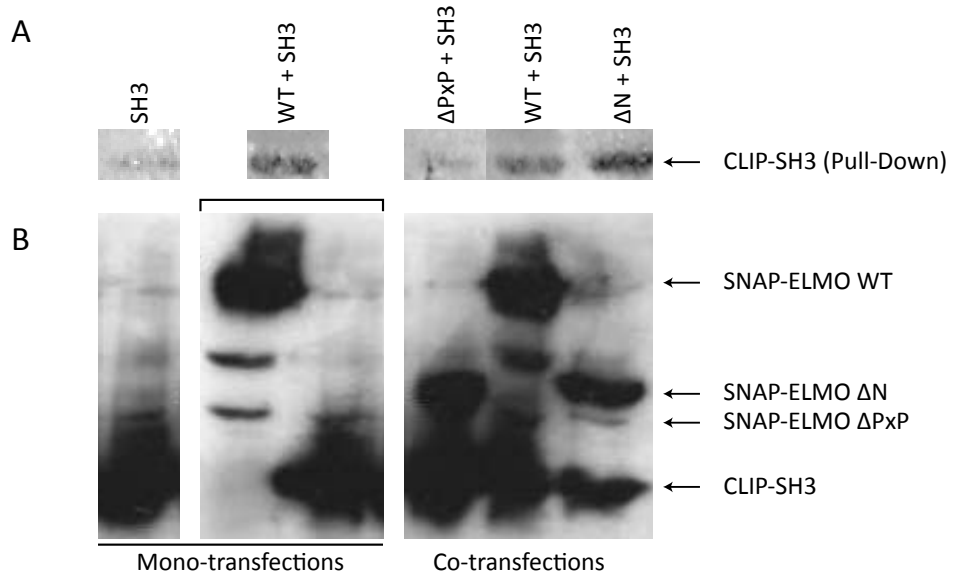


Figure 37. Détection des complexes SH3(Hck) et ELMO par pull-down
A) Immunocoloration de CLIP-SH3(Hck) après co-purification spécifique des fusions SNAP-ELMO sur colonne SNAP-Capture et élution par digestion à la TEV. B) Expression après transfection ou co-transfections de CLIP-SH3 et des constructions de SNAP-ELMO. Les échantillons sont déposés sur gel SDS-PAGE (12%) puis transferés avant immunocoloration des fusions CLIP et SNAP par l'anticorps polyclonal P9310 (anti-SNAP-tag, NEB, spécifique des tags SNAP et CLIP). Les positions des migrations attendues des protéines de fusion transfectées sont indiquées à droite de la figure. Le puits WT+SH3 correspond au mélange des deux lysats issus des transfections simples de CLIP-SH3 et de SNAP-ELMO WT. Il montre que CLIP-SH3 peut être retenu par SNAP-ELMO lorsque l'interaction a lieu dans le lysat cellulaire. Dans les cellules co-transfectées, on observe la co-purification de CLIP-SH3 seulement avec les constructions d'ELMO présentant le motif PxP (WT+SH3 et ΔN+SH3). Le contrôle CLIP-SH3 seul (à gauche) montre le signal résiduel non spécifique.

L'analyse du blot montre que dans le cas de la protéine ELMO complète (WT) ou du domaine C-terminal complet (ΔN) on voit une bande qui correspond à CLIP-SH3 dans l'élution du pull-down alors que dans le cas du domaine C-terminal sans le domaine polyproline aucune bande n'est détectée (puits ΔPxP+SH3), comme pour le contrôle négatif. Ces résultats sont conformes avec les données obtenues avec les mêmes domaines purifiés (surexpression bactérienne), et qui montrent que l'interaction entre le SH3 de Hck et le C-terminal d'ELMO est dépendante du polyproline (Figure 37).

Cependant, en examinant les contrôles, on s'aperçoit que si la protéine CLIP-SH3 n'interagit pas de manière aspécifique avec les billes magnétiques, puisqu'elle n'est pas détectée dans l'élution du contrôle du pull-down où elle est exprimée seule, elle est bien retenue lorsque les protéines sont exprimées séparément, et mises en contact avant le pull-down (premier puits contrôle, Figure 37). Ces données montrent que les deux protéines peuvent interagir ensemble après la lyse, et que cette expérience n'est pas suffisante pour affirmer que l'interaction est réelle *in cellulo*. Afin de vérifier l'interaction au sein d'une même cellule exprimant les deux partenaires, nous avons donc débuté une analyse par FRET des interactions cellulaires par cytométrie en flux.

2. Mesure de FRET par cytométrie en flux

Le FRET permet lorsque les deux protéines marquées (fluorescence) sont suffisamment proches, de mesurer un transfert d'énergie de fluorescence par résonance ce qui permettra la visualisation des interactions dans un contexte cellulaire. Le FRET est un signal de fluorescence, et peut être mesuré en particulier par microscopie confocale ou en cytométrie en flux. On choisit d'utiliser la cytométrie parce qu'elle présente plusieurs avantages. Elle permet de réaliser une étude statistique à travers une analyse rapide et simple d'un grand nombre de cellules (vivantes ou fixées), elle permet aussi de s'affranchir des problèmes de recouvrement spectral grâce aux compensations entre les canaux. Dans notre expérience, les constructions d'ELMO utilisées sont les mêmes que celles dans la stratégie du TAP-tag afin d'associer la purification des complexes à des fonctions au niveau cellulaire. Le choix des étiquettes SNAP pour les constructions TAP-tag était guidé par la possibilité de mener en parallèle des expériences basées sur la fluorescence associée.

a) Choix des couples donneur/accepteur

Les tags SNAP et CLIP réagissent spécifiquement et respectivement avec des dérivés benzylguanine (BG) et benzylcytosine (BC) conduisant à l'association covalente de ces protéines avec des sondes fluorescentes qui peuvent être excitées avec différents lasers.

Donneur \ Accepteur	SNAP OG	SNAP 505	CLIP 505	SNAP TMR	CLIP TMR		
SNAP 430			484 : 505		484 : 554	V1 ou V2	Canal direct
CLIP 430	484 : 490	484 : 505		484 : 554			
SNAP OG					514 : 554	B1	
SNAP 505					532 : 554		
CLIP 505				532 : 554			

B1	**Y2**	**Canal direct**
V2	**B2**	**Canal de FRET**

Tableau XV. Représentation croisée des couples de composés utilisables comme donneur (lignes) ou accepteur (colonnes). Pour les couples possibles, les longueurs d'ondes d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur sont indiquées. La couleur du fond est d'autant plus claire que le couple présente un bon chevauchement des spectres. On appelle «canal direct» le canal optimal d'émission des fluorophores après excitation directe par le laser adapté, alors que le canal de FRET correspond à l'émission de l'accepteur après excitation indirecte par le donneur. Les canaux utilisables sur le cytomètre (MACSQuant VYB) sont indiqués. Les canaux V1 et V2 correspondent à une excitation à 405nm et une émission respectivement à 450±25 et 525±25nm ; les canaux B1 et B2 à une excitation à 488nm et une émission respectivement à 525±25 et 615±10nm ; et Y2 à une excitation à 561nm et une émission à 615±10nm.

Cette variété dans les sondes fluorescentes permet la formation de plusieurs couples donneur/accepteur (voir Matériels et Méthodes, section II-D.6). Le choix des couples donneur/accepteur implique que le spectre d'émission du donneur recouvre au moins d'une façon partielle le spectre d'excitation de l'accepteur, les choix potentiels des différents couples SNAP/CLIP sont illustrés dans le tableau XV.

b) Détection du signal de FRET

Pendant le FRET, le fluorochrome donneur est excité à une certaine longueur d'onde λ_1 et va émettre à une longueur d'onde λ_2 supérieure à λ_1. Si le fluorochrome accepteur est suffisamment proche (distance < 10 nm), l'émission du donneur sera responsable de l'excitation de l'accepteur qui va émettre à son tour. Le signal de FRET correspond à l'émission de l'accepteur lorsqu'on excite le donneur. Pour nos premiers essais nous avons sélectionné le donneur CLIP 505 (λ_1=505nm, émission 532nm) pour marquer la protéine CLIP-SH3 (Hck) et l'accepteur SNAP TMR (λ_2=554nm, émission 580nm) pour marquer les constructions choisies d'ELMO.

c) *Premier essai pour détecter le signal de FRET*

Les cellules HEK293T ont été soit co-transfectées avec CLIP-SH3 (Hck) et les différents domaines d'ELMO munis d'une étiquette SNAP, soit transfectées avec l'une ou l'autre des deux protéines (contrôles pour les réglages des compensations). Les cellules sont ensuite marquées avec le couple SNAP TMR/CLIP 505 selon le protocole développé dans le Matériels et Méthodes (Section II-D.6.a.2). Dans cette expérience, nous souhaitions pouvoir observer un signal de FRET seulement lorsque les deux protéines sont co-exprimées. Si le domaine SH3 de Hck interagit avec les différents domaines de la protéine SNAP-ELMO, alors le tag SNAP devrait être suffisamment proche du tag CLIP pour qu'il soit excité à son tour.

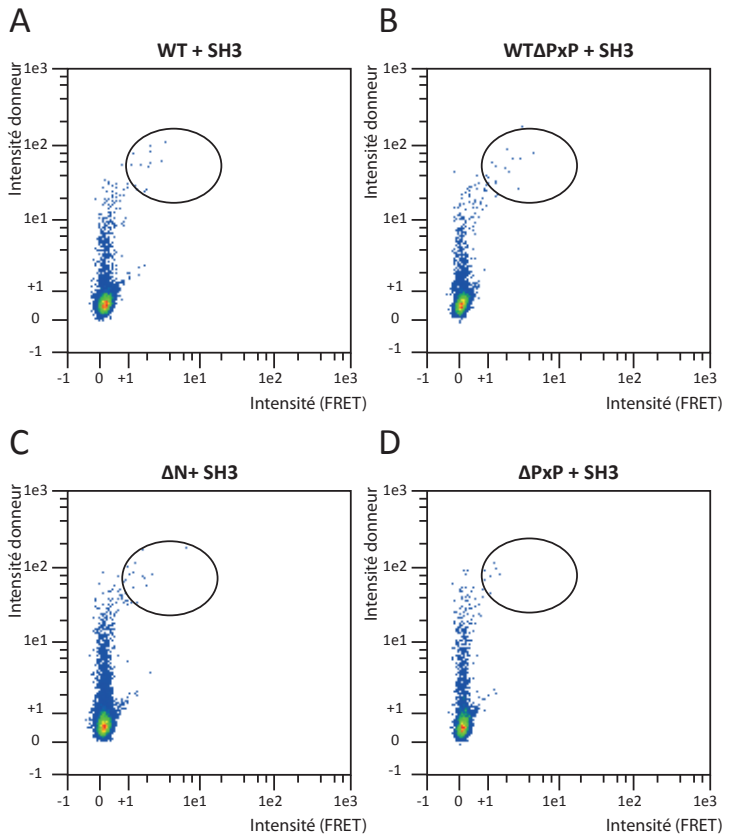


Figure 38. Analyse FRET par cytométrie en flux
Dot-plots représentant la fluorescence des cellules dans le canal du donneur CLIP-SH3(Hck) excité par le laser bleu et dans le canal de l'accepteur SNAP-ELMO suite à l'excitation du donneur. La zone entourée montre les évènements positifs pour le signal de FRET.

La figure 38 présente les dot-plots obtenus avec les différents domaines transfectés, et montrent l'intensité du donneur en fonction de l'intensité du FRET (accepteur). Si le FRET est présent, on s'attend à voir des évènements positifs pour l'intensité du donneur présenter également une intensité positive dans le canal de FRET. En examinant les différents profils

obtenus, on voit qu'en présence de la protéine ELMO complète (WT) ou dépourvu du domaine polyproline (WTΔPxP) ou du domaine C-terminal (ELMO ΔN), il y a quelques évènements positifs qui apparaissent. Mais dans le cas du domaine C-terminal sans le polyproline (ΔPxP), cette population doublement positive est presque inexistante (Figure 38D).

Cependant, le nombre total des évènements positifs reste très faible, le FRET n'étant observé que pour des cellules fortement fluorescentes dans le canal du donneur (c'est-à-dire expriment fortement SH3 de Hck). Cette expérience révèle toutefois une petite différence de signal en fonction de l'absence ou de la présence du domaine polyproline pour le domaine d'ELMO co-exprimé, ce qui est conforme à nos résultats précédents qui montrent la dépendance de l'interaction vis à vis du motif polyproline. Cette première expérience a également mis en évidence que le signal de FRET est dépendant de l'intensité des marquages et en particulier limité par le marquage du donneur. Selon ces intensités, le seuil permettant de distinguer les évènements positifs peut-être délicat à définir comme dans l'expérience montrée ici (Figure 38).

Il est intéressant de noter que le dot-plot correspondant à la construction d'ELMO complet sans le polyproline (WTΔPxP, figure 38B) présente également un nombre d'évènements positifs plus important avec une intensité de fluorescence supérieure. Ce résultat, s'il était confirmé, serait en accord avec les données obtenues en pull-down et en SEC-MALLS qui suggéraient une interaction entre le domaine N-terminal d'ELMO et le SH3 de Hck.

d) Choix du meilleur couple SNAP / CLIP

Comme mentionné auparavant, les tags utilisés ne sont pas naturellement fluorescents, mais le deviennent en se liant spécifiquement à un substrat fluorescent. La génération d'un donneur dont l'émission est suffisante pour exciter l'accepteur dépend du chevauchement des spectres d'excitation et d'émission, mais aussi de l'efficacité des marquages. Le marquage du tag CLIP ou SNAP avec les différentes sondes fluorescentes est réalisé, et la comparaison des marquages obtenus nous aidera à choisir les couples donneur/accepteur les plus efficaces.

Les cellules transfectées avec les constructions SNAP-ELMO ou CLIP-SH3(Hck) sont marquées avec les différentes sondes correspondantes comme précédemment (voir Matériels et Méthodes, Section II-D.6.a.2).

Afin de mieux distinguer les populations négatives, le contrôle a été réalisé en bloquant l'activité enzymatique des protéines SNAP et CLIP des cellules transfectées par le SNAP cell Block (bromothenylpteridine, BTP) ou le CLIP cell Block (bromothenylcytosine, BTC) pendant 30 minutes à une dilution de 1/200 selon les préconisations du fabricant. Le SNAP (ou CLIP) cell Block sont des composés non-fluorescents qui bloquent respectivement la réactivité du tag SNAP ou CLIP. Les différents contrôles permettront également de vérifier l'autofluorescence des cellules naïves et la spécificité des marquages CLIP et SNAP. Les histogrammes obtenus sont représentés dans la figure suivante (Figure 39).

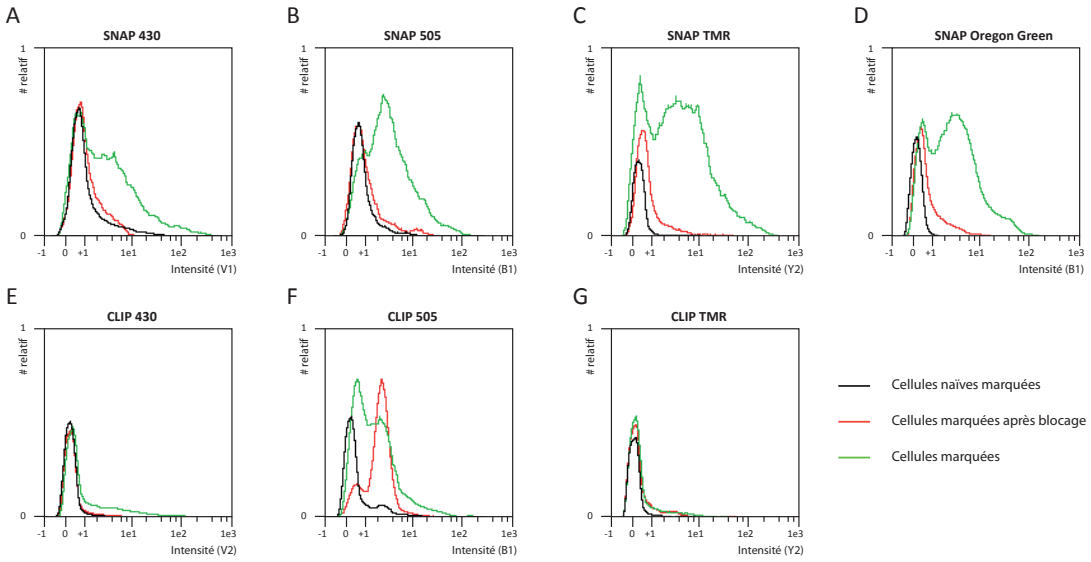


Figure 39. Tests par cytométrie des marqueurs CLIP et SNAP
Les différents histogrammes représentent les courbes obtenues après marquage des protéines SNAP ou CLIP transfectées et marquées (courbes vertes) ou marquées après blocage (courbes rouges) avec les composés SNAP ou CLIP Cell block. Les courbes noires représentent les cellules contrôles non transfectées marquées. Dans chaque cas, le canal de fluorescence le plus approprié est utilisé. Les canaux V1 et V2 correspondent à une excitation à 405nm et une émission à 450±25nm (V1) ou 525±25nm (V2) ; B1 [Exc 488nm, Em 525±25nm] et Y2 [Exc 561nm, Em 615±10nm].

La comparaison des profils obtenus pour les différents marquages permet de voir que le marquage SNAP est toujours meilleur que celui du CLIP dans des conditions équivalentes. Dans toutes les conditions pour l'expression de SNAP, on observe que la courbe correspondant aux cellules transfectées et marquées est bien décalée vers les valeurs supérieures par rapport aux contrôles. Pour CLIP, le faible marquage (taux de transfection faibles, et mortalité cellulaire élevée pendant l'expérience) ne permet pas de conclusion

simple. Cependant, parmi les couples donneur/accepteur possibles, nous avons décidé de choisir le couple CLIP 430/ SNAP Oregon Green (SNAP-OG). Ce couple présente en effet à la fois un chevauchement spectral optimal, et des valeurs de contrôles permettant de mieux séparer les populations positives. CLIP 430 émet après excitation à une longueur d'onde (484nm) très proche de la valeur d'excitation maximale du SNAP-OG (490nm).

(1) Contrôle de FRET : Fusion CLIP-SNAP

Afin de confirmer de manière efficace la capacité de mesurer un signal de FRET dans notre modèle cellulaire et avec l'instrument disponible sur la plateforme d'imagerie cellulaire de l'IBS, nous avons créé un contrôle en réalisant une protéine de fusion CLIP-SNAP. Les données sur le clonage de ce vecteur sont décrites dans la partie Matériels et Méthodes (section II-A du Matériels et Méthodes). La présence du tag CLIP en fusion avec le tag SNAP assure une proximité suffisante pour permettre la mesure d'un signal de FRET entre les deux protéines.

Dans notre expérience, les cellules sont transfectées soit avec la protéine CLIP, ou la protéine SNAP, avec les deux protéines (co-transfection) ou avec la fusion CLIP-SNAP. Elles sont ensuite marquées avec le couple CLIP 430 /SNAP-OG. Les évènements choisis pour l'analyse de la protéine de fusion sont des évènements positifs pour les deux marquages, qui ont été identifiés en se basant sur les contrôles simplement marqués.

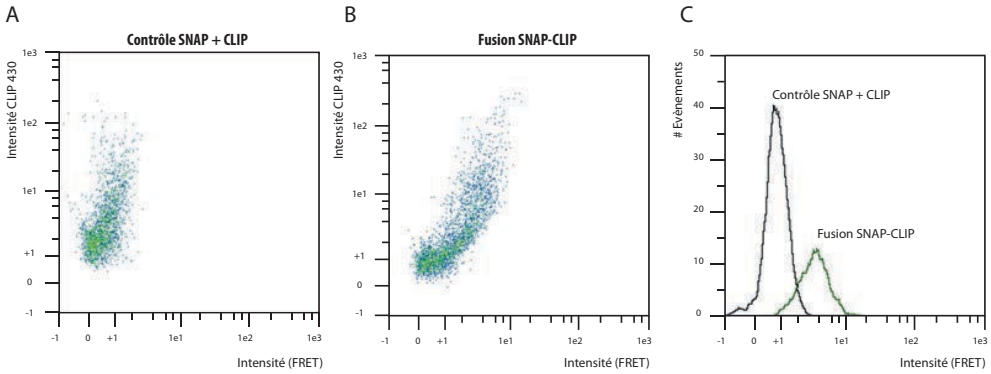


Figure 40. Contrôles de FRET en cytométrie
Dot-plots figurant des cellules co-transfectées avec SNAP et CLIP (A) ou avec la fusion SNA-CLIP (B). CLIP est marquée avec CLIP 430 et analysée à 450 nm. SNAP est marquée avec le SNAP-OG, la fluorescence de l'accepteur est analysée à 525 nm. L'histogramme représenté en (C) montre l'augmentation de l'intensité de l'accepteur dans le cas de la fusion par rapport au contrôle.

Les dot-plots obtenus (Figure 40) montrent l'intensité du FRET en fonction de l'intensité de l'accepteur. En comparant l'intensité du FRET dans le contrôle SNAP + CLIP ou dans l'essai en présence de la fusion, on voit un décalage de la population doublement positive dans l'essai. Ce décalage est très clair dans la représentation en histogramme de cette population (Figure 40C). La valeur moyenne de l'intensité du contrôle s'établie en effet à 0,97±0,26 contre 4,26±1,01 pour les cellules transfectées avec la fusion.

(2) Mesure du FRET dans le cas des domaines mutants du C-terminal d'ELMO

Nous avons appliqué la méthode définie grâce aux tests précédents sur les cellules co-transfectées avec le domaine SH3 de Hck en fusion avec CLIP et les fusions SNAP des mutants du domaine C-terminal d'ELMO avec (ΔN) ou sans le motif polyproline (ΔPxP), puis procédé au marquage avec le couple donneur/accepteur CLIP 430 /SNAP-OG.

En conservant des réglages identiques du cytomètre, les profils obtenus pour les populations doublement positives sont montrés dans la figure suivante.

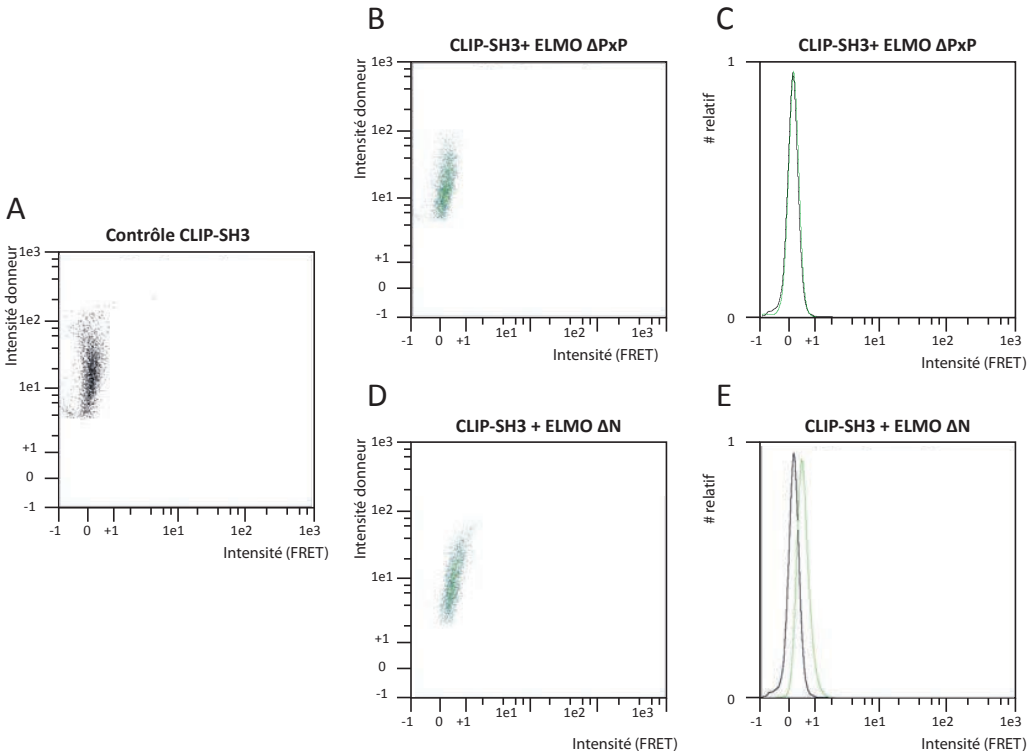


Figure 41. Analyse du FRET des cellules transfectées par ELMO et SH3(Hck)
Histogrammes des intensités de l'accepteur (FRET) dans le cas où les cellules sont transfectées soit avec CLIP-SH3(Hck) (Contrôle A, dot plot) ; SNAP-ΔPxP + CLIP-SH3 (B et C) ou avec SNAP-ΔN + CLIP-SH3 (D et E) puis marquées avec le SNAP-OG et le CLIP 430. On observe un décalage du maximum de la population doublement positive (histogrammes C et E) pour le signal mesuré dans le canal de FRET dans le cas SNAP-ΔN +CLIP SH3 (E courbe verte) par rapport à SNAP-ΔPxP+CLIP SH3 (C courbe verte) et par rapport au contrôle négatif (CLIP-SH3 seul, A, et courbes noires, C et E). Le signal de FRET est mesuré ici dans le canal V2 Exc 405nm, Em 525±25nm.

Comme nous l'avions fait dans le cas des contrôles utilsant la protéine de fusion CLIP-SNAP, l'analyse a été réalisée pour la population doublement positive (cette population représente les cellules co-transfectées et s'établit à 55% du total des cellules [ΔN+SH3] ou 46,9% du total [ΔPxP+SH3]). L'histogramme (Figure 41) montre la superposition des deux courbes représentant l'intensité de l'accepteur dans le canal de FRET obtenu pour les deux cas étudiés . On remarque que la courbe en vert (cellules transfectées avec le SNAP-ΔN et le CLIP SH3) a une intensité supérieure (0,33±0,13) à celle de la courbe en noir (0,02±0,16; cellules transfectées avec le SNAP-ΔPxP et le CLIP-SH3). La différence entre les deux courbes n'est pas très élevée en valeur absolue mais reste néanmoins significative. Ces résultats n'ont pas pu être reproduits au cours de mon travail de thèse, mais suggèrent fortement l'interaction entre le domaine C-terminal d'ELMO et le domaine SH3 de Hck dans le contexte physiologique. Cette interaction est de plus dépendante de la présence du polyproline, ce qui confirme les résultats biochimiques.

3. Mesure de l'efficacité de la phagocytose par cytométrie

Afin de confirmer ces résultats d'un point de vue fonctionnel, nous avons souhaité tester l'influence de la coexpression de ces domaines sur l'efficacité de la phagocytose. Notre but initial était de mesurer dans la même expérience le signal de FRET, permettant ainsi de corréler directement l'interaction des partenaires et les modifications éventuelles du taux de phagocytose. A ces fins, le couple donneur/accepteur a été modifié afin de pouvoir mesurer l'internalisation grâce à des billes fluorescentes. Le couple choisi est alors CLIP-SH3(Hck) marqué par le CLIP 430, et l'accepteur la GFP fusionnée en N-terminal des constructions d'ELMO.

a) Effet des différents domaines sur la phagocytose

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les différents domaines GFP-ELMO en présence et en absence du domaine CLIP-SH3 de Hck. La phagocytose a été réalisée après marquage des cellules par le composé CLIP-Cell 430 comme précédemment. Les billes de latex fluorescentes sont ajoutées au milieu de culture à une dilution de 1/2000. La phagocytose est permise par une incubation des cellules pendant 30 minutes à 37°C. Pour

estimer l'efficacité de phagocytose, on mesure le pourcentage de cellules dont le signal est positif pour le canal Y2 dans lequel est mesuré la fluorescence des billes. Cette mesure est corrigée de la valeur obtenue lorsque l'essai est incubé à 4°C, ce qui correspond ainsi à la simple adhésion des billes aux cellules (23%). On mesure également le taux basal de phagocytose de cellules non transfectées et corrigé de l'adhésion mesurée à 4°C (29%).

Pour l'analyse, la population choisie correspond aux cellules positives pour les protéines exprimées (par transfection ou co-transfection). Les cellules seront visualisées dans le canal d'émission des billes fluorescentes, les évènements enregistrés correspondent à des cellules qui ont internalisé des billes.

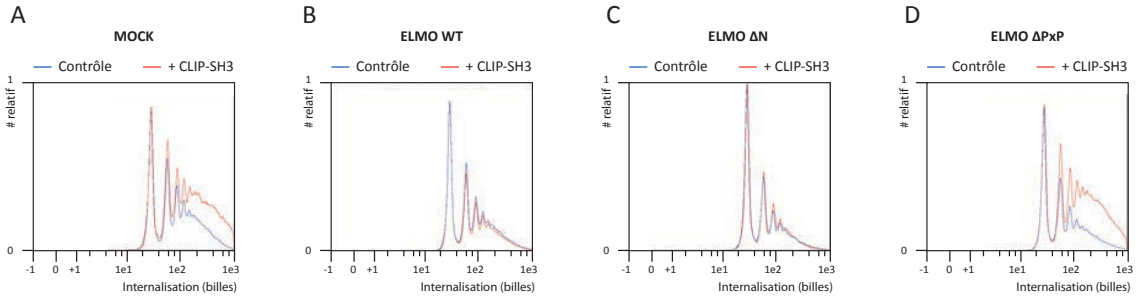


Figure 42. Mesure de la phagocytose par cytométrie

Histogrammes de la fluorescence des billes internalisées par les cellules HEK293T. Les cellules sont transfectées avec différents domaines d'ELMO (B-D) ou naïves (A) en présence de CLIP-SH3 de Hck (courbes rouges) ou en son absence (courbes bleues). On obtient une succession de pics, chacune correspond à l'internalisation d'une bille supplémentaire. On observe un effet de la présence du domaine SH3 de Hck sur l'efficacité de la phagocytose dans les cellules contrôles (A) ou en présence de la co-expression de la protéine GFP-ELMO mutée (ΔPxP), mais pas lorsque ce domaine est coexprimé avec les protéines ELMO sauvages (WT, panneau B) ou C-terminal (ΔN, panneau C).

En examinant les différents histogrammes obtenus (Figure 42), on observe une succession de pics. Chacun correspond à l'internalisation d'une bille supplémentaire par la cellule. On remarque dans un premier temps une superposition entre les courbes dans le cas d'ELMO WT (B) ou du domaine C-terminal complet (ΔN, C) en présence ou en absence du CLIP-SH3(Hck). Alors que dans le cas du domaine C-terminal sans le domaine polyproline (D) on observe une augmentation de la phagocytose en présence du CLIP SH3. Cette augmentation ressemble à celle obtenue pour le CLIP-SH3 seul (A) où la phagocytose augmente en présence du CLIP-SH3 par rapport au contrôle de cellules naïves qui phagocytent à 37°C. En valeurs relatives corrigées des contrôles internes (non-transfectées) à 37°C correspondants, l'augmentation du taux de phagocytose atteint 9,85% pour le SH3 seul, et 7,3% en présence du domaine ΔPxP, alors que les écarts sont de moins de 1% dans les autres cas (WT ou ΔN).

Ces résultats suggèrent que le domaine SH3 de Hck modifie l'efficacité de la phagocytose, et que son interaction avec les domaines d'ELMO surexprimés annule cet effet. Cet effet est visible sur la différence obtenue entre la courbe du CLIP-SH3 et celle du contrôle à 37°C (A) ou en présence du domaine ΔPxP incapable de se lier biochimiquement au SH3 de la kinase Hck (D).

Nous n'avons en revanche pas pu mesurer de variation notable des valeurs du canal de FRET entre la protéine CLIP-SH3 et les fusions GFP d'ELMO et de ses mutants. Il nous a donc été impossible de croiser les données d'interaction avec l'efficacité de la phagocytose. Le choix restreint des couples de fluorophores (limité par la présence des billes fluorescentes) explique ce résultat.

Chapitre III : Purification en mode Tandem (Tandem-Affinity purification)

Stratégie du TAP-Tag

La méthode de purification en mode tandem, TAP, permet la purification de complexes protéiques sous leurs formes natives. Cette méthode mise au point au départ chez la levure grâce aux travaux de Bertrand Séraphin, a été depuis appliquée dans de nombreux autres organismes et nous avons choisi de l'appliquer chez les cellules des mammifères afin d'identifier de nouveaux partenaires potentiels des domaines d'ELMO. Les cellules HEK293T constituent notre modèle d'étude. La méthode repose sur l'utilisation originale d'une étiquette constituée des deux étiquettes d'affinité (tag) séparés par un site de clivage par la protéase TEV. La protéine recombinante est produite proche de son niveau naturel dans le modèle cellulaire d'intérêt. On obtient ainsi après purification un complexe physiologique des cellules étudiées. Le complexe peut être analysé par spectrométrie de masse afin d'identifier ses différents constituants (Figure 43, répétition de la Figure 25 pour plus de facilité).

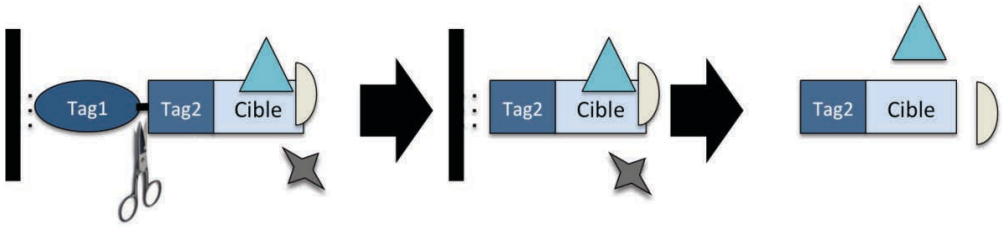


Figure 43. Schéma du principe du TAP-tag
Schéma représentatif de la fusion ainsi que les différents étapes de purification. La protéine cible est tout d'abord purifiée grâce à la première étiquette (tag1), on procède ensuite à une élution par digestion à la TEV qui clive la protéine de fusion qui est finalement purifiée une seconde fois sur colonne de spécifique de la seconde étiquette (tag2). Les protéines associées spécifiquement au complexe sont ainsi purifiées et peuvent être éventuellement identifiées.

La méthode du TAP-tag exige dans un premier temps la fusion de l'étiquette double «TAP» du côté N ou C-terminal de la séquence codant pour la protéine d'intérêt puis l'introduction du plasmide codant pour la protéine dans les cellules hôtes. Les domaines d'ELMO que nous avons choisi d'étudier par cette approche sont représentés dans la figure 44. Il s'agit de la protéine ELMO WT et de son mutant sans polyproline (WTΔPxP) ou du domaine C-terminal avec (ΔN) ou sans le domaine polyproline (ΔPxP). Les différentes constructions choisies permettront non seulement d'identifier des partenaires potentiels d'ELMO mais de localiser

l'interaction sur ELMO et d'avoir une idée de sa spécificité. Les différentes étapes des clonages nécessaires sont décrites dans la section biologie moléculaire de la partie Matériels et Méthodes.

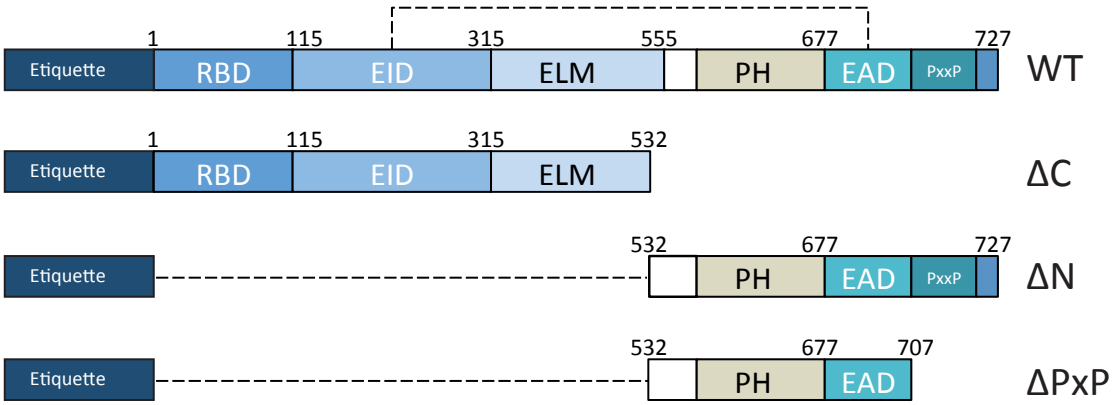


Figure 44. Schéma des constructions d'ELMO
Différentes constructions d'ELMO (WT) ou de ses mutants de délétions (ΔC, ΔN et ΔPxP) avec la fusion N-terminale qui correspond à la double étiquette «TAP». Les domaines ainsi générés sous forme de fusions TAP-tag présentent (WT et ΔN) ou non (ΔPxP ou ΔC) le motif polyproline C-terminal. Les constructions d'ELMO ΔN et ΔPxP sont limitées au domaine C-terminal d'ELMO, et doivent permettre d'identifier les partenaires spécifiques de ce large domaine.

L'étiquette double fusionnée aux différents domaines d'ELMO (Figure 44) code pour la protéine SNAP et le domaine CBP (calmodulin binding protein) séparés par un site de coupure à la protéase TEV (Tabacco Etch Virus). Dans le reste de ce document, l'étiquette en tandem SNAP-TEV-CBP sera notée TAP. Le choix des tags ainsi que leurs caractéristiques sont développés dans la section «choix des tags» dans la partie «Matériels et Méthodes».

4. Mise au point de la méthode

Nous avons choisi le modèle des cellules HEK293T. Il s'agit d'une lignée facilement transfectable et capable de phagocyter. Le choix de cette lignée pourra permettre l'identification de partenaires d'ELMO impliqués dans la phagocytose. La mise au point de la méthode utilisant notre étiquette TAP modifiée a nécessité des tests qui sont décrits dans la partie «Matériels et Méthodes». Après un premier essai réalisé à petite échelle avec les purifications en série qui n'a pas été concluant, probablement parce que les quantités de protéines produites n'étaient pas suffisantes, nous avons optimisé les purifications séparément pour chacune des deux étiquettes (SNAP puis CBP) afin de trouver les meilleures conditions optimales de purification pour chacune des étapes. Les conditions établies

doivent à terme permettre de purifier les complexes à plus grande échelle afin d'obtenir une quantité suffisante pour l'éventuel séquençage des composants du complexe isolé.

a) Purification grâce au tag SNAP

Afin de tester la première étape de purification grâce à l'étiquette SNAP, les cellules HEK293T sont transfectées transitoirement par le vecteur pTAP-SNAP-ELMO. Après la lyse, la protéine SNAP-TEV-CBP-ELMO (TAP-ELMO) solubilisée dans le lysat cellulaire est immobilisée sur les billes magnétiques (SNAP capture magnetic beads) puis éluée par clivage à la protéase TEV. La figure suivante montre le western blot spécifique d'ELMO des élutions obtenues (Voir le protocole détaillé dans Matériels et Méthodes).

Le blot obtenu (Figure 45) montre une bande correspondant à la protéine TAP-ELMO exprimée dans le lysat total. Après immobilisation sur les billes magnétiques, la digestion à la TEV solubilise un fragment immunoréactif à la masse apparente attendue pour la fusion CBP-ELMO sans le tag SNAP (identique au fragment obtenu après digestion contrôle du surnageant de lyse). Ces données montrent que la purification grâce au tag SNAP fonctionne.

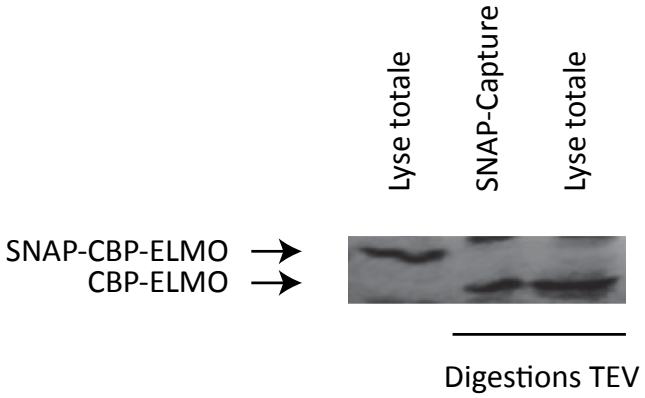


Figure 45. Purification contrôle de la fusion SNAP
Immunotransfert de l'élution de la fusion TAP-ELMO (SNAP-TEV-CBP-ELMO) fixée sur les billes magnétiques SNAP-Capture ou depuis la lyse totale. Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide 12% et révélées en utilisant anti-ELMO et un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la péroxydase et révélées par chimioluminescence.

b) Purification sur résine de calmoduline

Comme mentionné auparavant, les constructions TAP-tag que nous avons utilisées possèdent une seconde étiquette constituée d'un domaine CBP qui interagit avec la calmoduline en présence de calcium. Nous avons donc voulu optimiser la purification de la protéine ELMO en fusion avec l'étiquette TAP exprimée après transfection transitoire des cellules HEK293T en utilisant cette seconde étiquette CBP.

(1) Tests initiaux à partir des extraits cellulaires après transfection

Pour cet essai, la protéine TAP-ELMO obtenue après la lyse des cellules HEK293T est purifiée sur la résine de calmoduline (Phosphodiesterase activator-agarose, Sigma) en appliquant le protocole détaillé dans la section Matériels et Méthodes.

Après rinçage, les protéines retenues sont éluées en présence de 4mM EGTA, puis les fractions sont analysées par western blot. Cependant aucune protéine n'a été détectée par l'anticorps anti-ELMO après passage sur la colonne de calmoduline (données non montrées), et cela même en augmentant les quantités de cellules transfectées ou en faisant varier la concentration d'EGTA à l'élution. Cela suggère que la quantité de cellules utilisées reste insuffisante, ou bien que le domaine CBP de notre étiquette est incapable de se lier à la résine de calmoduline dans ces conditions epérimentales.

(2) Purification de la protéine contrôle GST-CBP-TEV-Protéine A

Afin d'optimiser ces conditions et nous affranchir des problèmes éventuellement liés aux quantités de protéines des extraits, nous avons décidé de cloner dans un vecteur d'expression bactérien une protéine de fusion qui possède une étiquette CBP clivable à la TEV, dans une position similaire à celle du TAP-tag. En produisant ce vecteur, nous avons voulu reproduire au mieux le vecteur pTAP-SNAP-ELMO en nous servant des constructions présentes au laboratoire. Les informations en relation avec ce clonage sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le vecteur réalisé code pour la protéine GST-CBP-TEV-Protéine A permettant donc sa purification initiale sur glutathion, ainsi qu'un site de clivage pour la TEV. L'expression en système procaryote permet de produire une quantité suffisante de la protéine pour mettre au point l'interaction du domaine CBP avec la résine de calmoduline et de s'affranchir des limitations dues à l'expression en cellule eucaryote.

La protéine GST-CBP-TEV-Protéine A est exprimée puis purifiée après clivage par la TEV sous la forme de fusion GST-CBP comme décrit dans le Matériels et Méthodes.

L'un des problèmes qui peuvent être rencontrés lors de la purification sur colonne de calmoduline d'un lysat cellulaire est que la calmoduline endogène peut se lier au domaine CBP de la protéine d'intérêt ce qui empêche ou limite sa fixation sur la résine. Afin d'éviter ce problème et d'optimiser la purification, nous avons voulu comparer l'efficacité de la purification si les protéines sont dialysées contre de 2mM EDTA dans l'étape qui précède la

purification, comme cela est recommandé dans la littérature, ou au contraire contre du calcium.

Dans la figure suivante (Figure 46) montrant les purifications obtenues dans les deux conditions, on voit que la protéine contrôle GST-CBP se fixe dans les conditions utilisées à la résine de calmoduline et peut être éluée en présence d'EGTA. Le fait d'ajouter de l'EDTA avant la purification n'empêche pas la fixation de la protéine d'intérêt sur la résine mais au contraire semble la favoriser.

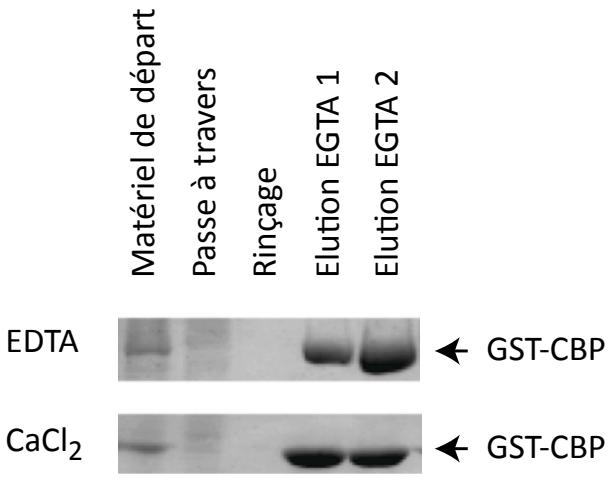


Figure 46. Purification contrôle de GST-CBP
Séparation par électrophorèse des protéines contrôles GST-CBP purifiées par affinité pour l'étiquette CBP, et éluées de la colonne de calmoduline après dialyse en présence d'EDTA (haut) ou de $CaCl_2$ (bas). Les protéines séparées sont ensuite transférées en utilisant l'anticorps anti-GST couplé à la péroxydase et révélées par chimioluminescence.

c) Purification de la protéine SNAP-CBP-ELMO sur Calmoduline

Nous avons mis a profit ces résultats pour purifier la protéine TAP-ELMO depuis un extrait cellulaire de HEK293T, transfectées, dialysé dans le tampon de liaison contenant 2 mM EDTA, sur la résine de calmoduline. Dans ces conditions la protéine TAP-ELMO est bien détectée après élution (Figure 47).

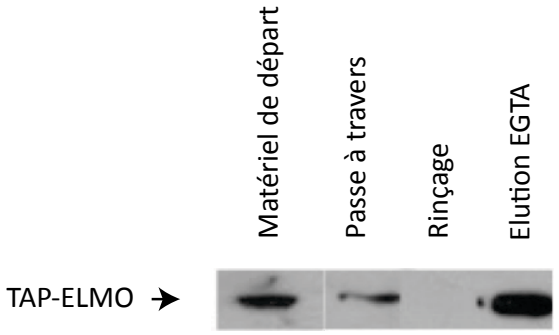


Figure 47. Purification témoin de la protéine TAP-ELMO
Detection par western-blot de la fusion TAP-ELMO (SNAP-CBP-ELMO) purifiée sur colonne de calmoduline à partir d'un lysat cellulaire de HEK293T. Les protéines sont séparées sur gel puis révélées à l'aide de l'anticorps anti-SNAP. La protéine de fusion est spécifiquement éluée par l'EGTA.

(1) Optimisation de la purification

Les 2 étapes de purification ayant été mises au point individuellement, l'étape suivante a été de purifier la protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire transfecté par le plasmide codant pour SNAP-CBP-ELMO ou ses mutants en réalisant les 2 étapes en tandem.

On s'est apercu que l'efficacité de transfection transitoire et/ou de production des HEK293T n'étaient pas suffisantes pour avoir une quantité de protéine éluée détectable sur gel d'acrylamide même après immunorévélation. Nous avons donc choisi de générer des lignées stables exprimant les différents domaines d'ELMO. L'utilisation de ces lignées permet de plus d'avoir une population homogène qui exprime à un niveau raisonnable notre protéine d'intérêt, et favorise ainsi la formation de complexes dans des conditions physiologiques. A contrario, la stabilisation des lignées peut être très délicate si l'expression d'une protéine particulière présente une toxicité, par exemple liée aux quantités exprimées, ou aux fonctions et interactions de celle-ci avec les composants cellulaires. L'établissement de lignées stables permet d'une façon plus souple d'avoir suffisamment de cellules pour la purification de complexes, puisqu'on ne dépend plus d'une transfection transitoire qui est forcément applicable à une quantité limitée de cellules. Le suivi du taux de transfection et d'expression est facilité par les propriétés fluorescentes de la protéine SNAP (voir Matériels et Méthodes) qui permet leur suivi par microscopie ou en cytométrie de flux.

Malgré l'expression transitoire comparable des différentes constructions présentées, la seule lignée que j'ai réussi à stabiliser est celle qui exprime le domaine C-terminal sans le domaine polyproline TAP-ΔPxP (voir construction ΔPxP, Figure 44).

Pour suivre la purification du domaine C-terminal d'ELMO ΔPxP nous avons choisi de suivre spécifiquement le domaine SH3 de DOCK180 ajouté extemporanément, et dont on connaît la capacité à lier cette construction courte d'ELMO (voir résultats Figure 27). On utilise à ces fins les extraits de nos cellules HEK293T exprimant de manière stable la fusion TAP-ΔPxP ou un extrait de HEK293T naïves incubés avec la protéine GST-SH3(DOCK180), à 0,1mg/mL final pendant une heure à 4°C. On procède ensuite dans les 2 cas à la purification du complexe formé par l'interaction du domaine d'ELMO ΔPxP avec la GST-SH3 de DOCK180 en appliquant la stratégie du TAP-tag. La fusion TAP-ΔPxP est d'abord purifiée à partir des extraits pré-incubés avec la construction GST-SH3(DOCK180) sur les billes magnétiques grâce au tag SNAP, puis éluée par digestion à la TEV. Le complexe solubilisé est ensuite dialysé

contre un tampon contenant l'EDTA puis purifé sur la résine de calmoduline. L'élution de la résine de calmoduline est analysée sur gel d'électrophorèse et blot (anti-GST). Les résultats sont présentés dans la figure suivante (Figure 48).

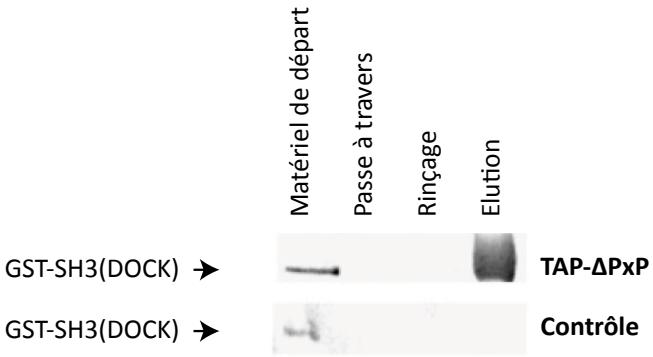


Figure 48. Purification TAP du domaine SH3 de DOCK180
Blot de la purification de GST-SH3 de DOCK180 à partir du complexe protéique issue d'un lysat de HEK293T naïves (contrôle) ou exprimant TAP-ΔPxP. La protéine GST-SH3 purifiée est ajouté extemporanément aux lysats avant la purification du complexe. La présence de la fusion GST-SH3 de DOCK180 a été révelée par chimioluminescence en utilisant un anticorps anti-GST après immunotransfert. La protéine de fusion GST-SH3 de DOCK180 n'est spécifiquement éluée que lorsque la protéine TAP-ΔPxP est transfectée dans les cellules HEK293T (efficacité de la transfection vérifiée par western-blot non figurée).

Les élutions montrent que la protéine GST-SH3 de DOCK 180 est bien co-purifiée dans un complexe spécifique de la présence du domaine ΔPxP d'ELMO et n'interagit pas d'une manière artéfactuelle avec les différentes résines utilisées dans la procédure TAP-tag. Cette expérience est un contrôle positif qui montre l'efficacité de la stratégie du TAP-tag et permet dans ce cas de purifier d'une façon spécifique un partenaire connu dont les quantités étaient ici non limitantes, puisqu'ajouté extemporanément à partir d'une protéine purifiée par ailleurs (surexpression bactérienne).

5. Purification des protéines à grande échelle

Nous avons voulu appliquer nos protocoles en combinant ces étapes de purification afin d'identifier des protéines éventuellement impliquées dans un complexe fonctionnel avec ELMO. En utilisant la lignée stable établie pendant mon travail produisant TAP-ΔPxP, et en augmentant le nombre de cellules de l'extrait afin d'obtenir des quantités suffisantes des protéines recherchées (typiquement visualisables au bleu de Coomassie afin de pouvoir les identifier par séquençage protéique), nous pouvions espérer identifier des partenaires spécifiques potentiels du domaine C-terminal d'ELMO ΔPxP.

Dans une première expérience témoin de purification en mode tandem nous avons pu éluer suffisamment de protéines à partir d'environ 10^8 cellules, pour permettre leur visualisation après coloration au bleu de Coomassie sur gel d'acrylamide. Nous avons donc reproduit ce protocole en réalisant l'expérience comparée avec des cellules naïves, ou avec les cellules de la lignée stable exprimant TAP-ΔPxP. Les protéines purifiées à partir des deux extraits, naïf ou essai, après élution spécifique à l'EGTA ou directement par le bleu de dépôt, sont séparées sur gel puis transférées sur membrane de PVDF et enfin colorées au bleu de Coomassie (Figure 49).

Les élutions à l'EGTA montrent des bandes dans le cas du lysat contenant la protéine SNAP-ΔPxP (puits a) alors que dans le cas du lysat des cellules naïves aucune bande n'apparaît (puits b). Ces données suggèrent que les protéines visualisées sont des interactants spécifiques du domaine C-terminal ΔPxP d'ELMO. Cependant on voit que l'élution au bleu (puits c et d) présente des bandes également dans le puits contrôle (cellules naïves) laissant penser que nos éluats pourraient être contaminés par des protéines ayant interagi avec la résine de calmoduline.

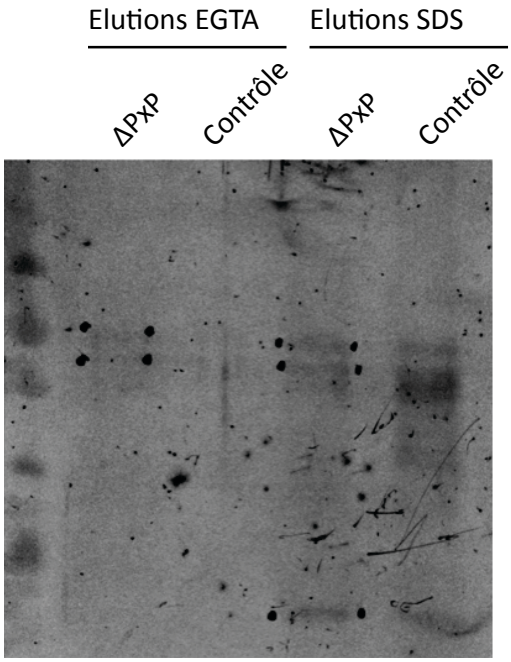


Figure 49. Membrane de la purification TAP des protéines associées à ELMO ΔPxP
Coloration au bleu de Coomassie des élutions EGTA ou SDS (bleu de dépôt) après séparation sur gel et transfert sur membrane de PVDF. Les puits ΔPxP correspondent aux purifications réalisées à partir des extraits des lignées stables exprimant TAP-ΔPxP. Les puits contrôles représentent les élutions à partir des lignées contrôles non transfectées. Les points surlignent les bandes visibles dont les séquençages ont été testés à des fins d'identification.

On a remarqué pendant nos travaux qu'ELMO et ses différents domaines ont tendance à s'accrocher non spécifiquement aux résines (voir notre mise au point des pull-down). Nous avons donc choisi de faire une élution SDS (au bleu de dépôt d'électrophorèse) après l'élution spécifique à l'EGTA pour s'assurer que toute la protéine et ses éventuels partenaires sont bien élués. Si on compare les puits des élutions à l'EGTA puis au bleu de la purification du lysat des cellules exprimant la protéine TAP-ΔPxP, on observe dans les deux cas deux bandes qui possèdent des migrations équivalentes. Mais dans le puits de l'élution au SDS, il y a une troisième bande de faible poids moléculaire qui pourrait correspondre à la fusion CBP-ΔPxP obtenue après clivage de la protéine TAP-ΔPxP. Il faut noter cependant que parmi ces bandes élués au SDS, certaines semblent également présentes dans le puits contrôle issu de cellules naïves.

Les bandes colorées par le bleu de Coomassie après transfert sur membrane de PVDF ont été néanmoins utilisées pour tenter de les identifier par séquençage N-terminal (Dégradation d'Edman, plateforme de séquençage N-terminal, JP Andrieu, IBS). Malheureusement, cette méthode de séquençage n'a donné aucun résultat car les extrémités N-terminales des protéines visualisées sont bloquées pour la dégradation d'Edman.

Malgré cet échec, le résultat obtenu est encourageant car il permet de montrer que la stratégie TAP-tag utilisée associée aux transfections stables pourrait en effet permettre d'identifier des partenaires spécifiques d'ELMO mais il faudra adapter les quantités de protéines purifiées et probablement se tourner vers une autre technique d'identification (séquençage *de novo* par spectrométrie de masse par exemple) pour augmenter nos chances de succès. Il serait également important d'optimiser encore la technique pour éviter les interactions non spécifiques même si celles-ci ne semblent pas contaminer l'échantillon correspondant à l'élution spécifique par l'EGTA.

Dans le cas d'applications du TAP-tag dans des cellules mammifères par d'autres groupes, la moyenne du nombre de cellules utilisées pour la purification de complexes est de $5x10^8$ cellules (C. Y. Chen et al. 2001; T. Miller et al. 2001). Le choix des tags ainsi que l'optimisation des purifications jouent un rôle important dans l'augmentation de la rentabilité et la quantité de complexes purifiées. Le fait de voir des bandes avec seulement 10^8 cellules montre l'efficacité de l'optimisation des purifications qu'on a réalisées, et permet de rester optimiste sur nos chances de succès dans un futur proche en augmentant le nombre de cellules utilisées pour nos extraits.

IV. DISCUSSION GENERALE

A. Rôle de la kinase Hck pour l'activation de DOCK180

Dans le cours de mon travail, j'ai pu montrer à la fois par des approches biochimiques, structurales et cellulaires que le domaine SH3 de la kinase Hck était un ligand du motif polyproline C-terminal d'ELMO. Nous avons également mis en évidence une interaction atypique entre la kinase (son domaine SH3 régulateur) et la partie N-terminale d'ELMO qui ne présente aucune séquence polyproline canonique. Cette interaction atypique, si elle était confirmée *in vivo*, pourrait être liée à un rôle pour Hck dans la régulation du complexe ELMO /DOCK180, plus sophistiqué que les données de la littérature ne le suggère.

1. Hck active ELMO ?

Les données de la littérature exposées dans l'introduction de ce travail indiquent qu'ELMO est présente sous une forme auto-inhibée par l'interaction de ses domaines EID et EAD, par analogie avec les domaines DID et DAD des formines qui permettent de réguler l'activation de la protéine Diaphanous. Pour ELMO, la levée d'inhibition pourrait avoir lieu suite à l'interaction avec des partenaires comme la petite GTPase RhoG par exemple ou avec les protéines de la famille ERM qui sont des ligands connus du domaine N-terminal d'ELMO. Puisque le domaine SH3 de Hck est un ligand de la région N-terminale d'ELMO, on s'est intéressé à l'hypothèse selon laquelle Hck pourrait jouer un rôle dans la régulation d'ELMO par un mécanisme comme celui suggéré pour RhoG dans la levée d'autoinhibition de la protéine.

Nous avons donc cherché à vérifier l'interaction entre les domaines N- et C-terminaux d'ELMO contenant les motifs EID (mutant de délétion ΔC) et EAD (mutant ΔN), et si le domaine SH3 de Hck pouvait former un complexe ternaire avec ces deux domaines ou au contraire inhiber leur interaction. Pour mener à bien cette approche, nous avons entamé une analyse par spectrométrie de masse native qui permet la détection fine de complexes de grands poids moléculaires.

Pour ces expériences réalisées en collaboration avec E. Boeri-Erba du laboratoire de spectrométrie de masse de l'institut, Il a fallu purifier les différentes protéines sous formes solubles dans des tampons contenant le minimum de sels afin d'éviter de masquer le signal en spectrométrie de masse. Nous avons donc testé des séries de tampons Tris NaCl pH=8 à

différentes concentrations. Dans chaque cas, les échantillons obtenus sont d'abord vérifiés par Electrospray avant de les utiliser en spectrométrie de masse native.

Nous n'avons pas réussi à avoir un spectre net que dans le cas du domaine C-terminal d'ELMO alors que le spectre du domaine N-terminal était bruité, probablement par la présence d'ions liés à la protéine. Ces résultats nous ont empêchés de continuer dans la stratégie décrite ci-dessus mais une information intéressante est apparue, le domaine C-terminal est capable de former un dimère. On observe en effet dans le spectre un pic correspondant au monomère et un autre au dimère (données non figurées). La formation de dimères du domaine C-terminal avait déjà été observée au laboratoire au cours d'expériences de SAXS réalisées par Marion Sévajol, et nos nouvelles données semblent donc confirmer cette possibilité, en tout cas *in vitro*.

Notre observation pourrait être mise en parallèle avec les observations de J.-F. Côté qui a montré que DOCK180 dimérise avec DOCK5 *in cellulo*, sans que la pertinence fonctionnelle de ce complexe n'ait été encore explicitée (Patel, Pelletier, et Côté 2011). Les auteurs suggèrent que les protéines DOCK (5 et 180) oligomérisent entre elles pour former des complexes avec la protéine ELMO. Cette accumulation de complexes peut entrainer une agrégation de la protéine ELMO et une activation localisée de la GTPase Rac. On peut imaginer que la dimérisation que nous observons des protéines ELMO par l'intermédiaire du domaine C-terminal participe à l'agrégation d'ELMO suggérée par Patel et collaborateurs, et constitue un mécanisme de régulation supplémentaire dans l'interaction avec DOCK180 (ou DOCK5) et son activation.

Nous avons observé au cours de mon travail une interaction originale entre le domaine N-terminal d'ELMO (1-532) et le domaine SH3 de Hck. La région précise impliquée dans cette interaction n'est pas encore connue. La région N-terminale d'ELMO comprend notablement le domaine EID (116-315) supposé jouer un rôle dans l'auto-inhibition d'ELMO, mais aussi un domaine ELMO (ou ELM, 316-555) adjacent et de fonction inconnue, mais très conservé dans la phylogénie. Il a donc été suggéré que les ligands de cette région d'ELMO pouvaient avoir un rôle très particulier dans l'activation ou dans une fonction de la protéine. Dans cette optique, Il serait intéressant de vérifier si Hck peut être un ligand de ce domaine particulier.

Dans la suite à donner à mon travail, il semble donc important d'identifier les résidus (ou la région) du domaine N-terminal d'ELMO responsables de l'interaction avec le domaine SH3 de Hck. Ces données nous aideront à mieux comprendre le rôle de l'interaction du SH3 de

Hck, mais aussi l'implication éventuelle de la phosphorylation d'ELMO sur l'interaction de la kinase avec ELMO. Deux tyrosines importantes sont en effet des cibles de Hck et sont présentes dans les domaines EID (Tyr 216) et ELM (Tyr 511). Les mutations conjointes de ces sites par des phénylalanines non phosphorylables diminuent drastiquement l'efficacité de phagocytose de cellules co-transfectées par le mutant d'ELMO et la protéine DOCK180 (Yokoyama et al. 2005). On peut émettre l'hypothèse selon laquelle la liaison de Hck à ELMO pourrait favoriser l'activité kinase et par conséquent phosphoryler ELMO sur ces tyrosines, et ainsi participer à l'activation d'ELMO par un mécanisme complémentaire à la levée d'autoinhibition par les domaines EID/EAD.

2. Complexe ternaire ELMO/DOCK180/Hck

Hck est un partenaire d'ELMO. Nos résultats confirment les données de la littérature, et montrent formellement pour la première fois que le domaine C-terminal d'ELMO interagit avec le domaine SH3 de Hck de manière dépendante du motif polyproline. DOCK180 est également un partenaire du domaine C-terminal d'ELMO, mais malgré la présence d'un domaine SH3 dans la région (1-177) de DOCK180 qui interagit avec ELMO, cette interaction ne dépend pas de la présence du polyproline. Pourtant au laboratoire, M. Sévajol a pu montrer que le domaine SH3 de DOCK180 est bien un ligand du mutant de délétion ΔPxP du domaine C-terminal d'ELMO. Cette différence dans le comportement des deux domaines SH3 de DOCK180 et Hck soulève la possibilité que les trois protéines puissent interagir au sein d'un complexe ternaire.

Par SPR, on a pu en effet détecter un complexe ternaire entre le C-terminal d'ELMO (ΔN), le domaine N-terminal (1-177) de DOCK180 comprenant le domaine SH3 et les hélices adjacentes, et le domaine SH3 de Hck. Cette interaction a été également confirmée par les essais de pull-down développés dans le cours de ce travail et qui montrent que la pré-incubation du domaine C-terminal d'ELMO avec le domaine SH3 de Hck augmente sa rétention sur une colonne pré-chargée avec le domaine SH3 de DOCK180.

Les travaux antérieurs du laboratoire publiés par Marion Sévajol (Sévajol et al. 2012) suggèrent que l'interaction entre ELMO et DOCK180 se fait en deux temps. Un premier contact entre les deux partenaires se produirait par l'interaction entre le domaine 1-177 de DOCK180 comprenant le domaine SH3 et le domaine hélical adjacent, et un domaine

structural d'ELMO composé par les deux hélices encadrant le domaine PH. Dans un second temps, l'interaction serait complétée par la fixation de la séquence polyproline d'ELMO sur le SH3 de DOCK180. Cette interaction entre le domaine polyproline et le domaine SH3 de DOCK180 stabilise le complexe et augmente sa demi-vie.

En prenant en compte l'ensemble de ces données, on peut suggérer un modèle dans lequel l'interaction d'ELMO avec DOCK180 augmente sensiblement l'affinité du complexe pour Hck, permettant son recrutement efficace via l'interaction du domaine SH3 de Hck avec le motif polyproline C-terminal d'ELMO. Cette interaction permet à la fois la stabilisation du complexe ELMO/DOCK180 et l'activation de Hck par désengagement de son domaine SH3, ce qui abouti à la phosphorylation d'ELMO. Nous avons décrit plus haut le rôle de certaines de ces phosphorylations sur la phagocytose, probablement en participant à l'activation d'ELMO, soit en augmentant l'affinité pour un ou plusieurs trans-activateurs qu'il reste à découvrir, soit en participant à le levée d'auto-inhibition. Parmi les sites de phosphorylation d'ELMO par Hck, nous avons étudié pendant ma thèse le cas de la tyrosine 720. Cette tyrosine est en effet située dans l'extension C-terminale de la protéine qui comprend le motif polyproline. Nos mesures des déplacements chimiques par RMN ont montré que la phosphorylation de cette tyrosine Y720 défavorise l'interaction entre le domaine polyproline et le SH3 de Hck. Ce résultat peut être mis en parallèle avec celui obtenu dans les travaux de Yokoyama et ses collaborateurs (Yokoyama et al. 2005). Dans leurs travaux, des mutants de phosphorylation de la protéine ELMO en fusion avec l'étiquette M45 sont exprimés en présence de Hck par transfection transitoire des cellules COS-7, la protéine ELMO est ensuite immunoprécipitée par l'anticorps M45 et révélée par un anti-phosphotyrosine ou par l'anti-M45 (Figure 50).

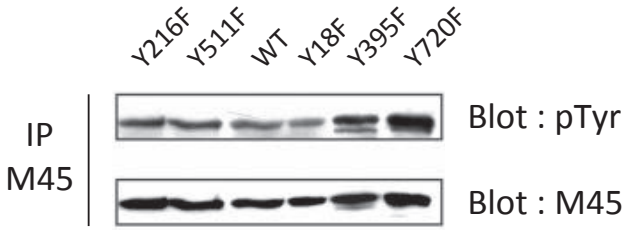


Figure 50. Phosphorylation d'ELMO
Reproduction de la figure originale de l'article de Yokoyama et collaborateurs (Yokoyama et al. 2005). Des mutants de phosphorylation de la protéine ELMO en fusion avec l'étiquette M45 sont exprimés en présence de Hck par transfection transitoire des cellules COS-7, la protéine ELMO est ensuite immunoprécipitée par l'anticorps M45 et révélée par un anti-phosphotyrosine ou par l'anti-M45. Ces données montrent l'augmentation relative de la phosphorylation d'ELMO en présence de Hck après mutation de la tyrosine 720 en phénylalanine non phosphorylable.

Ces données indiquent que les mutations des différents sites de phosphorylation en phénylalanine n'affecte pas la phosphorylation relative de la protéine ELMO par rapport à la forme sauvage (WT) sauf dans le cas du mutant tyrosine Y720F (et dans une moindre mesure la tyrosine 395) pour lequel on observe une augmentation de la phosphorylation de la protéine ELMO (Yokoyama et al. 2005). Ces observations nous ont amenés à formuler l'hypothèse selon laquelle l'interaction physiologique d'ELMO avec Hck pouvait activer la kinase, et que son activation pourrait ainsi être contrôlée dans une boucle d'auto-régulation par l'intermédiaire de la phosphorylation par Hck de la tyrosine 720.

Ce modèle nécessite d'être confirmé par des expériences visant à caractériser *in vitro* les constantes d'affinité des éléments du complexe. On pense en particulier à la poursuite des approches par SPR. La formation du complexe ternaire pourra également être analysée d'un point de vue structural en tentant de co-cristalliser le domaine C-terminal d'ELMO en complexe avec la région 1-177 de DOCK180 et avec la kinase Hck exprimée sous forme sauvage inactive. A défaut, nous pourrions utiliser le domaine SH3 de Hck dans ces expériences.

Ces données biochimiques et structurales devront être également complétées par une approche cellulaire afin de pouvoir étudier la formation du complexe dans le contexte physiologique. Un des objectifs pourra être, en co-transfectant le domaine C-terminal d'ELMO avec la kinase Hck, de vérifier l'état de phosphorylation de la tyrosine 720 en fonction de l'expression du domaine N-terminal de DOCK180 dans les cellules. Pour faciliter cette expérience, nous pourrons générer des lignées stables exprimant le domaine N-terminal de DOCK180.

Les mêmes expériences pourraient être réalisées en utilisant les protéines complètes ELMO et DOCK180 afin d'observer l'effet de l'interaction de Hck et de la phosphorylation d'ELMO sur la formation du complexe ternaire éventuel et sur la phagocytose. Pour réaliser ces expériences, il faudrait néanmoins pouvoir muter spécifiquement les sites dans le domaine N-terminal d'ELMO impliqués dans l'interaction avec la kinase Hck afin d'abroger cette interaction et étudier son effet spécifique via le motif polyproline C-terminal. Ceci ne sera possible que lorsque nous aurons pu définir plus précisément la région d'interaction des deux partenaires. Dans le même esprit, des mutants non phosphorylables d'ELMO sur des

tyrosines choisies permettraient d'identifier les fonctions associées à la phosphorylation de ces tyrosines spécifiques.

B. ELMO, DOCK180 et Hck pour une meilleure phagocytose ?

Les différents complexes identifiés n'auront aucune pertinence si leur rôle à un niveau physiologique n'est pas éclairci. Notre étude des interactions entre les différents domaines d'ELMO et le SH3 de Hck après transfection des cellules HEK293T confirme dans une certaine mesure les résultats obtenus par les approches biochimique et montre que l'interaction entre ELMO et le SH3 de Hck est dépendante du polyproline. Ces données obtenues par mesure de FRET suggèrent que les partenaires peuvent interagir dans le contexte physiologique des cellules transfectées, mais ne permettent pas de conclure sur les fonctions associées à ces domaines et à leurs interactions. La mesure du signal de FRET par cytométrie permet de réaliser une analyse sur une population entière, mais reste cependant très délicate. Il est important de noter que les protéines avec lesquelles on a réalisé l'étude sont essentiellement des domaines et pas les protéines complètes. Leurs fonctions ou leurs interactions peuvent être grandement altérées par défaut de localisation ou d'orientation ce qui peut modifier leur comportement physiologique.

L'utilisation de domaines rend également délicat l'étude *in cellulo* du rôle des interactions sur un phénomène comme la phagocytose. La surexpression dans la cellule d'un domaine capable de saturer une interaction importante pour une voie de signalisation donnée peut cependant générer un effet dominant négatif, ou au contraire, en saturant un inhibiteur de la voie, aboutir à sa sur-activation.

Nous avons commencé à mener une étude qui vise à comprendre le rôle des interactions des domaines d'ELMO et Hck sur la phagocytose. Les tests de phagocytose réalisés montrent que le SH3 de Hck favorise l'internalisation des billes de latex par les cellules HEK293T, mais une fois en complexe avec ELMO, cet effet ne persiste plus. Il est difficile d'interpréter les résultats obtenus et de comprendre à quel niveau le SH3 de Hck intervient et pourquoi son interaction avec ELMO défavorise la phagocytose. Il est cependant probable qu'il s'agisse d'un effet dominant de la surexpression du SH3. Il serait intéressant de voir si la phosphorylation de la tyrosine Y720 qui défavorise l'interaction entre le SH3 de Hck et le C-terminal d'ELMO peut également favoriser la phagocytose conformément aux résultats

obtenus précédemment. L'utilisation d'un mutant non-phosphorylable Y720F pourrait également permettre de vérifier ce phénomène et étayer notre hypothèse sur le rôle physiologique de cette phosphorylation dans une boucle de régulation négative de la kinase.

A plus long terme il faudra, comme nous l'avons mentionné plus haut, passer à l'échelle de la protéine complète. Dans un premier temps, on surexprime dans les cellules HEK293T différents domaines d'ELMO en présence ou en absence de DOCK180 et de Hck et la capacité des cellules à phagocyter sera examinée. Ces expériences peuvent être réalisées en parallèle avec des mutants ponctuels d'ELMO sur les sites de phosphorylation choisis afin de mieux définir le rôle de chacun d'entre eux.

L'ensemble de ces données permettra de savoir lequel des domaines N- ou C-terminaux est impliqué dans la phagocytose. De plus, la combinaison de l'effet des différents complexes sur la phagocytose avec les données biochimiques obtenues par SPR sur les affinités et la demi-vie des complexes permettra d'établir l'ordre chronologique dans lequel ces protéines interagissent pour accomplir leur fonction.

La littérature montre que le complexe ELMO/DOCK180 est un complexe clé dans la régulation de la dynamique de l'actine et dans la phagocytose. D'autre part, Hck possède une activité kinase en aval de certains récepteurs impliqués dans la phagocytose qui complète son rôle dans la migration et la formation des podosomes dont on connaît la proximité fonctionnelle directe avec la formation de coupes phagocytaires. La suite de ce travail pourrait permettre de mieux identifier les liens entre les récepteurs impliqués dans la phagocytose, le complexe ELMO/DOCK180 et Hck, et permette de mieux caractériser cette voie de signalisation contrôlant la migration et la formation de coupes phagocytaires chez les phagocytes.

C. Autres partenaires d'ELMO

En parallèle avec les études menées pour comprendre le mode d'interaction entre ELMO et la kinase Hck, nous avons développé une stratégie de TAP-tag qui vise à identifier de nouveaux partenaires d'ELMO qui peuvent être impliqués dans la phagocytose. L'identification de nouveaux partenaires permettrait de mieux situer ELMO dans le contexte physiologique, et à terme de mieux comprendre ses rôles sur la voie regroupant ELMO, DOCK180 et Hck.

Cette stratégie a été mise au point au laboratoire dans le cours de mon travail. Le premier essai que nous avons pu tenter d'exploiter pour l'identification de nouveaux partenaires n'était pas exploitable à cause des faibles quantités obtenues qui ne permettent pas d'identifier très clairement les bandes présentes sur le gel d'électrophorèse, mais également d'une limitation dans la méthode de séquençage (*Cf.* Figure 49). La prochaine étape consiste donc à purifier des complexes protéiques à partir d'une quantité supérieure à celle utilisée dans cet essai infructueux. On cherchera à mettre à profit la collaboration établie avec E. Boeri-Erba, responsable de la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBS, pour l'utilisation de la spectrométrie de masse native. Cette collaboration vise à identifier les partenaires à partir des complexes purifiés par TAP-tag. Cette technique de spectrométrie native qui ne nécessite que de faibles quantités d'échantillons (5 à 10 µM dans quelques µL), permet de préserver dans la phase gazeuse les liaisons non covalentes et tolère l'hétérogénéité dans la composition des sous-unités du complexe.

A défaut de pouvoir identifier de nouveaux partenaires, le TAP-tag modifié que nous avons pu développer permet d'envisager l'étude des conséquences physiologiques de l'interaction avec une protéine cible marquée (TAP-SNAP-ELMO) avec des partenaires connus mais qu'il reste à caractériser *in cellulo*. On pense tout particulièrement à la kinase Hck bien sur dont l'interaction avec ELMO (ou ses domaines exprimés) font l'objet de ce travail, mais également à l'application de cette technique à l'interaction d'ELMO avec des protéines issues d'organismes pathogènes dont la littérature mentionne qu'ils peuvent agir en détournant les voies de signalisation de la phagocytose.

Parmi ces protéines, on pense plus particulièrement au facteur de virulence Nef du virus du SIDA. Ce projet est mené en collaboration avec Jean-Baptiste Reiser dans notre groupe. Il s'agit surtout d'investiguer la relation de ces trois protéines, ELMO/DOCK180 et Hck avec le virus HIV-1. Il apparait d'après la littérature que Nef puisse être impliquée dans le recrutement du complexe ELMO/DOCK180 et l'activation de Rac (Janardhan et al. 2004). Les expériences de SPR réalisés par Jean-Baptiste Reiser montrent une faible affinité entre Nef et le SH3 de DOCK180 qui semble donc confirmer biochimiquement les observations de ces auteurs qui identifient ELMO et DOCK (DOCK2) par spectrométrie de masse dans un large complexe formé par le facteur de virulence du virus. La présence obligatoire d'ELMO pour l'action de Nef laisse penser à un complexe ternaire entre ELMO, DOCK180 et Nef.

On peut noter d'autre part, que Hck interagit via son domaine SH3 avec la protéine Vif, une protéine qui facilite la réplication du virus HIV-1 dans les macrophages. Hck contrôle négativement la réplication du virus mais cette inhibition est supprimée par l'expression de Vif (Hassaine et al. 2001). Le virus HIV-1 est ainsi capable de détourner les fonctions de migration cellulaire et de phagocytose pour promouvoir sa pathogénicité. Il serait intéressant d'examiner la relation potentielle entre Hck, DOCK180, ELMO et les protéines virales Nef et Vif pour comprendre dans un modèle cellulaire simplifié comme celui généré par notre TAP-tag, comment ces protéines interagissent ensemble. Un dispositif expérimental de ce type permettrait d'évaluer comment ces protéines peuvent participer à un détournement possible des fonctions cellulaires par le virus du SIDA.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, Joseph A. 2001. “Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases.” *Chemical Reviews* 101 (8) (August): 2271–2290. doi:10.1021/cr000230w.

Aderem, A, et D M Underhill. 1999. “Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages..” *Annu Rev Immunol* 17 (1): 593–623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593.

Anon, Ester, Xavier Serra-Picamal, Pascal Hersen, Nils C Gauthier, Michael P Sheetz, Xavier Trepat, et Benoît Ladoux. 2012. “Cell Crawling Mediates Collective Cell Migration to Close Undamaged Epithelial Gaps..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27) (July 3): 10891–10896. doi:10.1073/pnas.1117814109.

Arold, S, R O'Brien, P Franken, M P Strub, F Hoh, C Dumas, et J E Ladbury. 1998. “RT Loop Flexibility Enhances the Specificity of Src Family SH3 Domains for HIV-1 Nef..” *Biochemistry* 37 (42) (October 20): 14683–14691. doi:10.1021/bi980989q.

Arur, Swathi, Uche E Uche, Karim Rezaul, Michael Fong, Victoria Scranton, Ann E Cowan, William Mohler, et David K Han. 2003. “Annexin I Is an Endogenous Ligand That Mediates Apoptotic Cell Engulfment..” *Developmental Cell* 4 (4) (April): 587–598.

Astarie-Dequeker, C, et E N N'Diaye. 1999. “The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages.” *Infection and Immunity,* 67(2), 469–477

Azam, M, M A Seeliger, N S Gray, et J Kuriyan. 2008. “Activation of Tyrosine Kinases by Mutation of the Gatekeeper Threonine.” *Nature Structural & ….* doi:10.1038/nsmb.1486.

Berton, G, A Mócsai, et C A Lowell. 2005. “Src and Syk Kinases: Key Regulators of Phagocytic Cell Activation.” *Trends in Immunology*.

Boonyaratanakornkit, V, M P Scott, V Ribon, L Sherman, S M Anderson, J L Maller, W T Miller, et D P Edwards. 2001. “Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif That Directly Interacts with SH3 Domains and Activates C-Src Family Tyrosine Kinases..” *Molecular Cell* 8 (2) (August): 269–280.

Bowzard, J Bradford, Dongmei Cheng, Junmin Peng, et Richard A Kahn. 2007. “ELMOD2 Is an Arl2 GTPase-Activating Protein That Also Acts on Arfs..” *J Biochem* 282 (24) (June 15): 17568–17580. doi:10.1074/jbc.M701347200.

Brazier, Helene, Sebastien Stephens, Stephane Ory, Philippe Fort, Nigel Morrison, et Anne Blangy. 2006. “Expression Profile of RhoGTPases and RhoGEFs During RANKL-Stimulated Osteoclastogenesis: Identification of Essential Genes in Osteoclasts.” *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (9) (September): 1387–1398. doi:10.1359/JBMR.060613.

Bretscher, Anthony, Kevin Edwards, et Richard G. Fehon. 2002. “ERM Proteins and Merlin: Integrators at the Cell Cortex.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (8) (August): 586–599. doi:10.1038/nrm882.

Broutin, I, et A Ducruix. 2000. “Domaines Structuraux Et Signalisation..” *Médecine Science*.

Brown, S, I Heinisch, E Ross, K Shaw, C Buckley, et J Savill. 2002. “Apoptosis Disables CD31-Mediated Cell Detachment From Phagocytes Promoting Binding and Engulfment.” *Nature* 418 (6894) (July 11): 200–203.

Brugnera, E, L Haney, Cynthia M Grimsley, M Lu, Scott F Walk, A Tosello-Trampont, I Macara, H Madhani, G Fink, et K Ravichandran. 2002. “Unconventional Rac-GEF Activity Is Mediated Through the Dock180-ELMO Complex.” *Nature Cell Biology* 4 (8) (August 1): 574–582.

Burridge, K, et K Wennerberg. 2004. “Rho and Rac Take Center Stage.” *Cell* 116 (2) (January 23): 167–179.

Carreno, S, E Caron, C Cougoule, LJ Emorine, et I Maridonneau-Parini. 2002. “p59Hck Isoform Induces F-Actin Reorganization to Form Protrusions of the Plasma Membrane in a Cdc42- and Rac-Dependent Manner.” *J Biochem* 277 (23): 21007–21016. doi:10.1074/jbc.M201212200.

Carreno, S, M E Gouze, S Schaak, L J Emorine, et I Maridonneau-Parini. 2000. “Lack of Palmitoylation Redirects P59(Hck) From the Plasma Membrane to P61(Hck)-Positive Lysosomes.” *J Biochem* 275 (46): 36223–36229. doi:10.1074/jbc.M003901200.

Caveggion, Elena, Silvia Continolo, Fiona J Pixley, E Richard Stanley, David D L Bowtell, Clifford A Lowell, et Giorgio Berton. 2003. “Expression and Tyrosine Phosphorylation of Cbl Regulates Macrophage Chemokinetic and Chemotactic Movement..” *J Cell Physiol* 195 (2) (May): 276–289. doi:10.1002/jcp.10236.

Chen, C Y, R Gherzi, S E Ong, E L Chan, R Raijmakers, G J Pruijn, G Stoecklin, C Moroni, M Mann,

et M Karin. 2001. “AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs..” *Cell* 107 (4) (November 16): 451–464.
Chen, Q, H Kimura, et D Schubert. 2002. “A Novel Mechanism for the Regulation of Amyloid Precursor Protein Metabolism.” *The Journal of Cell Biology* 158 (1) (July 8): 79–89.
Chen, Z, J Z Sun, A Pradines, G Favre, J Adnane, et S M Sebti. 2000. “Both Farnesylated and Geranylgeranylated RhoB Inhibit Malignant Transformation and Suppress Human Tumor Growth in Nude Mice.” *J Biochem* 275 (24): 17974–17978.
Chenavas, S. 2005. “Etude Des Interactions Entre Les Facteurs Cytosoliques Du Complexe De La NADPH Oxydase.”
Chong, Yuh-Ping, Terrence D Mulhern, Hong-Jian Zhu, Donald J Fujita, Jeffrey D Bjorge, John-Paul Tantiongco, Nikolaos Sotirellis, Daisy Sio Seng Lio, Glen Scholz, et Heung-Chin Cheng. 2004. “A Novel Non-Catalytic Mechanism Employed by the C-Terminal Src-Homologous Kinase to Inhibit Src-Family Kinase Activity..” *J Biochem* 279 (20) (May 14): 20752–20766. doi:10.1074/jbc.M309865200.
Cohen, P. 2002. “The Origins of Protein Phosphorylation.” *Nature Cell Biology*.
Continolo, Silvia, Anna Baruzzi, Meytham Majeed, Elena Caveggion, Laura Fumagalli, Clifford A Lowell, et Giorgio Berton. 2005. “The Proto-Oncogene Fgr Regulates Cell Migration and This Requires Its Plasma Membrane Localization..” *Experimental Cell Research* 302 (2) (January 15): 253–269. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.005.
Cougoule, C, V Le Cabec, R Poincloux, T Al Saati, J L Mege, G Tabouret, C A Lowell, N Laviolette-Malirat, et I Maridonneau-Parini. 2010. “Three-Dimensional Migration of Macrophages Requires Hck for Podosome Organization and Extracellular Matrix Proteolysis.” *Blood* 115 (7) (February 18): 1444–1452. doi:10.1182/blood-2009-04-218735.
Côté, Jean-François, et Kristiina Vuori. 2002. “Identification of an Evolutionarily Conserved Superfamily of DOCK180-Related Proteins with Guanine Nucleotide Exchange Activity.” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 24) (December 15): 4901–4913.
Côté, Jean-François, et Kristiina Vuori. 2006. “In Vitro Guanine Nucleotide Exchange Activity of DHR-2/DOCKER/CZH2 Domains..” *Methods in Enzymology* 406: 41–57. doi:10.1016/S0076-6879(06)06004-6.
Côté, Jean-François, Andrea B Motoyama, Jason A Bush, et Kristiina Vuori. 2005. “A Novel and Evolutionarily Conserved PtdIns(3,4,5)P3-Binding Domain Is Necessary for DOCK180 Signalling.” *Nature Cell Biology* 7 (8) (August 1): 797–807. doi:10.1038/ncb1280.
D'Souza-Schorey, C, B Boettner, et L Van Aelst. 1998. “Rac Regulates Integrin-Mediated Spreading and Increased Adhesion of T Lymphocytes.” *Molecular and Cellular Biology* 18 (7) (July): 3936–3946.
deBakker, C, L Haney, J Kinchen, Cynthia M Grimsley, M Lu, D Klingele, P Hsu, et al. 2004. “Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG Signaling Module and Armadillo Repeats of CED-12/ELMO.” *Curr Biol* 14 (24) (December 29): 2208–2216.
DeFranco, A L, V W Chan, et C A Lowell. 1998. “Positive and Negative Roles of the Tyrosine Kinase Lyn in B Cell Function..” *Seminars in Immunology* 10 (4) (August): 299–307. doi:10.1006/smim.1998.0122.
Devitt, A, O D Moffatt, C Raykundalia, J D Capra, D L Simmons, et C D Gregory. 1998. “Human CD14 Mediates Recognition and Phagocytosis of Apoptotic Cells.” *Nature* 392 (6675): 505–509.
Downey, G P, R J Botelho, J R Butler, Y Moltyaner, P Chien, A D Schreiber, et S Grinstein. 1999. “Phagosomal Maturation, Acidification, and Inhibition of Bacterial Growth in Nonphagocytic Cells Transfected with FcgammaRIIA Receptors..” *J Biochem* 274 (40) (October 1): 28436–28444.
Du, W, P F Lebowitz, et G C Prendergast. 1999. “Cell Growth Inhibition by Farnesyltransferase Inhibitors Is Mediated by Gain of Geranylgeranylated RhoB..” *Molecular and Cellular Biology* 19 (3) (March): 1831–1840.
Eden, S, R Rohatgi, A V Podtelejnikov, M Mann, et M W Kirschner. 2002. “Mechanism of Regulation of WAVE1-Induced Actin Nucleation by Rac1 and Nck.” *Nature* 418 (6899): 790–793. doi:10.1038/nature00859.
Elliott, Michael R, Faraaz B Chekeni, Paul C Trampont, Eduardo R Lazarowski, Alexandra Kadl, Scott F Walk, Daeho Park, et al. 2009. “Nucleotides Released by Apoptotic Cells Act as a Find-Me Signal to Promote Phagocytic Clearance.” *Nature* 461 (7261) (September 10): 282–286. doi:10.1038/nature08296.
Elliott, Michael R, Shuqiu Zheng, Daeho Park, Robin I Woodson, Michael A Reardon, Ignacio J Juncadella, Jason M Kinchen, Jun Zhang, Jeffrey J Lysiak, et Kodi S Ravichandran. 2010. “Unexpected Requirement for ELMO1 in Clearance of Apoptotic Germ Cells in Vivo..” *Nature* 467 (7313) (September 16): 333–337. doi:10.1038/nature09356.
Elward, Kristina, Mark Griffiths, Masashi Mizuno, Claire L Harris, Jim W Neal, B Paul Morgan, et Philippe Gasque. 2005. “CD46 Plays a Key Role in Tailoring Innate Immune Recognition of

Apoptotic and Necrotic Cells..” *J Biochem* 280 (43) (October 28): 36342–36354. doi:10.1074/jbc.M506579200.
Ernst, Matthias, Melissa Inglese, Glen M Scholz, Kenneth W Harder, Fiona J Clay, Steven Bozinovski, Paul Waring, et al. 2002. “Constitutive Activation of the SRC Family Kinase Hck Results in Spontaneous Pulmonary Inflammation and an Enhanced Innate Immune Response..” *The Journal of Experimental Medicine* 196 (5) (September 2): 589–604.
Ethell, D W, et L A Buhler. 2003. “Fas Ligand-Mediated Apoptosis in Degenerative Disorders of the Brain.” *Journal of Clinical Immunology* 23 (6) (November): 439–446.
Etienne-Manneville, S, et A Hall. 2002. “Rho GTPases in Cell Biology.” *Nature*.
Evans, James G, Ivan Correia, Olga Krasavina, Nicki Watson, et Paul Matsudaira. 2003. “Macrophage Podosomes Assemble at the Leading Lamella by Growth and Fragmentation.” *The Journal of Cell Biology* 161 (4) (May 26): 697–705. doi:10.1083/jcb.200212037.
Fadok, V, D Bratton, A Konowal, P Freed, J Westcott, et P Henson. 1998. “Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells in Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-Beta, PGE2, and PAF.” *J Clin Invest* 101 (4) (February 15): 890–898.
Fitzer-Attas, C J, M Lowry, et M T Crowley. 2000. “Fcγ Receptor–Mediated Phagocytosis in Macrophages Lacking the Src Family Tyrosine Kinases Hck, Fgr, and Lyn.” *The Journal of ….*
Fukata, M, et K Kaibuchi. 2001. “Rho-Family GTPases in Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion..” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (12) (December): 887–897. doi:10.1038/35103068.
Gakidis, M Angelica Martinez, Xavier Cullere, Timothy Olson, Julie L Wilsbacher, Bin Zhang, Sheri L Moores, Klaus Ley, Wojciech Swat, Tanya Mayadas, et Joan S Brugge. 2004. “Vav GEFs Are Required for Beta2 Integrin-Dependent Functions of Neutrophils..” *The Journal of Cell Biology* 166 (2) (July 19): 273–282. doi:10.1083/jcb.200404166.
Gardai, Shyra J, Kathleen A McPhillips, S Courtney Frasch, William J Janssen, Anna Starefeldt, Joanne E Murphy-Ullrich, Donna L Bratton, Per-Arne Oldenborg, Marek Michalak, et Peter M Henson. 2005. “Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells Through Trans-Activation of LRP on the Phagocyte.” *Cell* 123 (2) (October 21): 321–334. doi:10.1016/j.cell.2005.08.032.
Gauthier-Rouviere, C, E Vignal, M Meriane, P Roux, P Montcourier, et P Fort. 1998. “RhoG GTPase Controls a Pathway That Independently Activates Rac1 and Cdc42Hs.” *Molecular Biology of the Cell* 9 (6) (June): 1379–1394.
Goley, Erin D, et Matthew D Welch. 2006. “The ARP2/3 Complex: an Actin Nucleator Comes of Age..” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10) (October): 713–726. doi:10.1038/nrm2026.
Govind, S, R Kozma, C Monfries, L Lim, et S Ahmed. 2001. “Cdc42Hs Facilitates Cytoskeletal Reorganization and Neurite Outgrowth by Localizing the 58-kD Insulin Receptor Substrate to Filamentous Actin.” *The Journal of Cell Biology* 152 (3): 579–594.
Griffiths, M R, P Gasque, et J W Neal. 2010. “The Regulation of the CNS Innate Immune Response Is Vital for the Restoration of Tissue Homeostasis (Repair) After Acute Brain Injury: a Brief Review..” *International Journal of Inflammation* 2010 (1): 151097–18. doi:10.4061/2010/151097.
Grimsley, Cynthia M, J Kinchen, A Tosello-Trampont, E Brugnera, L Haney, M Lu, Q Chen, D Klingele, M Hengartner, et K Ravichandran. 2004. “Dock180 and ELMO1 Proteins Cooperate to Promote Evolutionarily Conserved Rac-Dependent Cell Migration.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (7) (February 13): 6087–6097.
Grimsley, Cynthia M, Mingjian Lu, Lisa B Haney, Jason M Kinchen, et Kodi S Ravichandran. 2006. “Characterization of a Novel Interaction Between ELMO1 and ERM Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (9) (March 3): 5928–5937. doi:10.1074/jbc.M510647200.
Gude, D. R., S. E. Alvarez, S. W. Paugh, P. Mitra, J. Yu, R. Griffiths, S. E. Barbour, S. Milstien, et S. Spiegel. 2008. “Apoptosis Induces Expression of Sphingosine Kinase 1 to Release Sphingosine-1-Phosphate as a ‘Come-and-Get-Me’ Signal.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (8) (April 16): 2629–2638. doi:10.1096/fj.08-107169.
Guiet, Romain, Renaud Poincloux, Jerôme Castandet, Louis Marois, Arnaud Labrousse, Véronique Le Cabec, et Isabelle Maridonneau-Parini. 2008. “Hematopoietic Cell Kinase (Hck) Isoforms and Phagocyte Duties - From Signaling and Actin Reorganization to Migration and Phagocytosis..” *European Journal of Cell Biology* 87 (8-9) (September): 527–542. doi:10.1016/j.ejcb.2008.03.008.
Gumienny, T, E Brugnera, A Tosello-Trampont, J Kinchen, L Haney, K Nishiwaki, Scott F Walk, et al. 2001. “CED-12/ELMO, a Novel Member of the CrkII/Dock180/Rac Pathway, Is Required for Phagocytosis and Cell Migration.” *Cell* 107 (1) (October 5): 27–41.
Hamon, Y, D Trompier, Z Ma, V Venegas, M Pophillat, V Mignotte, Z Zhou, et G Chimini. 2006. “Cooperation Between Engulfment Receptors: the Case of ABCA1 and MEGF10.” *PLoS ONE* 1: e120.

Hanawa-Suetsugu, Kyoko, Mutsuko Kukimoto-Niino, Chiemi Mishima-Tsumagari, Ryogo Akasaka, Noboru Ohsawa, Shun-Ichi Sekine, Takuhiro Ito, et al. 2012. “Structural Basis for Mutual Relief of the Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor DOCK2 and Its Partner ELMO1 From Their Autoinhibited Forms..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (February 13). doi:10.1073/pnas.1113512109.

Hanayama, R, M Tanaka, K Miwa, A Shinohara, A Iwamatsu, et S Nagata. 2002. “Identification of a Factor That Links Apoptotic Cells to Phagocytes.” *Nature* 417 (6885) (May 9): 182–187.

Hasegawa, H, E Kiyokawa, S Tanaka, K Nagashima, N Gotoh, M Shibuya, T Kurata, et Michiyuki Matsuda. 1996. “DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, Alters Cell Morphology Upon Translocation to the Cell Membrane.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (4) (April 1): 1770–1776.

Hassaine, G, M Courcoul, G Bessou, Y Barthalay, C Picard, D Olive, Y Collette, R Vigne, et E Decroly. 2001. “The Tyrosine Kinase Hck Is an Inhibitor of HIV-1 Replication Counteracted by the Viral Vif Protein..” *J Biochem* 276 (20) (May 18): 16885–16893. doi:10.1074/jbc.M009076200.

Hiramoto, Kiyo, Manabu Negishi, et Hironori Katoh. 2006. “Dock4 Is Regulated by RhoG and Promotes Rac-Dependent Cell Migration..” *Experimental Cell Research* 312 (20) (December 10): 4205–4216. doi:10.1016/j.yexcr.2006.09.006.

Hochreiter-Hufford, Amelia, et Kodi S Ravichandran. 2013. “Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion..” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (1) (January): a008748–a008748. doi:10.1101/cshperspect.a008748.

Hoffmann, P, A deCathelineau, C Ogden, Yann Leverrier, D Bratton, D Daleke, A Ridley, V Fadok, et P Henson. 2001. “Phosphatidylserine (PS) Induces PS Receptor-Mediated Macropinocytosis and Promotes Clearance of Apoptotic Cells.” *The Journal of Cell Biology* 155: 649–659.

Hubbard, S R, M Mohammadi, et J Schlessinger. 1998. “Autoregulatory Mechanisms in Protein-Tyrosine Kinases..” *J Biochem* 273 (20) (May 15): 11987–11990. doi:10.1074/jbc.273.20.11987.

Huebner, R J, et G J Todaro. 1969. “Oncogenes of RNA Tumor Viruses as Determinants of Cancer..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64 (3) (November): 1087–1094.

Jabara, Haifa H., Douglas R. McDonald, Erin Janssen, Michel J. Massaad, Narayanaswamy Ramesh, Arturo Borzutzky, Ingrid Rauter, et al. 2012. “DOCK8 Functions as an Adaptor That Links TLR-MyD88 Signaling to B Cell Activation.” *Nature Immunology* 13 (6): 612–. doi:10.1038/ni.2305.

Janardhan, Ajit, Tomek Swigut, Brian Hill, Michael P Myers, et Jacek Skowronski. 2004. “HIV-1 Nef Binds the DOCK2-ELMO1 Complex to Activate Rac and Inhibit Lymphocyte Chemotaxis.” *PLoS Biology* 2 (1): E6. doi:10.1371/journal.pbio.0020006.

Jia, Yanjun, Isamu Sakabe, Takenori Matsudal, Tomoko Hayakawa, et Mitsuo Maruyama. 2012. “Restricted Expression of New Guanine Nucleotide Exchange Factor Zizimin2 in Aged Acquired Immune System..” *Nagoya Journal of Medical Science* 74 (3-4) (August): 303–311.

Johnson, L N, M E Noble, et D J Owen. 1996. “Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation..” *Cell* 85 (2) (April 19): 149–158.

Kagan, V, B Gleiss, Y Tyurina, V Tyurin, C Elenstrom-Magnusson, S Liu, F Serinkan, et al. 2002. “A Role for Oxidative Stress in Apoptosis: Oxidation and Externalization of Phosphatidylserine Is Required for Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas-Mediated Apoptosis.” *J Immunol* 169 (1) (July 1): 487–499.

Karaman, Mazen W, Sanna Herrgard, Daniel K Treiber, Paul Gallant, Corey E Atteridge, Brian T Campbell, Katrina W Chan, et al. 2008. “A Quantitative Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity.” *Nature Biotechnology* 26 (1) (January): 127–132. doi:10.1038/nbt1358.

Katoh, H, et M Negishi. 2003. “RhoG Activates Rac1 by Direct Interaction with the Dock180-Binding Protein Elmo.” *Nature* 424 (6947) (July 24): 461–464.

Kim, Soyoun, Seung-Yoon Park, Sang-Yeob Kim, Dong-Jun Bae, Jae-Hoon Pyo, Mina Hong, et In-San Kim. 2012. “Cross Talk Between Engulfment Receptors Stabilin-2 and Integrin Alpha v Beta 5 Orchestrates Engulfment of Phosphatidylserine-Exposed Erythrocytes.” *Molecular and Cellular Biology* 32 (14) (July): 2698–2708. doi:10.1128/MCB.06743-11.

Kiss, R, M Elliott, Z Ma, Y Marcel, et K Ravichandran. 2006. “Apoptotic Cells Induce a Phosphatidylserine-Dependent Homeostatic Response From Phagocytes.” *Curr Biol* 16 (22) (November 21): 2252–2258.

Kiyokawa, E, Y Hashimoto, T Kurata, H Sugimura, et Michiyuki Matsuda. 1998. “Evidence That DOCK180 Up-Regulates Signals From the CrkII-P130(Cas) Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (38) (September 18): 24479–24484.

Knight, Zachary A, et Kevan M Shokat. 2005. “Features of Selective Kinase Inhibitors..” *Chemistry & Biology* 12 (6) (June): 621–637. doi:10.1016/j.chembiol.2005.04.011.

Komander, David, Manishha Patel, Mélanie Laurin, Nadine Fradet, Ariane Pelletier, David Barford, et Jean-François Côté. 2008. “An Alpha-Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling..” *Molecular*

Biology of the Cell 19 (11) (November): 4837–4851. doi:10.1091/mbc.E08-04-0345.
Krause, Daniela S, et Richard A Van Etten. 2005. “Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy..” *N Engl J Med* 353 (2) (July 14): 172–187. doi:10.1056/NEJMra044389.
Krishnan, Harini, W Todd Miller, et Gary S Goldberg. 2012. “SRC Points the Way to Biomarkers and Chemotherapeutic Targets..” *Genes & Cancer* 3 (5-6) (May): 426–435. doi:10.1177/1947601912458583.
Krugmann, S, I Jordens, K Gevaert, M Driessens, J Vandekerckhove, et A Hall. 2001. “Cdc42 Induces Filopodia by Promoting the Formation of an IRSp53 : Mena Complex.” *Current Biology* 11 (21): 1645–1655.
Kulkarni, Kiran, Jing Yang, Ziguo Zhang, et David Barford. 2011. “Multiple Factors Confer Specific Cdc42 and Rac Protein Activation by Dedicator of Cytokinesis (DOCK) Nucleotide Exchange Factors..” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (28) (July 15): 25341–25351. doi:10.1074/jbc.M111.236455.
Kuramoto, Kazuya, Manabu Negishi, et Hironori Katoh. 2009. “Regulation of Dendrite Growth by the Cdc42 Activator Zizimin1/Dock9 in Hippocampal Neurons.” *J Neurosci Res* 87 (8) (June): 1794–1805. doi:10.1002/jnr.21997.
Laemmli, U K. 1970. “Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4..” *Nature* 227 (5259) (August 15): 680–685.
Landry, Y, M Denis, S Nandi, S Bell, A Vaughan, et X Zha. 2006. “ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression Disrupts Raft Membrane Microdomains Through Its ATPase-Related Functions.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (47) (November 24): 36091–36101.
Lauber, K, E Bohn, S Krober, Y Xiao, S Blumenthal, R Lindemann, P Marini, et al. 2003. “Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal.” *Cell* 113 (6) (June 13): 717–730.
Laurin, Mélanie, Nadine Fradet, Anne Blangy, Alan Hall, Kristiina Vuori, et Jean-François Côté. 2008. “The Atypical Rac Activator Dock180 (Dock1) Regulates Myoblast Fusion in Vivo..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (40) (October 7): 15446–15451. doi:10.1073/pnas.0805546105.
Li, C J, D J Friedman, C L WANG, V METELEV, PARDEE, AB. 1995. “Induction of Apoptosis in Uninfected Lymphocytes by Hiv-1 Tat Protein.” *Science (New York, NY)* 268 (5209): 429–431.
Linder, Stefan, et Martin Aepfelbacher. 2003. “Podosomes: Adhesion Hot-Spots of Invasive Cells..” *Trends in Cell Biology* 13 (7) (July): 376–385.
Liu, A X, W Du, J P Liu, T M Jessell, et G C Prendergast. 2000. “RhoB Alteration Is Necessary for Apoptotic and Antineoplastic Responses to Farnesyltransferase Inhibitors.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (16) (August): 6105–6113.
Liu, Q, et M Hengartner. 1998. “Candidate Adaptor Protein CED-6 Promotes the Engulfment of Apoptotic Cells in C. Elegans.” *Cell* 93 (6) (June 12): 961–972.
Lu, M, J Kinchen, K Rossman, Cynthia M Grimsley, C deBakker, E Brugnera, A Tosello-Trampont, et al. 2004. “PH Domain of ELMO Functions in Trans to Regulate Rac Activation via Dock180.” *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (8) (August 1): 756–762.
Lu, M, J Kinchen, K Rossman, Cynthia M Grimsley, M Hall, J Sondek, M Hengartner, V Yajnik, et K Ravichandran. 2005. “A Steric-Inhibition Model for Regulation of Nucleotide Exchange via the Dock180 Family of GEFs.” *Curr Biol* 15 (4) (February 22): 371–377.
Makino, Y, M Tsuda, S Ichihara, T Watanabe, M Sakai, H Sawa, K Nagashima, S Hatakeyama, et S Tanaka. 2006. “Elmo1 Inhibits Ubiquitylation of Dock180.” *Journal of Cell Science* 119 (Pt 5) (March 1): 923–932.
Manning, G, D B Whyte, R Martinez, et T Hunter. 2002. “The Protein Kinase Complement of the Human Genome.” *Science (New York, NY)*. doi:10.1126/science.1075762.
Marguet, D, M F Luciani, A Moynault, et P Williamson. 1999. “Engulfment of Apoptotic Cells Involves the Redistribution of Membrane Phosphatidylserine on Phagocyte and Prey.” *Nature Cell ….*
Matsuda, Michiyuki, S Ota, R Tanimura, H Nakamura, K Matuoka, T Takenawa, K Nagashima, et T Kurata. 1996. “Interaction Between the Amino-Terminal SH3 Domain of CRK and Its Natural Target Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (24) (June 14): 14468–14472.
Meller, N, M Irani-Tehrani, W B Kiosses, M A Del Pozo, et M A Schwartz. 2002. “Zizimin1, a Novel Cdc42 Activator, Reveals a New GEF Domain for Rho Proteins.” *Nature Publishing Group* 4 (9) (September): 639–647. doi:10.1038/ncb835.
Meller, Nahum, M Jody Westbrook, John D Shannon, Chittibabu Guda, et Martin A Schwartz. 2008. “Function of the N-Terminus of Zizimin1: Autoinhibition and Membrane Targeting..” *Biochem J* 409 (2) (January 15): 525–533. doi:10.1042/BJ20071263.
Meller, Nahum, Mohammad Irani-Tehrani, Boris I Ratnikov, Bryce M Paschal, et Martin Alexander Schwartz. 2004. “The Novel Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor, Zizimin1, Dimerizes via the Cdc42-Binding CZH2 Domain..” *J Biochem* 279 (36) (September 3): 37470–37476.

doi:10.1074/jbc.M404535200.
Meng, F, et C A Lowell. 1998. “A B1 Integrin Signaling Pathway Involving Src-Family Kinases, Cbl and PI-3 Kinase Is Required for Macrophage Spreading and Migration.” *The EMBO Journal*.
Merithew, Eric, et David G Lambright. 2002. “Calculating the Potential of C2 Domains for Membrane Binding..” *Developmental Cell* 2 (2) (February): 132–133.
Miki, H, S Suetsugu, et T Takenawa. 1998. “WAVE, a Novel WASP-Family Protein Involved in Actin Reorganization Induced by Rac.” *The EMBO Journal*.
Miller, T, N J Krogan, J Dover, H Erdjument-Bromage, P Tempst, M Johnston, J F Greenblatt, et A Shilatifard. 2001. “COMPASS: a Complex of Proteins Associated with a Trithorax-Related SET Domain Protein..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23) (November 6): 12902–12907. doi:10.1073/pnas.231473398.
Miyamoto, Yuki, et Junji Yamauchi. 2010. “Cellular Signaling of Dock Family Proteins in Neural Function..” *Cell Signal* 22 (2) (February): 175–182. doi:10.1016/j.cellsig.2009.09.036.
Mócsai, A, M Zhou, F Meng, V L Tybulewicz, et C A Lowell. 2002. “Syk Is Required for Integrin Signaling in Neutrophils.” *Immunity*.
Nagata, Shigekazu, Rikinari Hanayama, et Kohki Kawane. 2010. “Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells.” *Cell* 140 (5): 619–630. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014.
Nakano, T, Y Ishimoto, J Kishino, M Umeda, K Inoue, K Nagata, K Ohashi, K Mizuno, et H Arita. 1997. “Cell Adhesion to Phosphatidylserine Mediated by a Product of Growth Arrest-Specific Gene 6.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (47) (November 21): 29411–29414.
Namekata, K, Y Enokido, K Iwasawa, et H Kimura. 2004. “MOCA Induces Membrane Spreading by Activating Rac1.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (14) (April 2): 14331–14337.
Newbrough, S A, A Mócsai, R A Clemens, et J N Wu. 2003. “SLP-76 Regulates Fcγ Receptor and Integrin Signaling in Neutrophils.” *Immunity*.
Nishihara, H, S Kobayashi, Y Hashimoto, F Ohba, N Mochizuki, T Kurata, K Nagashima, et Michiyuki Matsuda. 1999. “Non-Adherent Cell-Specific Expression of DOCK2, a Member of the Human CDM-Family Proteins.” *Biochim Biophys Acta* 1452 (2) (November 11): 179–187.
Nishikimi, A, N Meller, N Uekawa, K Isobe, M Schwartz, et M Maruyama. 2005. “Zizimin2: a Novel, DOCK180-Related Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor Expressed Predominantly in Lymphocytes.” *FEBS Letters* 579 (5) (February 14): 1039–1046.
Nolan, K, K Barrett, Y Lu, K Hu, S Vincent, et J Settleman. 1998. “Myoblast City, the Drosophila Homolog of DOCK180/CED-5, Is Required in a Rac Signaling Pathway Utilized for Multiple Developmental Processes.” *Genes Dev* 12 (21) (November 1): 3337–3342.
Obeid, Michel, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Gian Maria Fimia, Lionel Apetoh, Jean-Luc Perfettini, Maria Castedo, et al. 2007. “Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death..” *Nature Medicine* 13 (1) (January): 54–61. doi:10.1038/nm1523.
Okigaki, M, C Davis, et M Falasca. 2003. “Pyk2 Regulates Multiple Signaling Events Crucial for Macrophage Morphology and Migration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
Park, Daeho, Annie-Carole Tosello-Trampont, Michael R Elliott, Mingjian Lu, Lisa B Haney, Zhong Ma, Alexander L Klibanov, James W Mandell, et Kodi S Ravichandran. 2007. “BAI1 Is an Engulfment Receptor for Apoptotic Cells Upstream of the ELMO/Dock180/Rac Module..” *Nature* 450 (7168) (November 15): 430–434. doi:10.1038/nature06329.
Park, S, M Jung, H Kim, S Lee, S Kim, B Lee, T Kwon, R Park, et I Kim. 2008. “Rapid Cell Corpse Clearance by Stabilin-2, a Membrane Phosphatidylserine Receptor.” *Cell Death and Differentiation* 15 (1): 192–201.
Patel, M, T C Chiang, V Tran, F J S Lee, et J F Cote. 2011. “The Arf Family GTPase, Arl4A, Complexes with ELMO to Promote Actin Cytoskeleton Remodeling and Reveals a Versatile Ras-Binding Domain in the ELMO Protein Family.” *The Journal of Biological Chemistry* (September 19). doi:10.1074/jbc.M111.274191.
Patel, Manishha, Ariane Pelletier, et Jean-François Côté. 2011. “Opening Up on ELMO Regulation: New Insights Into the Control of Rac Signaling by the DOCK180/ELMO Complex..” *Small GTPases* 2 (5) (September): 268–275. doi:10.4161/sgtp.2.5.17716.
Patel, Manishha, Yoran Margaron, Nadine Fradet, Qi Yang, Brian Wilkes, Michel Bouvier, Kay Hofmann, et Jean-François Côté. 2010. “An Evolutionarily Conserved Autoinhibitory Molecular Switch in ELMO Proteins Regulates Rac Signaling..” *Curr Biol* 20 (22) (November 23): 2021–2027. doi:10.1016/j.cub.2010.10.028.
Pellicena, P, et W T Miller. 2001. “Processive Phosphorylation of p130Cas by Src Depends on SH3-Polyproline Interactions..” *J Biochem* 276 (30) (July 27): 28190–28196. doi:10.1074/jbc.M100055200.
Peyron, P, C Bordier, E N N'Diaye, et I Maridonneau-Parini. 2000. “Nonopsonic Phagocytosis of Mycobacterium Kansasii by Human Neutrophils Depends on Cholesterol and Is Mediated by CR3 Associated with Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins..” *J Immunol* 165 (9) (November

1): 5186–5191.
Poincloux, R, C Vincent, A Labrousse, J Castandet, M Rigo, C Cougoule, C Bordier, V Le Cabec, et I Maridonneau-Parini. 2006. “Re-Arrangements of Podosome Structures Are Observed When Hck Is Activated in Myeloid Cells.” In, 85:327–332. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.012.
Premkumar, Lakshmanane, Andrey A Bobkov, Manishha Patel, Lukasz Jaroszewski, Laurie A Bankston, Boguslaw Stec, Kristiina Vuori, Jean-François Côté, et Robert C Liddington. 2010. “Structural Basis of Membrane Targeting by the Dock180 Family of Rho Family Guanine Exchange Factors (Rho-GEFs)..” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (17) (April 23): 13211–13222. doi:10.1074/jbc.M110.102517.
Quintrell, N, R Lebo, H Varmus, J M Bishop, M J Pettenati, M M Le Beau, M O Diaz, et J D Rowley. 1987. “Identification of a Human Gene (HCK) That Encodes a Protein-Tyrosine Kinase and Is Expressed in Hemopoietic Cells..” *Molecular and Cellular Biology* 7 (6) (June): 2267–2275.
Raaf, Jennifer, Olaf-Georg Issinger, et Karsten Niefind. 2009. “First Inactive Conformation of CK2 Alpha, the Catalytic Subunit of Protein Kinase CK2..” *Journal of Molecular Biology* 386 (5) (March 13): 1212–1221. doi:10.1016/j.jmb.2009.01.033.
Randall, K L, S S Y Chan, C S Ma, I Fung, Y Mei, M Yabas, A Tan, et al. 2011. “DOCK8 Deficiency Impairs CD8 T Cell Survival and Function in Humans and Mice.” *Journal of Experimental Medicine* 208 (11) (October 24): 2305–2320. doi:10.1084/jem.20110345.
Ravichandran, K, et U Lorenz. 2007. “Engulfment of Apoptotic Cells: Signals for a Good Meal.” *Nature Reviews Immunology* 7 (12) (December 1): 964–974.
Reddien, P, et H Horvitz. 2000. “CED-2/CrkII and CED-10/Rac Control Phagocytosis and Cell Migration in Caenorhabditis Elegans.” *Nature Cell Biology* 2 (3) (March 1): 131–136.
Reif, K, et Jason G Cyster. 2002. “The CDM Protein DOCK2 in Lymphocyte Migration.” *Trends in Cell Biology* 12 (8) (August 1): 368–373.
Ridley, Anne J. 2006. “Rho GTPases and Actin Dynamics in Membrane Protrusions and Vesicle Trafficking.” *Trends in Cell Biology* 16 (10) (October 1): 522–529. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006.
Rigaut, G, A Shevchenko, B Rutz, M Wilm, M Mann, et B Séraphin. 1999. “A Generic Protein Purification Method for Protein Complex Characterization and Proteome Exploration.” *Nature Biotechnology* 17 (10) (October 1): 1030–1032. doi:10.1038/13732.
Rous, P. 1911. “A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable From the Tumor Cells.” *The Journal of Experimental Medicine*.
Sanders, Matthew A, Dinakar Ampasala, et Marc D Basson. 2009. “DOCK5 and DOCK1 Regulate Caco-2 Intestinal Epithelial Cell Spreading and Migration on Collagen IV.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 27–35. doi:10.1074/jbc.M808010200.
Santy, L, K Ravichandran, et J Casanova. 2005. “The DOCK180/Elmo Complex Couples ARNO-Mediated Arf6 Activation to the Downstream Activation of Rac1.” *Curr Biol* 15 (19) (October 11): 1749–1754.
Sanui, Terukazu, Ayumi Inayoshi, Mayuko Noda, Eiko Iwata, Masahiro Oike, Takehiko Sasazuki, et Yoshinori Fukui. 2003. “DOCK2 Is Essential for Antigen-Induced Translocation of TCR and Lipid Rafts, but Not PKC-Theta and LFA-1, in T Cells.” *Immunity* 19 (1) (July 1): 119–129.
Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. “Fiji: an Open-Source Platform for Biological-Image Analysis.” *Nature Methods* 9 (7) (July 1): 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
Schlessinger, J. 2000. “Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases.” *Cell* 103 (October 13): 211–225.
Schmidt, Holger, Silke Hoffmann, Tuyen Tran, Matthias Stoldt, Thomas Stangler, Katja Wiesehan, et Dieter Willbold. 2007. “Solution Structure of a Hck SH3 Domain Ligand Complex Reveals Novel Interaction Modes.” *Journal of Molecular Biology* 365 (5) (February 2): 1517–1532. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.013.
Schrijvers, Dorien M, Guido R Y De Meyer, Mark M Kockx, Arnold G Herman, et Wim Martinet. 2005. “Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis..” *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (6) (June): 1256–1261. doi:10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7.
Scott, Margaret Porter, Francesca Zappacosta, Eun Young Kim, Roland S Annan, et W Todd Miller. 2002. “Identification of Novel SH3 Domain Ligands for the Src Family Kinase Hck. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP), WASP-Interacting Protein (WIP), and ELMO1..” *J Biochem* 277 (31) (August 2): 28238–28246. doi:10.1074/jbc.M202783200.
Seavitt, J R, L S White, K M Murphy, D Y Loh, R M Perlmutter, et M L Thomas. 1999. “Expression of the P56(Lck) Y505F Mutation in CD45-Deficient Mice Rescues Thymocyte Development..” *Molecular and Cellular Biology* 19 (6) (June): 4200–4208.
Segawa, Katsumori, Jun Suzuki, et Shigekazu Nagata. 2011. “Constitutive Exposure of Phosphatidylserine on Viable Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (48): 19246–19251. doi:10.1073/pnas.1114799108.

Sévajol, M, J B Reiser, A Chouquet, J Perard, I Ayala, P Gans, Jean-Philippe Kleman, et D Housset. 2012. “The C-Terminal Polyproline-Containing Region of ELMO Contributes to an Increase in the Life-Time of the ELMO-DOCK Complex..” *Biochimie* 94 (3) (March): 823–828. doi:10.1016/j.biochi.2011.11.014.

Sévajol, Marion. 2012. “Caractérisation Structurale Et Biophysique De Elmo1 Et De Ses Interactions Avec Son Partenaire : Une Protéine Impliquée Dans Les Voies De Signalisation Du Remodelage Du Cytosquelette D’actine.” Grenoble.

Shih, Jin-Yuan, Ang Yuan, Jeremy J-W Chen, et Pan-Chyr Yang. 2006. “Tumor-Associated Macrophage: Its Role in Cancer Invasion and Metastasis.” *J Cancer Mol* 2 (3): 101–106.

Sicheri, Frank, et John Kuriyan. 1997. “Structures of Src-Family Tyrosine Kinases.” *Current Opinion in Structural Biology* 7 (6) (December): 777–785. doi:10.1016/S0959-440X(97)80146-7.

Somani, A K, J S Bignon, G B Mills, K A Siminovitch, et D R Branch. 1997. “Src Kinase Activity Is Regulated by the SHP-1 Protein-Tyrosine Phosphatase..” *J Biochem* 272 (34) (August 22): 21113–21119.

Su, H C. 2010. “DOCK8 (Dedicator of Cytokinesis 8) Deficiency.” *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. doi:10.1097/ACI.

Su, H, K Nakada-Tsukui, A Tosello-Trampont, Y Li, G Bu, P Henson, et K Ravichandran. 2002. “Interaction of CED-6/GULP, an Adapter Protein Involved in Engulfment of Apoptotic Cells with CED-1 and CD91/Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP).” *The Journal of Biological Chemistry* 277: 11772–11779.

Suen, P W, D Ilic, E Caveggion, G Berton, C H Damsky, et C A Lowell. 1999. “Impaired Integrin-Mediated Signal Transduction, Altered Cytoskeletal Structure and Reduced Motility in Hck/Fgr Deficient Macrophages..” *Journal of Cell Science* 112 (Pt 22) (November): 4067–4078.

Superti-Furga, G, et S A Courtneidge. 1995. “Structure-Function Relationships in Src Family and Related Protein Tyrosine Kinases..” *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17 (4) (April): 321–330. doi:10.1002/bies.950170408.

Tas, S W, P Quartier, M Botto, et L Fossati-Jimack. 2006. “Macrophages From Patients with SLE and Rheumatoid Arthritis Have Defective Adhesion in Vitro, While Only SLE Macrophages Have Impaired Uptake of Apoptotic Cells.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (2) (February): 216–221. doi:10.1136/ard.2005.037143.

Taylor, S S, et E Radzio-Andzelm. 1997. “Protein Kinase Inhibition: Natural and Synthetic Variations on a Theme.” *Current Opinion in Chemical Biology*.

Thomas, Richard M, Christian Schmedt, Marco Novelli, B Ken Choi, Jane Skok, Alexander Tarakhovsky, et Jürgen Roes. 2004. “C-Terminal SRC Kinase Controls Acute Inflammation and Granulocyte Adhesion..” *Immunity* 20 (2) (February): 181–191.

Thomas, S M, et J S Brugge. 1997. “Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases..” *Annu Rev Cell Dev Biol* 13 (1): 513–609. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.

Tosello-Trampont, A-C, J M Kinchen, E Brugnera, L B Haney, M O Hengartner, et K S Ravichandran. 2007. “Identification of Two Signaling Submodules Within the CrkII/ELMO/Dock180 Pathway Regulating Engulfment of Apoptotic Cells..” *Cell Death and Differentiation* 14 (5) (May): 963–972. doi:10.1038/sj.cdd.4402094.

Vigorito, Elena, Sarah Bell, Barbara J Hebeis, Helen Reynolds, Simon McAdam, Piers C Emson, Andrew McKenzie, et Martin Turner. 2004. “Immunological Function in Mice Lacking the Rac-Related GTPase RhoG.” *Molecular and Cellular Biology* 24 (2) (January 15): 719–729. doi:10.1128/MCB.24.2.719-729.2004.

Watabe-Uchida, Mitsuko, Keisha A John, Justyna A Janas, Sarah E Newey, et Linda Van Aelst. 2006. “The Rac Activator DOCK7 Regulates Neuronal Polarity Through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18.” *Neuron* 51 (6): 727–739. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.020.

Welch, H, et I Maridonneau-Parini. 1997. “Lyn and Fgr Are Activated in Distinct Membrane Fractions of Human Granulocytic Cells..” *Oncogene*.

Wennerberg, K, S M Ellerbroek, R Y Liu, A E Karnoub, K Burridge, et C J Der. 2002. “RhoG Signals in Parallel with Rac1 and Cdc42.” *J Biochem* 277 (49): 47810–47817. doi:10.1074/jbc.M203816200.

Wilkins, M R, E Gasteiger, A Bairoch, J C Sanchez, K L Williams, R D Appel, et D F Hochstrasser. 1999. “Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server..” *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 112: 531–552.

Wong, Kit, Patricia A Valdez, Christine Tan, Sherry Yeh, Jo-Anne Hongo, et Wenjun Ouyang. 2010. “Phosphatidylserine Receptor Tim-4 Is Essential for the Maintenance of the Homeostatic State of Resident Peritoneal Macrophages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8712–8717. doi:10.1073/pnas.0910929107.

Worth, A, A J Thrasher, et H B Gaspar. 2006. “Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: Molecular Basis of Disease and Clinical Phenotype.” *Br J Haematol* 133 (2) (April): 124–140. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.05993.x.

Wu, Y C, et H R Horvitz. 1998a. “The C-Elegans Cell Corpse Engulfment Gene Ced-7 Encodes a Protein Similar to ABC Transporters.” *Cell* 93 (6): 951–960.
Wu, Y, et H Horvitz. 1998b. “C. Elegans Phagocytosis and Cell-Migration Protein CED-5 Is Similar to Human DOCK180.” *Nature* 392 (6675) (April 2): 501–504.
Xu, W, S C Harrison, et M J Eck. 1997. “Three-Dimensional Structure of the Tyrosine Kinase C-Src..” *Nature* 385 (6617) (February 13): 595–602. doi:10.1038/385595a0.
Yamaguchi, H, et W A Hendrickson. 1996. “Structural Basis for Activation of Human Lymphocyte Kinase Lck Upon Tyrosine Phosphorylation..” *Nature* 384 (6608) (December 5): 484–489. doi:10.1038/384484a0.
Yelo, Estefania, Maria Victoria Bernardo, Lourdes Gimeno, Maria Jose Alcaraz-Garcia, Maria Juliana Majado, et Antonio Parrado. 2008. “Dock10, a Novel CZH Protein Selectively Induced by Interleukin-4 in Human B Lymphocytes.” *Molecular Immunology* 45 (12) (July): 3411–3418. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.003.
Yokoyama, Noriko, Colin D deBakker, Francesca Zappacosta, Michael J Huddleston, Roland S Annan, Kodi S Ravichandran, et W Todd Miller. 2005. “Identification of Tyrosine Residues on ELMO1 That Are Phosphorylated by the Src-Family Kinase Hck..” *Biochemistry* 44 (24) (June 21): 8841–8849. doi:10.1021/bi0500832.
Zalcman, G, V Closson, G Linarès-Cruz, F Lerebours, N Honoré, A Tavitian, et B Olofsson. 1995. “Regulation of Ras-Related RhoB Protein Expression During the Cell Cycle..” *Oncogene* 10 (10) (May 18): 1935–1945.
Zhou, Z, E Hartwieg, et H R Horvitz. 2001. “CED-1 Is a Transmembrane Receptor That Mediates Cell Corpse Engulfment in C-Elegans.” *Cell* 104 (1): 43–56.
Ziegler, S F, J D Marth, D B Lewis, et R M Perlmutter. 1987. “Novel Protein-Tyrosine Kinase Gene (Hck) Preferentially Expressed in Cells of Hematopoietic Origin..” *Molecular and Cellular Biology* 7 (6) (June): 2276–2285.

VI. ANNEXES

Abréviations

ABC :	ATP Binding Casette transporteur
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AKT :	Serine / Thréonine protein kinase
ALPS :	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Amp :	Ampicilline
ANP :	Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate ester
Arf:	ADP ribosylation factor
ArL :	Arf Like protein
ARNO :	ARF nucleotide binding site opener
ATP :	Adenosine triphosphate
BAI1 :	Brain specific angiogenesis inhibitor 1
BSA :	Bovine Serum Albumin
C.elegans :	*Caenorhabditis elegans*
C2 :	Protein kinase C conserved region 2
CD :	Cluster de différenciation
Cdc42 :	Cell division control protein 42 homolog
CED *:*	*C.elegans* cell Death
CHK :	C-terminal Src kinase homologous kinase
CrkII :	Cdc2 related kinase
Csk :	C-terminal Src Kinase
C-ter :	C-terminal
CV :	column volume
Da :	Dalton
DAD :	Diapahanous Auto-regulatory Domain
Dbl :	Diffuse B-Cell Lymphoma
DH:	Dbl-Homology
DHR :	DOCK Homology Region
Dia1 :	Diaphanous formin 1
DID :	Diaphanous Inhibitory Domain
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DO :	Densité optique
DOCK :	Downstream of CrkII ou Dedicator of cytokinesis
DTT :	DiThioThréitol
E.coli:	*Escherichia Coli*
EAD :	ELMO Auto-regulatory Domain
EDC :	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA :	acide Ethylène Diamine TétraAcétique
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EID :	ELMO Inhibitory Domain
ELM:	Domaine ELMO
ELMO:	Engulfment and cell Motility

EPHA3 : Ephrin type-A receptor 3
ERM: Ezrin Radixin Moesin
FACS: Fluoresence-Activated Cell Sorting
FAK: Focal Adhesion kinase
FL : Fluorescence
FSC : Forward Scatter
G418 : Généticine/néomycine
GAP : GTPase activating protein
GDI : G-nucleotide Dissociation Inhibitors
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GST : Gluthation -S-transférase
GTP : Guanosine Triphosphate
GULP : Engulfment adaptor protein
Hck : Hematopoeitic cell kinase
HEK : Human Embryonic Kidney cells
Hepes : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique .
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
IBS : Institut de Biologie Structurale
ICAM3 : Intercellular Adhesion Molecule.
IPTG : Isoppropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
IRSp53 : Insulin Receptor Substrate
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif
JAK2 : Janus Kinase 2
Kan : Kanamycine
K_d : Constante d'affinité
LB : Lysogeny Broth
LIM : Protéine «Lin-1, Isl-1 Mec-3»
LIMK : LIM Kinase
LRP1 : Low density lipoprotein receptor –related protein 1
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MBC : MyoBlast City
MFG10 : Milk-Fat-Globule 10
MFG-E8 : Milk -Fat-Globule -EGF-factor 8
MLC : Myosin Light Chain
MLCK : Myosin Light Chain
Nef : Negative Regulatory Factor
NHS : N-Hydroxysuccinimide
NP-40 : Nonidet P-40
N-ter : N-terminal
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase chain reaction
PEP : Proline-enriched tyrosine phosphatase
PFA : Paraformaldéhyde
PH : Plekstrin Homology

PLC ɣ :	Phospholipase C gamma
PS :	Phosphatidylsérine
PSB :	Partnership for Structural Biology
PtdIns :	Phosphatidyl inositol
PtdSer :	Phosphatidylsérine
PVDF :	PolyVinylidene Di-Fuoride
PxxP :	motif Polyproline
Pyk2 :	Proline-rich tyrosine kinase 2
Ras :	Rat Sarcoma
RBD :	Rho G binding Domain
Rho :	Ras Homology
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
Rnd :	Sous groupe de petites GTPases de la famille Rho
SCAR :	Suppressor of cAR
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC-MALLS :	Size Exclusion Chromotography-Multi Angle Laser Light Scattering
SFK :	SRC Family Kinases
SH2 :	Src Homology domain 2
SH3 :	Src Homology domain3
SHP1 :	SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase
SLP-76 :	SH2 domain-containing leukocyte protein 76
SPR :	Surface Plasmon Resonance
SSC :	Side Scatter
SVF :	Sérum de veau fœtal
Syk :	Spleen tyrosine kinase
TAE :	Tris-acetate-EDTA
TAM :	Tumor Associated Macrophage
TAP :	Tandem Affinity Purification
TCPTP :	T-cell protein tyrosine phosphatase
TEMED :	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TEV :	Tobacco Etch Virus
TNT :	Tris-Hcl, Nacl,Tween
Tris :	Trishydroxyméthylaminométhane
UTP :	Uridine Triphosphate
VAV-1 :	GEF de la famille Vav (Dbl)
WASP :	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE :	WASP family Verpolin-homologous

Publication

Relative contribution of C1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophages phagocytosis.

Mélanie Verneret[1,2,3], Pascale Tacnet-Delorme[1,2,3], Rim Osman[1,2,3], Rida Awad[1,2,3], Alexei Grichine[4], Jean-Philippe Kleman[1,2,3] and Philippe Frachet[1,2,3]

1 Univ. Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), Immune response to pathogens and altered self (IRPAS) group, F-38027 Grenoble, France

2 CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France

3 CEA, DSV, IBS, F-38027 Grenoble, France

4 Optical microscopy – Cell imaging platform, Institut Albert Bonniot, Inserm U823, University Grenoble Alpes, 38042 France.

*Running title: C1q, calreticulin and apoptotic cell phagocytosis

.

corresponding author:

Dr. Philippe Frachet, Altered-Self Phagocytosis (ASP) team, Immune response to pathogens and altered self (IRPAS) group, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 41 37; Fax: +33 4 38 78 54 94.

E-mail : philippe.frachet@ibs.fr

Key words: C1q; Calreticulin; Phagocytosis; Apoptotic cells; Immune response; IL6; IL8

Abstract

C1q has been shown to recognize apoptotic cells, to enhance their uptake and to modulate cytokine release by phagocytes thus promoting immune tolerance. Surface-exposed calreticulin (CRT), known as a C1q receptor, is also considered an early eat-me signal that enhances phagocytosis of apoptotic cells and is capable to elicit an immunogenic response. However, the molecular mechanisms of how these functions are triggered are unclear. We hypothesized that CRT and C1q might play together in these processes. We first showed by FRET that CRT interacts with C1q globular region at the surface of early apoptotic cells. We next pointed that knockdown of CRT on early apoptotic HeLa cells impaired the enhancement effect of C1q on their uptake by THP-1 monocyte–derived macrophages. Furthermore, CRT deficiency induced contrasted effects on cytokine release by THP-1, increasing IL6 and MCP-1/CCL2 and decreasing IL8. Remarkably, these effects were greatly reduced when apoptotic cells were opsonized by C1q which counterbalanced the effect of CRT deficiency. These results demonstrate that CRT-C1q interaction is involved in C1q bridging function and highlight the particular ability of C1q to control the phagocyte inflammatory status, by integrating the molecular changes that could occur at the surface of dying cells.

Introduction

The well-known complement component C1q [1-4] has been described in the last decade for its role in recognition and removal of apoptotic cells. C1q acts through its globular regions (C1qGR) as an opsonin and by itself, facilitates the uptake of unwanted self-cells by phagocytes [5-9]. Numerous studies have also shown that C1q, which is predominantly synthesized by macrophages and dendritic cells, influences the phagocyte "status" by modulating its differentiation and regulating its cytokine expression [5,6,10-12]. Accordingly, mutations in C1q and C1q deficiency were linked to systemic *lupus* erythematosus (SLE) auto immune disease. In addition, genetic variants of C1q were associated with development of Rheumatoid Arthritis [9,13,14]. C1q binding to apoptotic cell surface is a multimolecular event, not completely deciphered yet. We and others have characterized a number of molecules that mark the apoptotic cell and serve as C1qGR ligands, such as phosphatidylserine (PS) [15], DNA [16,17], annexins [18], GAPDH [19] and calreticulin (CRT) [20]. To add complexity, some of them have been shown to interact, such as PS with CRT or with annexins [20-22]. How these interactions modulate apoptotic cell uptake and/or immune response initiated by the phagocyte, is a major question that needs to be solved to understand the fragile balance between tolerance and immunogenicity. Recently characterized an early eat-me signal that enhances phagocytosis of apoptotic cells [23], surface-exposed CRT (ectoCRT) is also known for a long time as a C1q receptor associated with CD91 at the phagocyte surface, even if the consequence of this interaction is still unclear [24,25]. The way CRT could play its functions on each side of the phagocytic synapse remains to be elucidated. Interestingly, recent studies have revealed the immunogenic consequences of CRT exposure at the surface of dying cells, and have demonstrated that CRT could trigger

an immunogenic response in reaction to pro-apoptotic/anti-cancer drugs [26]. The apparent opposite effects of C1q viewed as tolerogenic, correlated to the immunosuppressive behavior of apoptotic cells, and of CRT mostly described as immunogenic, remains questioning and prompted us to examine the combined effect of both proteins on the phagocyte response to apoptotic cells. In a previous study, we have demonstrated that CRT binds with high affinity to C1qGR but also to PS, which is moreover well recognized by C1q at the surface of early apoptotic cells. Notably, CRT knockdown obtained by specific siRNA, reducing exposure of CRT at the surface of HeLa cells, induced an increase of apoptotic cell binding to C1q [20].

In order to gain insights into the mutual effect of C1q and ectoCRT on the uptake of apoptotic cells, we examined herein the direct C1qGR–CRT interaction at the surface of apoptotic HeLa cells and we measured how C1q and CRT impact the phagocytosis mediated by THP-1 derived macrophages and their cytokine profile.

Materials and methods

Media, reagents and antibodies: Glutamax Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA, Phosphate Buffered Saline (PBS) and CFSE were purchased from Invitrogen. The fetal calf serum was obtained from Dutscher. Dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), LPS (from E. coli 055:B5) were purchased from Sigma-Aldrich. PA1-902A, a chicken polyclonal antibody directed against the N-terminus of CRT, was obtained from Affinity Bioreagents; Rabbit polyclonal antibodies directed against human C1q were from the Immune response to pathogens and altered-self group (Institut de Biologie Structurale-Grenoble). C1q and C1qGRs were purified

from human serum and were prepared and quantified as described previously [27].

Cell culture, apoptosis induction and THP-1 differentiation: HeLa cells (American Type Culture collection, # CCL-2) were grown in Glutamax DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin (2.5 U/ml), and streptomycin (2.5 µg/ml) at 5% CO_2. THP-1 cells (American Type Culture collection, # TIB-202) were cultivated in RPMI supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, penicillin (2.5 U/ml), and streptomycin (2.5 µg/ml) at 5% CO_2. The cells were regularly tested for *Mycoplasma* contamination (Mycoalert detection kit, Lonza). Apoptosis of HeLa cells cultured at 60–80% confluence was induced by UV-B irradiation (1000 mJ/cm^2) at 312 nm in fresh DMEM as previously described [15]. Cells were then incubated for the indicated times at 37 °C under 5% CO_2. Measurement of early/late apoptosis was performed by flow cytometry using the Annexin V-FITC Kit (MACS Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Before 6 hours after the UV irradiation, cell population was considered early apoptotic as PI labeling did not increase significantly at this time point. Early apoptotic cells harvested 4 or 6 hours after UV irradiation were used for phagocytosis assay and FRET analysis, respectively. Late apoptotic cells were obtained 20h after the UV irradiation. To induce the differentiation of THP-1 monocyte cells to macrophages, the cells were treated with 10 nM PMA for 72 hours [28,29]. Evaluation of cell phenotypes was performed by standard flow cytometry using fluorochrome-conjugated antibodies against cell surface markers CD14, CD11b, CD11c, CD54 and HLA-DR. The appropriate fluorochrome-conjugated isotype control antibodies were used as negative controls. Fluorochrome-conjugated antibodies were

obtained from eBioscience for anti-CD11c and anti-CD14; anti-CD11b, -CD54 and -HLA-DR were from BD Pharmigen. Flow cytometry data were analyzed with a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences) or Flowing software (Turku Center for Biotechnology, Finland).

RNA interference: Cells were transfected with siRNA as described previously [20]. Briefly, HeLa cells were transfected with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) by siRNA specific for CRT or by its complementary inverse sequence as a control at a final concentration of 10 nM. 48 hours after transfection cells were assessed for their total CRT content by western blotting.

Confocal microscopy and FRET quantification: Cells were washed in PBS and fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde at 37°C (EM Grade, Electron Microscopy Science). HeLa cells were then incubated with C1qGR or C1q (10 µg/ml) in PBS-1%BSA for 1 h at room temperature. CRT and bound C1qGR were then detected by indirect immunofluorescence with the anti-CRT antibody PA1-902A (10 µg/ml) and a rabbit polyclonal anti- C1q antibody diluted 1:2000, respectively. Bound antibodies were visualized with Alexa-488-conjugated donkey anti-chicken IgY and cyanine-3-conjugated goat anti-rabbit IgG, both diluted 1:200 (Jackson Immunoresearch, Interchim). Cells were mounted on glass slides with Vectashield HardSet solution (Vector Laboratories) and were photographed with a laser confocal fluorescence microscope LSM 710 (Zeiss) using a plan-apochromat 63X/1.4 oil with a 512x512 pixel size image. The efficiency of FRET is measured as a relative increase in donor fluorescence (Alexa-488) following the specific photobleaching of the acceptor fluorophore, which is cyanine-3. Several

photobleaching steps with moderate laser power were performed and the obtained data were extrapolated by the linear regression fit to a zero-acceptor point in order to get more reliable estimation of FRET efficiency, independent on the degree of acceptor photobleaching or local variations of pixel intensities. The analysis of the fluorescence intensity of the fluorophore and the FRET efficiency was evaluated with the Volocity software (Perkin Elmer).

Uptake of apoptotic cells: This protocol was adapted from Fraser et al [5]: HeLa cells were labeled with CFSE as follows: cells were washed twice and resuspended at $1x10^6$ cells/ml in PBS and incubated with 5 µM CFSE at 37°C for 15 min. Remaining CFSE was quenched with DMEM-10% FCS, and cells were washed three times before induction of apoptosis or siRNA transfection. Prior to phagocytosis, live or apoptotic HeLa cells were preincubated with 0 or 25 µg/mL C1q in RPMI 1640-10% FCS for 30 min at 37 °C, washed and added to THP-1-derived macrophages at a ratio of 1:1. The cells were then placed in contact for 1 h at 37 °C, 5% CO_2 after centrifugation for 5 min at 300g. After incubation, cells were harvested with 0.25% trypsin/EDTA. The trypsin reaction was stopped with medium containing 10% FCS. Cells were pelleted by centrifugation at 300g for 5 min, washed with PBS, and resuspended in PBS-1%BSA for staining. THP-1-macrophages were stained with mouse anti-human CD11c-PE or mouse IgG1-PE isotype control for 1 h on ice. They were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, and resuspended in PBS before FACS analysis. Phagocytosis was calculated as the percent of the double CFSE and CD11c-PE labeled-cells in the THP-1 macrophages population (CD11c-PE positive

cells). Phagocytosis negative controls performed at 4°C showed percent ≤ 5% of the double CFSE and CD11c-PE labeled-cells.

Quantification of Cytokine release: Cells were treated essentially as for the uptake assays described above but unlabeled live or apoptotic HeLa cells were used. After the uptake of apoptotic cells, phagocytic cells were washed with PBS and resuspended in RPMI 1640-10% FCS. Supernatants were harvested for cytokine analysis 18 hours after the phagocytosis assay (and in some conditions after the addition of 30 ng/mL of LPS), centrifuged to remove cellular debris, and stored at -80°C until analysis. Cytokine production were analyzed in the same sample using a BD Cytometric Bead Array (BD Biosciences) for detection of interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor-α (TNFα) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2) [30]. Analyses were done at the EFS (Etablissement Français du Sang)-Grenoble.

Results

C1q and calreticulin interact at the surface of early apoptotic cells

We developed a FRET strategy to detect C1qGR interaction with endogenous ectoCRT. In our approach exogenous C1qGR and cell-surface CRT were detected using specific antibodies. Analyses were done on viable and UV-treated apoptotic HeLa cells. FRET was evaluated after acceptor photobleaching (Cy-3 dye, C1qGR labeling) by measuring donor fluorescence increase (Alexa-488 dye, CRT labeling). Representative images of C1qGR-CRT co-localization areas detected on early apoptotic cells (6h after UV irradiation), and the corresponding FRET efficiency curves are shown in Fig. 1. On cells without visible membrane bleb, a significant

FRET efficiency of about 6 to 12% was measured on all co-localization areas. The presence of a FRET signal, in spite of the spacing created by the antibodies indicates the close proximity of the fluorophores and the direct interaction of the labeled proteins. An example of C1qGR and CRT co-localization and the corresponding FRET analysis (displaying a FRET efficiency of about 8%) is shown on panel A. Interestingly, for cells dispatching the characteristic surface blebs (Fig. 1, B) which indicates that cells are in a more advanced stage of apoptosis, the result was heterogeneous. Indeed, some patches presented a FRET positive signal similar to that observed previously (Fig. 1, A) but for most of areas, no FRET signal could be detected as shown on panel B (Fig 1, B). This suggests that C1q-CRT interaction is mostly a feature of the earlier stages of apoptosis.

Down regulation of calreticulin on apoptotic cell impacts their uptake and the C1q efficiency

In order to analyze the CRT effect on the uptake of apoptotic HeLa cells by macrophages, we measured the capacity of PMA-stimulated THP-1 cells to phagocyte siRNA-treated HeLa cells. Viable or apoptotic HeLa cells labeled with CFSE and partially depleted for CRT (resulting in decreases of 49-79% in surface-CRT as previously described [20]) were submitted to differentiated THP-1. Percentage of CD11c-positive macrophages, that had engulfed HeLa cell(s), was determined by flow cytometry as described in *Materials and Methods*. To assess specifically the effect of C1q, apoptotic HeLa cells were opsonized, or not, with 25 μg/ml C1q prior to the phagocytosis. As illustrated for a representative experiment (Fig. 2), HeLa cells were efficiently engulfed by THP-1 macrophages and the phagocytosis increased with development of apoptosis. CRT-deficient apoptotic cells (siRNA CRT) were significantly less engulfed than control siRNA-treated cells (siRNA

ct), either at early or late stage of apoptosis (i.e. 4 or 20 h after UV irradiation). As expected from published data [5], C1q only slightly but specifically enhanced the phagocytosis of early apoptotic cells. Remarkably, this was not observed for CRT-deficient cells. In our assays, C1q had no effect on the phagocytosis of late apoptotic cells.

C1q and CRT play together in regulating cytokine profile.

As it has been previously shown that apoptotic cells, C1q and CRT have immunomodulatory effects on phagocytic cells, we next investigated IL 1α, IL1β, IL6, IL8, IL10, IL12, MCP-1/CCL2 and TNFα cytokines production in our model. This analysis was performed in sterile conditions (i.e. in absence of microorganisms component) to avoid influence of other cytokine modulating factors. Under this condition, IL10 and TNFα were not detected and IL 1α, IL1β and IL12 only detected at low level (data not shown). In contrast, the pro-inflammatory IL6, IL8 and MCP-1/CCL2 cytokines were efficiently produced and modulated by THP-1 macrophages after incubation with HeLa cells. As a result of viable HeLa cells uptake (observed in Fig. 2), THP-1 cells impressively enhanced the production of IL6, MCP-1/CCL2 and IL8 (Fig. 3). In agreement with the known anti-inflammatory effect of apoptotic cells, this increase was importantly affected when cells were rendered apoptotic. In addition, CRT deficiency clearly reduced this anti-inflammatory effect by increasing IL6 and MCP-1/CCL2 but not IL8 releases (Fig 3). Indeed, concentrations of IL6 and MCP-1/CCL2 were of 7.9- and 4.1-fold higher for CRT siRNA-treated early apoptotic cells, compared to control siRNA-treated cells. Similarly, increases were also observed for late apoptotic cells (14.1- and 2.2-fold for IL6 and MCP-1/CCL2,

respectively). When early apoptotic cells were first opsonized by exogenous C1q, the differences between siRNA CRT and siRNA control conditions were clearly of lesser extent for both IL6 and MCP-1/CCL2 cytokine levels. It suggests that the presence of C1q could compensate the CRT deficiency. If IL8 release was not affected by CRT on early apoptotic cells (Fig. 3), it nevertheless significantly decreased following uptake of late apoptotic CRT-deficient cells (late siRNA CRT *versus* late siRNA control cells). Interestingly, level of IL6 was differentially modulated by C1q depending of the CRT on the early apoptotic cells (Fig. 4 A): the decrease of IL6 is noticeably more marked for CRT-deficient cells than for control cells. No significant change was observed in response to late apoptotic cells uptake. On the contrary, effect on IL8 level was observed only for macrophages fed with late apoptotic cells but, at the opposite of what we measured for IL6, C1q affected more efficiently the IL8 level in the case of phagocytosis of control cells than CRT-deficient cells (Fig 4 B). Finally, the emblematic IL10 anti-inflammatory cytokine was only produced after LPS-stimulation of THP-1. Even under this condition, the level of IL10 remained weak and appeared unaffected by CRT and C1q. The same observation was done for TNFα (data not shown).

Discussion

The C1q globular region binds with high affinity to purified CRT and C1qGR partially co localizes with ectoCRT at the surface of apoptotic cells, thus raising the possibly that CRT and C1q act together to modulate the phagocytosis event by their interaction at the apoptotic cell surface. Accordingly, we have previously demonstrated that PS is a common C1q and CRT partner and that CRT knockdown

increased C1q binding to apoptotic cell binding possibly through its interaction with PS [20]. Here, we focused on C1q/CRT interactions that occur at the apoptotic cell surface and their effect on the phagocyte function. We first demonstrated by FRET that C1q binds directly to CRT exposed at the apoptotic cell surface and our observation suggests that this interaction could be dependent on the apoptotic stage. Secondly, we analyzed the consequence of CRT deficiency on the uptake of the cells undergoing apoptosis by THP-1 macrophages. As expected from reports showing that CRT could be an early eat-me signal in the apoptotic cells uptake, we have shown that CRT-deficient apoptotic HeLa cells were effectively less engulfed than control cells. We also observed that CRT deficiency abolished the C1q enhancement of phagocytosis of early apoptotic cells. This result is logically supported by direct CRT-C1q interaction and provides evidence that CRT is a C1q ligand involved in the C1q enhancement of apoptotic cell uptake at early stage of apoptosis. However, together with our previous observation that reducing surface CRT-exposure on early apoptotic cells induces a significant increase of C1q binding [20] this indicates that the presence of C1q at the cell surface is not sufficient for its bridging function. This also underlines that functions supported by C1q are dependent on the accessibility of its ligands on the apoptotic cell, and suggests that binding events could modulate responses triggered by C1q. To get insights into C1q function in signaling and its possible partnership with ectoCRT in this process, we have quantified cytokines released from phagocytic THP-1 macrophages. Our findings indicated that, if apoptotic cells engulfment has anti-inflammatory consequences as IL6, MCP1/CCL2 and IL8 levels were dramatically reduced, CRT deficiency on apoptotic cells induces contrasted effects on cytokine productions, by increasing IL6 and MCP-1/CCL2 and decreasing IL8. We conclude that CRT exposed at the apoptotic cell surface led to an

up-regulation of the expression of IL6/MCP-1 and a down-regulation of IL8, thus suggesting that the global inflammatory response triggered by CRT is a complex equilibrium. Moreover, this should be dependent on the phagocytes differentiation. Interestingly MCP-1/CCL2 and IL6 which are among the most prevalent cytokines in the tumor microenvironment have been shown to promote survival of monocular cells and induce anti-inflammatory M2–type macrophage polarization [31]. Their down-regulation mediated by CRT exposed at the surface of dying cells could be in favor of a more efficient immunogenic response.

Remarkably, when apoptotic cells were opsonized by C1q, the CRT deficiency effects were greatly reduced, either on IL6 increase or on IL8 decrease. Besides, we showed that C1q modulated differentially IL6 and IL8 releases during phagocytosis of normal or CRT-deficient cells. Its anti-inflammatory effect is importantly higher on CRT-deficient cell concerning the IL6 release and on the contrary more efficient on normal cells for the IL8 release (Fig. 4), thus counterbalancing the effect of the CRT deficiency (Fig. 3).

This observation highlights the crucial role of C1q in tissues homeostasis, by controlling the inflammatory phagocyte status. How it is regulated, remains to be elucidated. However, in our opinion, a key element should be the C1q/PS/CRT partnership. Indeed, PS which is well known to be linked to the anti-inflammatory effects triggered by apoptotic cells [32], interacts with both CRT and C1q. Our previous study has suggested that surface CRT level could modulate C1q/PS binding, thus possibly modifying PS recognition by others phagocyte receptors and bridging molecules and consequently affecting the downstream signaling events.

In conclusion, our data emphasizes the dual role of C1q on uptake and on signaling events during the elimination of apoptotic cells. We are convinced that the versatile binding properties of C1q are a key element at the disposal of the phagocyte to integrate the subtle modifications which appear on its prey.

Acknowledgments **-** David Laurin and Caroline Aspord from EFS-Grenoble (Etablissement Français du Sang) for their help on cytokines detection. Françoise Lacroix from the IBS platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for assistance and access to the epifluorescence microscope facility. Sarah Ancelet for purification of C1q and its GR. We are grateful to Nicole Thielens for critical reading of the manuscript and for her helpful assistance.

FOOTNOTES

M.V. was supported by a PhD grant from University Joseph Fourier-Grenoble. R. A. and R.O. by PhD grants from provinces of South and North Lebanon, respectively.

References

1 Gaboriaud C, Frachet P, Thielens NM, Arlaud GJ: The human c1q globular domain: Structure and recognition of non-immune self ligands. Frontiers in immunology 2011;2:92.

2 Korb LC, Ahearn JM: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: Complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. J Immunol 1997;158:4525-4528.

3 Navratil JS, Watkins SC, Wisnieski JJ, Ahearn JM: The globular heads of c1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. J Immunol 2001;166:3231-3239.

4 Nayak A, Ferluga J, Tsolaki AG, Kishore U: The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent c1q. Immunol Lett 2010;131:139-150.

5 Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ: C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. J Immunol 2009;183:6175-6185.

6 Fraser DA, Pisalyaput K, Tenner AJ: C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. J Neurochem 2010;112:733-743.

7 Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS: Clearing the dead: Apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2013;5:a008748.

8 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Frachet P: How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. Critical reviews in immunology 2009;29:111-130.

9 Lu JH, Teh BK, Wang L, Wang YN, Tan YS, Lai MC, Reid KB: The classical and regulatory functions of c1q in immunity and autoimmunity. Cellular & molecular immunology 2008;5:9-21.

10 Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, Xu W, Schena FP, Daha MR, van Kooten C: Immune modulation of human dendritic cells by complement. Eur J Immunol 2007;37:2803-2811.

11 Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA, Tenner AJ: Complement protein c1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. J Immunol 2012;188:5682-5693.

12 Ghebrehiwet B, Hosszu KK, Valentino A, Peerschke EI: The c1q family of proteins: Insights into the emerging non-traditional functions. Frontiers in immunology 2012;3

13 Walport MJ, Davies KA, Botto M: C1q and systemic lupus erythematosus. Immunobiology 1998;199:265-285.

14 Trouw LA, Daha N, Kurreeman FA, Bohringer S, Goulielmos GN, Westra HJ, Zhernakova A, Franke L, Stahl EA, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Verduijn W, Roos A, Li Y, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, Toes RE: Genetic variants in the region of the c1q genes are associated with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 2013;173:76-83.

15 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P: C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. Journal of Immunology 2008;180:2329-2338.

16 Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, Gasque P: Cd46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. J Biol Chem 2005;280:36342-36354.

17 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Lunardi T, Arlaud GJ, Thielens NM, Frachet P: The lectin-like activity of human c1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition. FEBS Lett 2008;582:3111-3116.

18 Martin M, Leffler J, Blom AM: Annexin a2 and a5 serve as new ligands for c1q on apoptotic cells. J Biol Chem 2012;287:33733-33744.

19 Terrasse R, Tacnet-Delorme P, Moriscot C, Perard J, Schoehn G, Vernet T, Thielens NM, Di Guilmi AM, Frachet P: Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) proteins are both ligands of human c1q protein. J Biol Chem 2012;287:42620-42633.

20 Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, Ling WL, Arlaud GJ, Frachet P: Investigations on the c1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. J Mol Biol 2011;408:277-290.

21 Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, Johnson SJ, Winyard PG, Eggleton P: A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. J Mol Biol 2010;401:799-812.

22 Gerke V, Moss SE: Annexins: From structure to function. Physiol Rev 2002;82:331-371.

23 Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM: Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of lrp on the phagocyte. Cell 2005;123:321-334.

24 Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and cd91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med 2001;194:781-795.

25 Donnelly S, Roake W, Brown S, Young P, Naik H, Wordsworth P, Isenberg DA, Reid KB, Eggleton P: Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the c1q/calreticulin and cd91 pathway in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2006;54:1543-1556.

26 Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007;13:54-61.

27 Tacnet-Delorme P, Chevallier S, Arlaud GJ: Beta-amyloid fibrils activate the c1 complex of complement under physiological conditions: Evidence for a binding site for a beta on the c1q globular regions. J Immunol 2001;167:6374-6381.

28 Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P: Differences in the state of differentiation of thp-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin d3. J Leukoc Biol 1996;59:555-561.

29 Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. J Leukoc Biol 2002;71:950-956.

30 Varro R, Chen R, Sepulveda H, Apgar J: Bead-based multianalyte flow immunoassays: The cytometric bead array system. Methods Mol Biol 2007;378:125-152.

31 Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ: Ccl2 and interleukin-6 promote survival of human cd11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce m2-type macrophage polarization. J Biol Chem 2009;284:34342-34354.

32 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes tgf-beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest 2002;109:41-50.

Figure legends

Figure 1 : FRET study of C1qGR and CRT at the surface of apoptotic HeLa cells. FRET efficiency was estimated by photobleaching of the acceptor dye (Cy-3) on non-permeabilized cells incubated with C1qGR and immuno-labeled for CRT (Alexa-488) and C1qGR (Cy-3) as described *in materials and methods*. A, apoptotic cell without visible membrane bleb. B, apoptotic cell with characteristic membrane blebs. Regions used for the acceptor photobleaching and FRET analysis are shown. Bars 5 µm. Middle column; curves corresponding to the normalized fluorescence intensities of both dyes (Cy-3 in red, Alexa-488 in green) expressed as percent of the signal measured before the gradual photobleaching started (blue arrow). Right column; FRET efficiency (percent of acceptor fluorescence intensity increase) is expressed as a function of the percent of the normalized acceptor fluorescence intensity.

Figure 2 . Effect of CRT deficiency and of exogenous C1q on the uptake of early and late apoptotic cells. Early or late apoptotic HeLa cells labeled with CFSE, opsonized or not with C1q (25 µg/ml), were incubated with PMA-treated THP-1 cells at a ratio of 1:1 for 1 hour at 37 °C. THP-1 macrophages were labeled with an anti CD11c-PE antibody just prior to flow cytometry analysis. A, dot plot of a negative control phagocytosis performed at 4°C (negative control) and B, dot plot of the phagocytosis at 37°C (corresponding to late apoptotic CRT-deficient cells). Region in A and B shows macrophages that had engulfed HeLa cells (double labeled cells). C, Phagocytosis is expressed as the percent of the double labeled cells in the macrophage population (i.e. CD11c positive cells). Data are the mean ± SD of triplicate of a representative experiment of five.*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$, ANOVA one way test. siRNA ct and siRNA CRT, cells treated with control siRNA or siRNA specific for CRT, respectively (as described in *Materials and Methods*).

Figure 3 : Cytokines released from THP-1 macrophages during the uptake of CRT-deficient apoptotic cells. Cytokine production of PMA-treated THP-1 monocytes was analyzed using BDBiosciences Cytometric BeadArray in the supernatant of macrophages fed with early or late apoptotic cells deficient or not for CRT (siRNA CRT- or siRNA control- treated cells). When indicated early or late apoptotic cells were opsonized by C1q. Supernatants were collected 18 hours after the phagocytosis assay. Data are the average concentrations ±SD from measurements of three independent experiments. *, $p \leq 0.05$; Student's *t* test. Control cytokines level produced by THP1 alone or fed with viable cells are shown. Fold modulation of the cytokine released between siRNA CRT *versus* siRNA control conditions are reported when differences were statistically significant.

Figure. 4: C1q modulation of IL6 and IL8 released from macrophages during the uptake of apoptotic cells. Cytokine levels were measured by analysis of the supernatant of differentiated THP-1 macrophages and fed with early (IL6) or late (IL8) apoptotic cells as described in legend to figure 3. Selected results of fig. 3 are expressed as fold difference in cytokine concentration (A, IL6 and B, IL8) compared to control levels from phagocytes, which had ingested apoptotic cells in the absence of C1q. CRT+, siRNA control treated cells; CRT-, siRNA CRT treated cells. Data are plotted as average fold decreases ± SD from three experiments.*,$p \leq 0.05$ (C1q-treated levels vs control levels in the absence of C1q, Student's *t* test).

Fig. 1

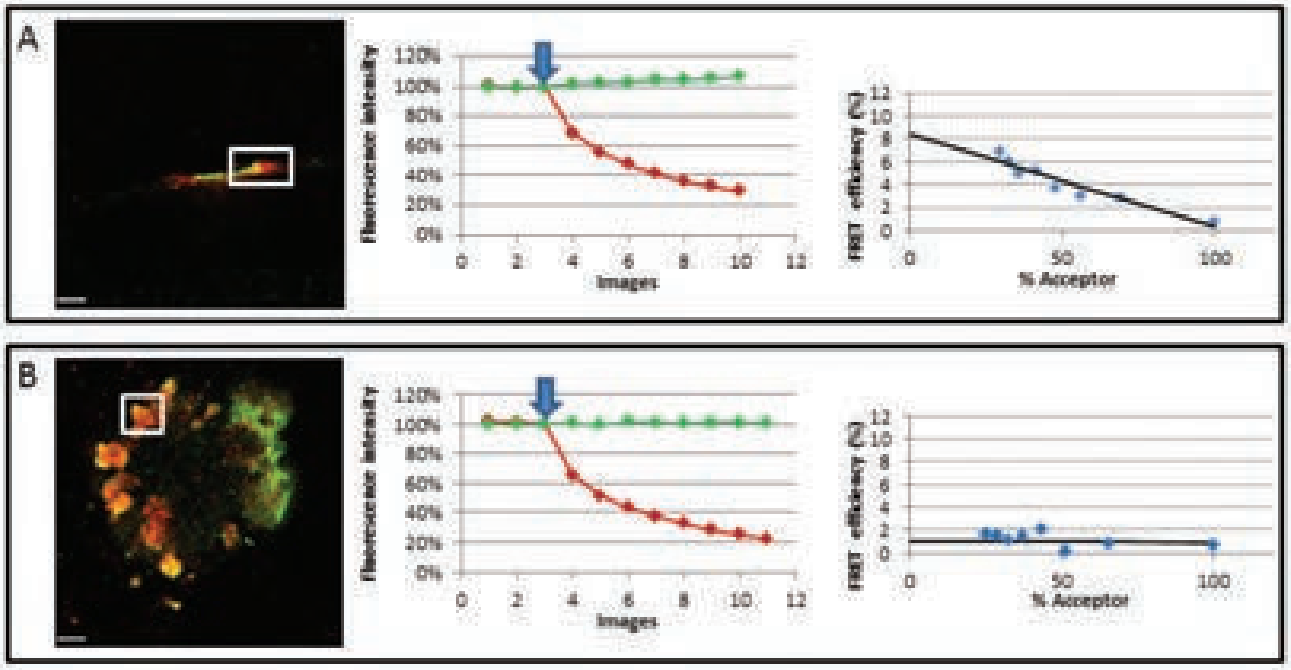

A
Fluorescence intensity
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
2
4
6
8
10
12
Images
FRET efficiency (%)
12
10
8
6
4
2
0
0
50
100
% Acceptor
B
Fluorescence intensity
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
2
4
6
8
10
12
Images
FRET efficiency (%)
12
10
8
6
4
2
0
0
50
100
% Acceptor

Figure 2

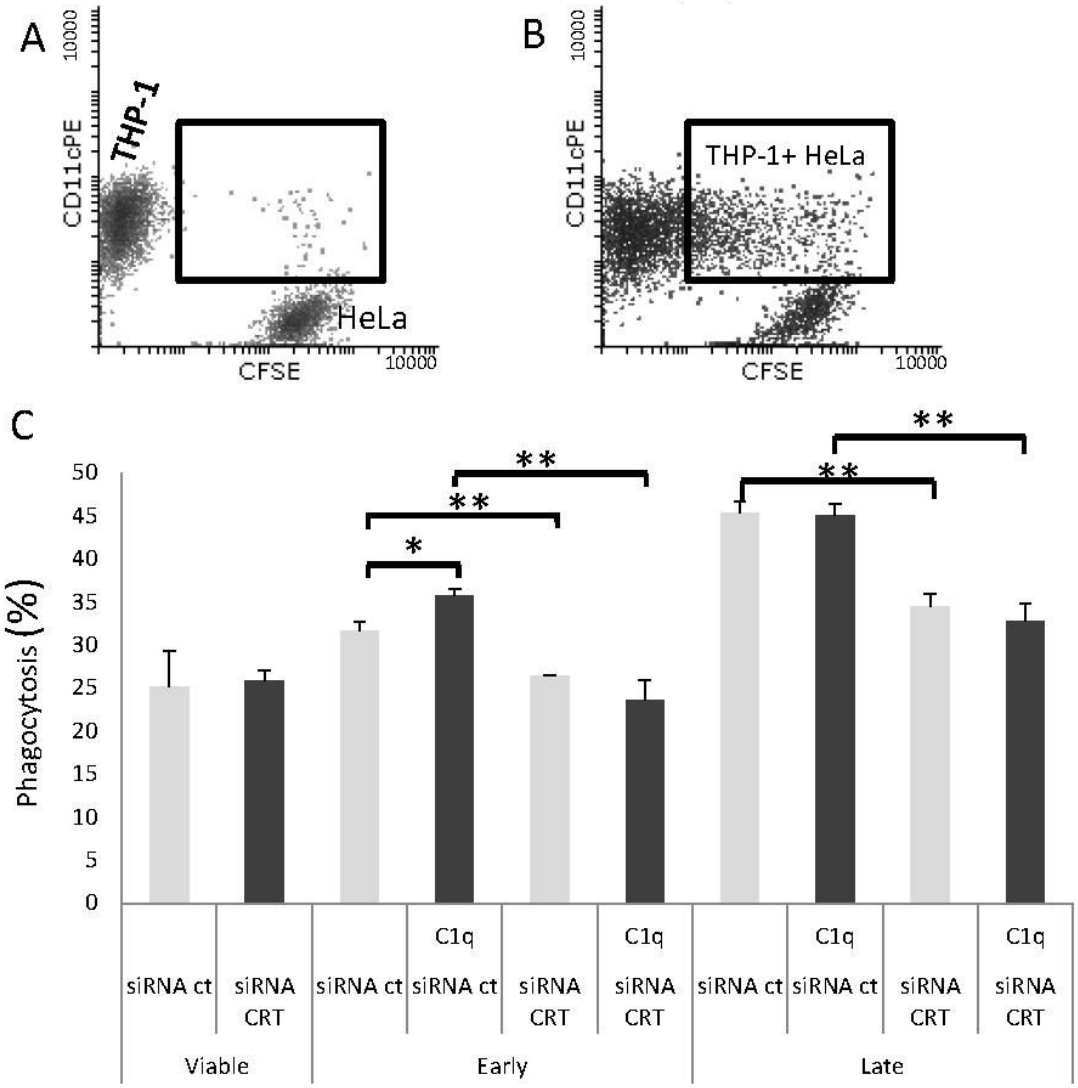
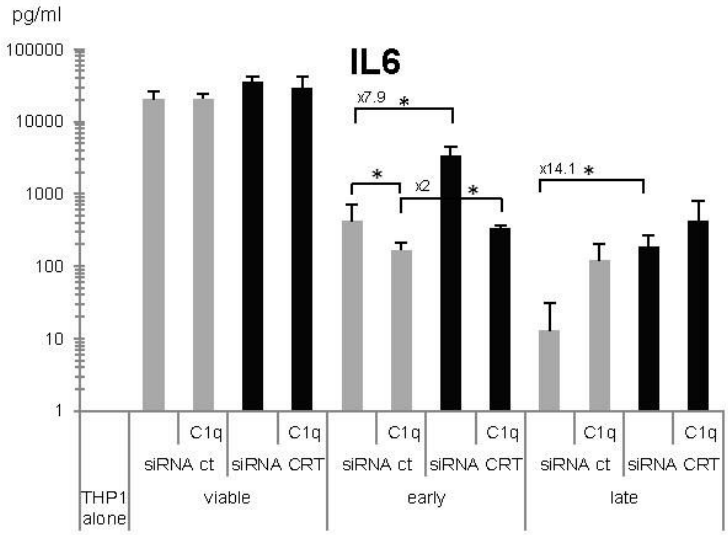
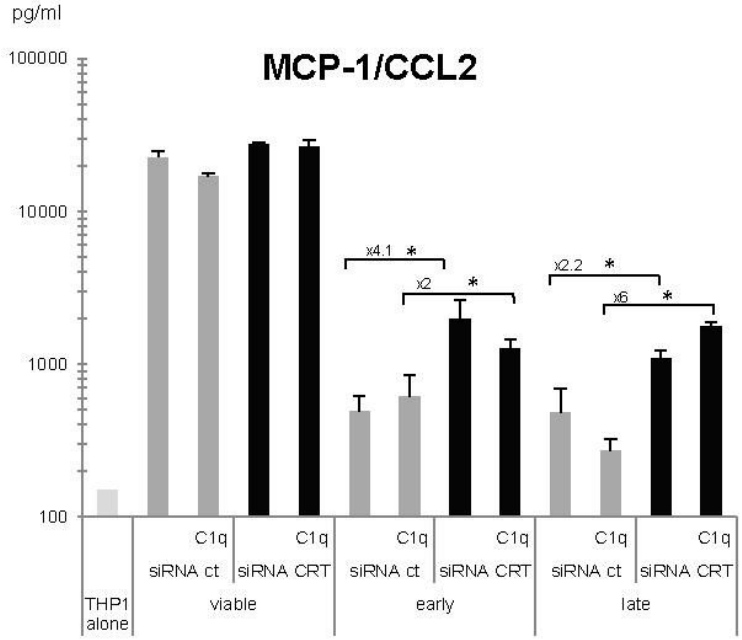

A
B
C
THP-1
HeLa
THP-1+ HeLa
CD11cPE
CFSE
10000
Phagocytosis (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
**
siRNA ct
siRNA CRT
C1q
Viable
Early
Late

Figure 3


pg/ml
IL6
100000
10000
1000
100
10
1
x7.9 *
*
x2
*
x14.1 *
C1q
siRNA ct
siRNA CRT
THP1 alone
viable
early
late


pg/ml
MCP-1/CCL2
100000
10000
1000
100
x4.1 *
x2 *
x2.2 *
x6 *
C1q
siRNA ct
siRNA CRT
THP1 alone
viable
early
late

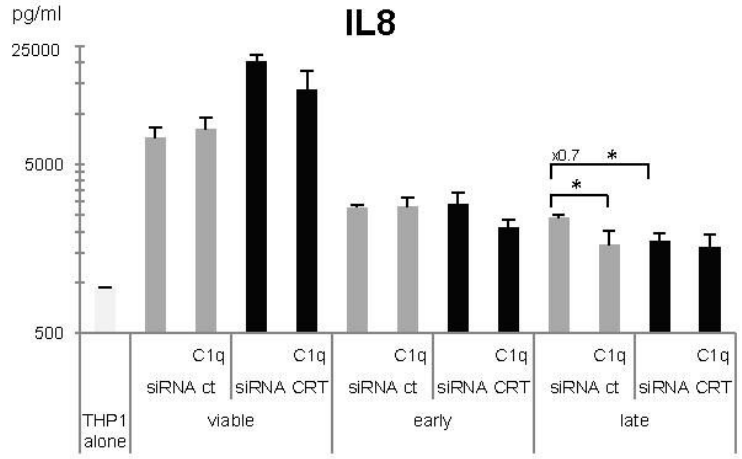
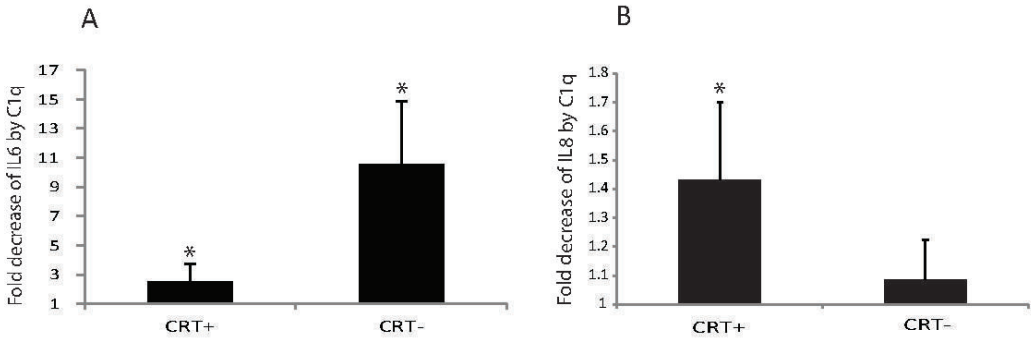

pg/ml
IL8
25000
5000
500
x0.7 *
*
C1q
siRNA ct
siRNA CRT
THP1 alone
viable
early
late

Figure 4


A
Fold decrease of IL6 by C1q
17
15
13
11
9
7
5
3
1
*
*
CRT+
CRT-
B
Fold decrease of IL8 by C1q
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1
*
CRT+
CRT-

Caractérisation des régulateurs d'ELMO : Identification des ligands du domaine polyproline d'ELMO

Résumé :

Le développement des organismes multicellulaires, la morphologie de leurs organes, la formation de connections nerveuses ou même la réponse immunitaire conduisent à la formation de cellules dont la mort a été programmée, ces cellules sont en apoptose. Les corps apoptotiques générés sont éliminés par phagocytose, que l'on peut ainsi considérer comme l'étape ultime du programme apoptotique. Cette élimination, assurée soit par des phagocytes professionnels ou des cellules environnantes est très efficace et peu de cellules en apoptose sont observées dans les différents tissus et organes. Deux familles de protéines, ELMO et DOCK, sont connues pour être au centre d'une voie de signalisation impliquée dans l'activation de la petite GTPase Rac et le remodelage du cytosquelette d'actine permettant l'internalisation de corps apoptotiques, mais la manière dont ELMO est activée par la reconnaissance des corps apoptotique reste largement méconnue. Récemment, ELMO a été identifiée comme cible de la kinase hématopoïétique Hck. La phosphorylation d'ELMO constitue un signal d'activation de la voie de phagocytose. Nous avons pu montrer que les domaines N et C-terminaux d'ELMO sont impliqués dans l'interaction avec le domaine SH3 de Hck. Contrairement au SH3 de DOCK180, l'interaction du domaine C-terminal avec le SH3 de Hck est strictement dépendante de la présence du polyproline. Les données obtenues sur les cellules transfectées suggère l'interaction *in cellulo* du motif polyproline avec le domaine SH3 de Hck. La différence dans le comportement du domaine C-terminal d'ELMO avec les deux SH3 nous a mené à identifier un complexe ternaire entre les trois protéines. Le motif polyproline d'ELMO est adjacent à l'une des 5 tyrosines phosphorylées par Hck, la tyrosine 720, nos résultats montrent que la phosphorylation de cette tyrosine défavorise l'interaction entre le domaine C-terminal et le SH3 de Hck. Cette phosphorylation pourrait être à l'origine d'un effet régulateur de Hck sur le complexe ELMO/DOCK180.

Mots clé : Phagocytose ; Signalisation ; ELMO ; Hck

Characterization of ELMO regulators : Identification of the polyproline motif of ELMO ligands

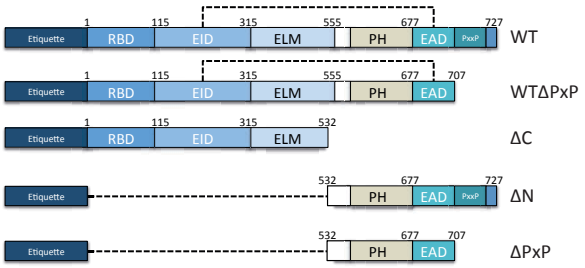
Abstract :

Multicellular organisms development, tissue organization and morphogenesis, nerve connection network or even immune response lead to programmed cell death or apoptosis. Phagocytosis is the mean for the engulfment of the apoptotic corpses and can thus be considered as the final step of the apoptotic pathway. Both non-professional and professional phagocytic cells are implicated to achieve an efficient clearance of the apoptotic cells and debris, and very little dead cells are actually present in tissues under normal circumstances, preventing secondary necrosis and further inflammation. Two family of proteins, ELMO and DOCK have been identified as major characters in the signaling pathway leading to the activation of the small GTPase Rac, and actin remodeling, that eventually leads to engulfment. Nevertheless, very little is yet known about the upstream events leading to ELMO activation. Recently, ELMO has been characterized as a target for the hematopoietic cell kinase Hck, and consequent phosphorylation participates in ELMO activation. In the course of the present work, we demonstrated that both N- and C-terminal domains of ELMO are binding the SH3 domain of Hck. In contrast with the SH3 domain of DOCK180, the SH3 domain of Hck binding to the C-terminal of ELMO is strictly dependent upon the polyproline motif. Our data obtained using transfected cells, further suggest the polyproline dependent interaction also occurs in cells. Taking into account the differential behavior of both SH3 domains from DOCK180 and Hck we next demonstrated a ternary complex formation between ELMO and both partners in vitro. Finally, we investigated the possible role for the Hck phosphorylation of Y720 located at the edge of the polyproline motif of ELMO and demonstrated that this phosphorylation clearly increases the Kd of ELMO/Hck interaction suggesting this phosphorylation could be part of a regulation loop in Hck dependent ELMO activation.

Keywords : Phagocytosis; Signalisation; ELMO; Hck

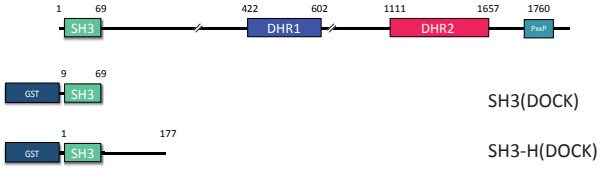
Liste des constructions usuelles

ELMO

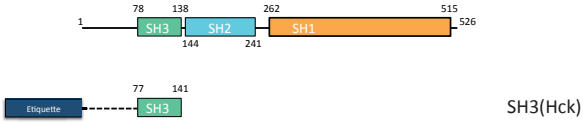


La fusion N-terminale (Etiquette) dépend du type de construction d'ELMO. His(6x) pour les expressions procaryotes, TAP-SNAP ou GFP pour les expressions eucaryotes

DOCK



Hck



La fusion N-terminale (Etiquette) pour Hck dépend du type de construction. GST pour les expressions procaryotes, CLIP ou mCherry pour les expressions eucaryotes

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Casette transporteur
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AKT : Serine / Thréonine protein kinase
ALPS : Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Amp : Ampicilline
ANP : Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate ester
Arf: ADP ribosylation factor
ArL : Arf Like protein
ARNO : ARF nucleotide binding site opener
ATP : Adenosine triphosphate
BAI1 : Brain specific angiogenesis inhibitor 1
BSA : Bovine Serum Albumin
C2 : Protein kinase C conserved region 2
CD : Cluster de différenciation
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog
CED : C.elegans cell Death
CHK : C-terminal Src kinase homologous kinase
CrkII : Cdc2 related kinase
Csk : C-terminal Src Kinase
C-ter : C-terminal
CV : column volume
Da : Dalton
DAD : Diapahanous Auto-regulatory Domain
Dbl : Diffuse B-Cell Lymphoma
DH: Dbl-Homology
DHR : DOCK Homology Region
Dia1 : Diaphanous formin 1
DID : Diaphanous Inhibitory Domain
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DO : Densité optique
DOCK : Downstream of CrkII ou Dedicator of cytokinesis
DTT : DiThioThréitol
E.coli: Escherichia Coli
EAD : ELMO Auto-regulatory Domain
EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : acide Ethylène Diamine TétraAcétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EID : ELMO Inhibitory Domain
ELM: Domaine ELMO
ELMO: Engulfment and cell Motility
EPHA3 : Ephrin type-A receptor 3
ERM: Ezrin Radixin Moesin
FACS: Fluoresence-Activated Cell Sorting
FAK: Focal Adhesion kinase
FL : Fluorescence
FSC : Forward Scatter
G418 : Généticine/néomycine
GAP : GTPase activating protein
GDI : G-nucleotide Dissociation Inhibitors
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GST : Gluthation -S-transférase
GTP : Guanosine Triphosphate
GULP : Engulfment adaptor protein
Hck : Hematopoeitic cell kinase
HEK : Human Embryonic Kidney cells
Hepes : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique .
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICAM3 : Intercellular Adhesion Molecule.
IPTG : Isoppropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
IRSp53 : Insulin Receptor Substrate
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif
JAK2 : Janus Kinase 2
Kan : Kanamycine
Kd : Constante d'affinité
LB : Lysogeny Broth
LIM : Protéine «Lin-1, Isl-1 Mec-3»
LIMK : LIM Kinase
LRP1 : Low density lipoprotein receptor –related protein 1
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MBC : MyoBlast City
MFG10 : Milk-Fat-Globule 10
MFG-E8 : Milk -Fat-Globule -EGF-factor 8
MLC : Myosin Light Chain
MLCK : Myosin Light Chain
Nef : Negative Regulatory Factor
NHS : N-Hydroxysuccinimide
NP-40 : Nonidet P-40
N-ter : N-terminal
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase chain reaction
PEP : Proline-enriched tyrosine phosphatase
PFA : Paraformaldéhyde
PH : Plekstrin Homology
PLC γ : Phospholipase C gamma
PS : Phosphatidylsérine
PSB : Partnership for Structural Biology
PtdIns : Phosphatidyl inositol
PtdSer : Phosphatidylsérine
PVDF : PolyVinylidene Di-Fuoride
PxP : Polyproline motif
Pyk2 : Proline-rich tyrosine kinase 2
Ras : Rat Sarcoma
RBD : Rho G binding Domain
Rho : Ras Homology
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
Rnd : Sous groupe de petites GTPases de la famille Rho
SCAR : Suppressor of cAR
SEC-MALLS : Size Exclusion Chromotography-Multi Angle Laser Light Scattering
SFK : SRC Family Kinases
SH2 : Src Homology domain 2
SH3 : Src Homology domain3
SHP1 : SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase
SLP-76 : SH2 domain-containing leukocyte protein 76
SPR : Surface Plasmon Resonance
SSC : Side Scatter
SVF : Sérum de veau fœtal
Syk : Spleen tyrosine kinase
TAE : Tris-acetate-EDTA
TAM : Tumor Associated Macrophage
TAP : Tandem Affinity Purification
TCPTP : T-cell protein tyrosine phosphatase
TEMED : NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TEV : Tobacco Etch Virus
TNT : Tris-Hcl, Nacl,Tween
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
UTP : Uridine Triphosphate
VAV-1 : GEF de la famille Vav (Dbl)
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP family Verpolin-homologous