



**HAL**  
open science

# Caractérisation des membres du clan arrestine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* : Etude de la protéine AdcA et de son partenaire FrmC

Clemence Habourdin

► **To cite this version:**

Clemence Habourdin. Caractérisation des membres du clan arrestine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* : Etude de la protéine AdcA et de son partenaire FrmC. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV074 . tel-01556042

**HAL Id: tel-01556042**

**<https://theses.hal.science/tel-01556042v1>**

Submitted on 4 Jul 2017

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Clémence HABOURDIN**

Thèse dirigée par **Laurence AUBRY**

préparée au sein du **Laboratoire Biologie à Grande Échelle**  
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

### **Caractérisation des membres du clan arrestine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* :**

#### **Étude de la protéine AdcA et de son partenaire FrmC**

Thèse soutenue publiquement le **27 Octobre 2014**  
devant le jury composé de :

**Mr Franz BRUCKERT**

Professeur, Université de Grenoble (Président)

**Mr Pierre COSSON**

Professeur, Université de Genève (Rapporteur)

**Mr Sébastien LEON**

CR1-CNRS, Université Paris Diderot (Rapporteur)

**Mme Laurence AUBRY**

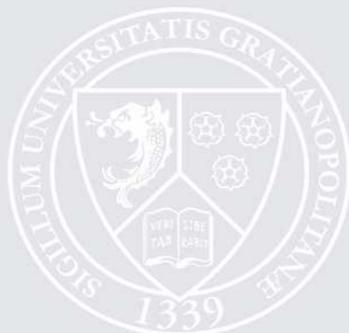
CR1-CNRS, Université de Grenoble (Membre)

**Mme Élisabeth KAY**

CR1-CNRS, Université Lyon 1 (Membre)

**Mr Rémy SADOUL**

Professeur, Université de Grenoble (Membre)





## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Clémence HABOURDIN**

Thèse dirigée par **Laurence AUBRY**

préparée au sein du **Laboratoire Biologie à Grande Échelle**  
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

### **Caractérisation des membres du clan arrestine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* :**

#### **Étude de la protéine AdcA et de son partenaire FrmC**

Thèse soutenue publiquement le **27 Octobre 2014**  
devant le jury composé de :

**Mr Franz BRUCKERT**

Professeur, Université de Grenoble (Président)

**Mr Pierre COSSON**

Professeur, Université de Genève (Rapporteur)

**Mr Sébastien LEON**

CR1-CNRS, Université Paris Diderot (Rapporteur)

**Mme Laurence AUBRY**

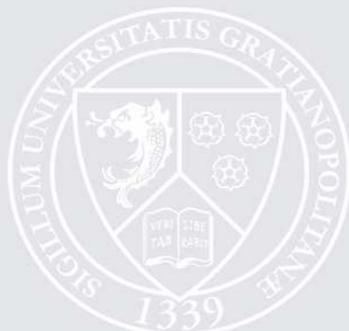
CR1-CNRS, Université de Grenoble (Membre)

**Mme Élisabeth KAY**

CR1-CNRS, Université Lyon 1 (Membre)

**Mr Rémy SADOUL**

Professeur, Université de Grenoble (Membre)





## Remerciements

*Je souhaiterais tout d'abord remercier l'école doctorale Chimie et Sciences pour le Vivant de Grenoble pour m'avoir attribuée une bourse de thèse ministérielle ainsi que le laboratoire de Biologie à Grande Echelle et son directeur Jérôme Garin pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe OdyCell durant ces 3 années de thèse. Je remercie également les membres de mon jury, Sébastien Léon, Pierre Cosson, Rémy Sadoul, Franz Bruckert et Elisabeth Kay, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.*

*Un grand merci à mon équipe qui m'a suivi tout au long de mon travail, Agnès Journet, Ludovic Pelosi, Lauriane Mas et particulièrement Gérard Klein et ma directrice de thèse Laurence Aubry qui m'ont apporté tellement de choses... et m'ont fait partager leurs connaissances et leurs techniques et astuces expérimentales.*

*Je tiens à remercier profondément Laurence qui a su me faire confiance et qui m'a permis de m'approprier mon projet de recherche et d'accomplir tout ce travail. Elle a su me comprendre et me soutenir dans les moments de joie et de réussite et d'autant plus dans les périodes difficiles. Son encadrement et son soutien ont été bien au delà de mes espérances et en dehors d'une directrice de thèse, j'ai fait la connaissance d'une fantastique personne, intègre, loyale, passionnée, perfectionniste, amusante et j'en passe ! Comment décrire ces 3 années passées à tes côtés Laurence, en quelques lignes...*

*Un merci particulier aussi à « Gégé » pour tout ce qu'il m'a appris avec pédagogie, accompagnée d'une pointe de paternalisme naturel et sûrement aussi pas mal de patience... Merci Gérard pour ton soutien malgré nos caractères parfois bien opposés !*

*Enfin, merci également aux personnes qui ont participé à ce travail ou qui m'ont aidé, notamment Véronique Collin pour son encadrement au cours des manips de FACS, Didier Grunwald pour son aide en microscopie, l'équipe EdyP, en particulier Johann Coute, Mathieu Baudet et Sylvie Kieffer-Jacquinet, Léa Tavernier et Nicolas Crespo qui ont travaillé sur mon projet pendant leur stage et à mes différents collaborateurs notamment François Letourneur.*



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	1
<b>PARTIE 1 : LES ARRESTINES, DES ADAPTATEURS MULTIFONCTIONNELS</b> .....	1
I. LES PROTÉINES DU CLAN « ARRESTINE » .....	1
<b>1. La découverte des premiers membres du clan arrestine</b> .....	1
<b>2. Le répertoire des arrestines visuelles et <math>\beta</math>-arrestines</b> .....	3
<b>3. Des arrestines conventionnelles au clan arrestine</b> .....	5
II. LES ARRESTINES CONVENTIONNELLES .....	7
<b>1. Structure des arrestines conventionnelles</b> .....	7
<b>2. Fonctions des arrestines conventionnelles</b> .....	9
2.1. Rôle des arrestines dans la régulation de cargos membranaires .....	11
2.1.1. Régulation des RCPGs .....	11
2.1.2. Régulation d'autres types de récepteurs .....	25
2.2. Rôle des arrestines dans la régulation de voie de signalisation .....	27
2.2.1. Activation des petites protéines G par les $\beta$ -arrestines .....	29
2.2.2. Régulation des voies MAPK par les arrestines .....	31
2.2.3. Régulation de la voie PI <sub>3</sub> K-Akt par les arrestines .....	33
2.3. Régulation du cytosquelette par les arrestines .....	35
2.4. Régulation de la transcription par les arrestines .....	35
<b>3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des arrestines</b> .....	39
3.1. Modifications post-traductionnelles .....	39
3.1.1. Ubiquitination .....	39
3.1.2. Sumoylation .....	43
3.1.3. Phosphorylation .....	43
3.1.4. Nitrosylation .....	45
3.2. Oligomérisation .....	47
III. LES ARRESTINES NON CONVENTIONNELLES .....	51
<b>1. Caractéristiques des arrestines non conventionnelles</b> .....	51
<b>2. Fonctions des arrestines non conventionnelles</b> .....	53
2.1. Les arrestines non conventionnelles, des protéines d'échafaudage .....	55
2.1.1. Recrutement d'acteurs du trafic vésiculaire .....	55
2.1.2. Recrutement d'acteurs de la machinerie d'ubiquitination .....	57
2.2. Les arrestines non-conventionnelles régulent des cargos membranaires divers .....	59
2.2.1. Régulation de transporteurs de la membrane plasmique .....	59
2.2.2. Régulation de RCPGs .....	63
2.2.3. Régulation d'autres cargos membranaires .....	65
2.2.4. Quels signaux de reconnaissance pour la prise en charge des cargos membranaires ? .....	67
2.3. Autres rôles des arrestines non conventionnelles .....	71
<b>3. Régulation des arrestines non-conventionnelles</b> .....	73
3.1. Par ubiquitination .....	73
3.2. Par phosphorylation .....	75
3.3. Régulation du fonctionnement des arrestines par hétéro-oligomérisation ? .....	79

<b>PARTIE 2 : L'AMIBE <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i></b> .....	81
I. GÉNÉRALITÉS .....	81
1. Cycle de vie de l'organisme .....	81
2. Les atouts et intérêts du modèle .....	83
II. LE RÉPERTOIRE ARRESTINE DE <i>DICTYOSTELIUM</i> .....	85
1. Identification des membres du clan arrestine de <i>Dictyostelium</i> .....	85
2. La protéine AdcA de <i>Dictyostelium</i> .....	86
<b>PARTIE 3 : OBJECTIF DU TRAVAIL DE THÈSE</b> .....	87
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	91
<b>PARTIE 1 : ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE ADCÀ EN CONDITION DE STRESS</b> .....	91
I. ADCÀ EST UN ÉLÉMENT DE RÉPONSE AU STRESS CHEZ <i>DICTYOSTELIUM</i> .....	91
1. Optimisation du protocole expérimental pour l'étude de la réponse d'AdcA en condition de stress .....	91
2. Caractérisation de la réponse d'AdcA au stress hyper-osmotique .....	93
2.1. AdcA est modifiée de façon transitoire en situation de choc hypertonique .....	93
2.2. AdcA est modifiée par phosphorylation .....	95
2.3. La réponse d'AdcA est dose-dépendante .....	97
3. AdcA répond à différents types de stress .....	97
II. CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE EN CONDITIONS VÉGÉTATIVES .....	99
1. Données bibliographiques .....	101
2. Effet du stress hyper-osmotique sur les cellules végétatives .....	103
2.1. L'hyper-osmolarité affecte la morphologie des cellules .....	103
2.2. L'hyper-osmolarité conduit à un arrêt de l'activité endocyttaire .....	105
2.3. L'hyper-osmolarité conduit à la restructuration du réseau d'actine .....	107
2.4. L'hyper-osmolarité conduit à l'activation du facteur de transcription STATc .....	107
III. RECHERCHE DES SIGNAUX ET VOIES DE SIGNALISATION CONTRÔLANT LA RÉPONSE D'ADCÀ .....	109
1. La phosphorylation d'AdcA implique de nouvelles cascades de signalisation .....	111
1.1. La réponse d'AdcA n'est pas dépendante de la voie Doka-AMPC .....	111
1.2. AdcA est partiellement phosphorylée par une augmentation concomitante de GMPc et de calcium .....	111
1.3. La phosphorylation d'AdcA n'est pas sous le contrôle des protéines Erk1, Erk2, MEK1, SAPK, GbpC, Pyk3 ou Phg2 .....	113
2. Une chute du pH cytosolique conduit à une phosphorylation rapide et massive d'AdcA .....	115
3. AdcA répond à un remaniement du réseau d'actine .....	117
4. La déphosphorylation d'AdcA implique le facteur de transcription STATc .....	119
4.1. L'invalidation de STATc affecte la déphosphorylation d'AdcA .....	121
4.2. L'invalidation de STATc retarde la récupération cellulaire .....	123
IV. QUEL RÔLE POUR ADCÀ DANS LA RÉPONSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE ? .....	123
1. L'invalidation d'AdcA n'affecte pas la résistance au stress hyper-osmotique .....	123

<b>2. Recherche des sites de phosphorylation d'AdcA</b> .....	125
2.1. <i>AdcA est phosphorylée sur son domaine N-terminal</i> .....	125
2.2. <i>Recherche des sites de phosphorylation par spectrométrie de masse</i> .....	127
<b>3. Étude préliminaire de l'effet de mutants de phosphorylation d'AdcA</b> .....	129
V. DISCUSSION .....	131
<b>1. Adaptation des cellules végétatives au stress hyper-osmotique</b> .....	133
<b>2. Du signal extracellulaire à la phosphorylation d'AdcA : quels acteurs dans la cascade de signalisation ?</b> .....	135
<b>3. La déphosphorylation de AdcA : quel rôle pour le facteur de transcription STATc ?</b> .....	139
<b>4. Quel(s) rôle(s) pour la protéine AdcA ?</b> .....	139
<b>5. AdcA, un membre atypique du clan arrestine</b> .....	143
<b>PARTIE 2 : ÉTUDE FONCTIONNELLE D'UN PARTENAIRE D'ADCA, LA PROTÉINE FRMC</b> .....	147
I. ÉTUDE <i>IN SILICO</i> DE LA PROTÉINE FRMC .....	147
<b>1. Caractéristiques structurales de la protéine FrmC</b> .....	147
1.1. <i>Le domaine FERM</i> .....	147
1.2. <i>Le domaine LRR</i> .....	151
1.3. <i>Le domaine amino-terminal de FrmC</i> .....	151
<b>2. Homologues de la protéine FrmC</b> .....	153
II. CONSTRUCTION D'OUTILS POUR L'ÉTUDE DE LA PROTÉINE FRMC .....	153
<b>1. Production d'anticorps dirigés contre FrmC</b> .....	153
1.1. <i>Obtention d'anticorps dirigés contre le domaine N-terminal de FrmC</i> .....	153
1.1.1. <i>Expression du domaine GSTFrmC<sup>1-334</sup> utilisé comme immunogène</i> .....	153
1.1.2. <i>Purification des anticorps dirigés contre FrmC<sup>1-334</sup></i> .....	155
1.2. <i>Obtention d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale de FrmC</i> .....	155
<b>2. Élaboration de mutants invalidés pour frmC</b> .....	157
2.1. <i>Construction génétique</i> .....	157
2.2. <i>Validation des mutants frmC nuls</i> .....	157
III. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ADCA/FRMC .....	159
<b>1. Validation de l'interaction AdcA/FrmC</b> .....	159
<b>2. Caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction</b> .....	159
2.1. <i>Domaine(s) d'AdcA impliqué(s) dans l'interaction</i> .....	161
2.2. <i>Domaine(s) de FrmC impliqué(s) dans l'interaction</i> .....	161
<b>3. Conclusions</b> .....	163
IV. ÉTUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE FRMC .....	163
<b>1. Expression temporelle de FrmC</b> .....	165
<b>2. FrmC est associée à la membrane plasmique</b> .....	165
2.1. <i>Fractionnement subcellulaire</i> .....	165
2.2. <i>Détermination de la localisation subcellulaire de FrmC par microscopie</i> .....	165
<b>3. Contribution de l'actine dans la localisation de FrmC</b> .....	167
3.1. <i>Le domaine FERM de FrmC interagit avec l'actine in vitro</i> .....	167
3.2. <i>La localisation de FrmC est indépendante de l'actine</i> .....	169
<b>4. FrmC interagit avec des phosphoinositides</b> .....	169
<b>5. Contribution des domaines de FrmC dans sa localisation</b> .....	171
<b>6. Conclusions</b> .....	171
V. FRMC EST IMPLIQUÉE DANS LE PROCESSUS D'ADHÉSION .....	173
<b>1. Les cellules <i>frmC</i> ne sont pas affectées dans leur croissance</b> .....	173

2. L'activité endocytaire n'est pas altérée en l'absence de FrmC .....	173
3. Le mutant <i>frmC</i> n'est pas affecté dans son développement .....	175
4. Les mutants de FrmC présentent un défaut d'adhésion .....	175
4.1. Étude de la capacité d'adhésion .....	177
4.2. Étude de l'adhésion précoce par microscopie RICM .....	179
4.3. Les défauts d'adhésion des mutants de <i>frmC</i> ne sont pas liés à une désorganisation du cytosquelette d'actine .....	181
4.4. <i>FrmC</i> n'est pas impliquée dans la migration cellulaire .....	181
4.5. La protéine <i>AdcA</i> ne participe pas directement à l'adhésion cellulaire .....	183
VI. FRMC ET LA RÉPONSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE .....	185
1. L'interaction entre <i>AdcA</i> et <i>FrmC</i> est maintenue en stress hyper-osmotique .....	185
2. <i>FrmC</i> répond au stress hyper-osmotique par translocation dans la fraction Triton X-100 insoluble .....	185
3. <i>FrmC</i> participe à la réponse cellulaire en situation de stress hyper-osmotique .....	187
3.1. L'invalidation de <i>frmC</i> ralentit la récupération cellulaire .....	187
3.2. L'absence de <i>FrmC</i> modifie les réponses d' <i>AdcA</i> et de <i>STATc</i> .....	187
VII. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE LA PROTÉINE FRMC .....	189
1. <i>FrmC</i> est capable de former des oligomères .....	191
2. Recherche de nouveaux partenaires de <i>FrmC</i> .....	193
2.1. <i>FrmC</i> n'interagit pas avec les protéines d'adhésion <i>SibA</i> , <i>SibB</i> et <i>SibC</i> .....	193
2.2. Recherche de partenaires par co-immunoprécipitation .....	195
VIII. DISCUSSION .....	197
1. <i>FrmC</i> , un nouvel acteur dans le processus d'adhésion .....	199
2. <i>FrmC</i> , une véritable plateforme d'interaction .....	201
2.1. Des partenaires variés .....	203
2.2. Une auto-régulation de <i>FrmC</i> par repliement de la protéine ? .....	205
3. Quel rôle pour le couple <i>AdcA/FrmC</i> ? .....	205
<b>CONCLUSIONS – PERSPECTIVES</b> .....	211
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	215
I. MATÉRIELS .....	215
1. Instruments .....	215
2. Réactifs .....	215
3. Plasmides .....	217
3.1. Constructions d'expression et d'invalidation chez <i>Dictyostelium</i> réalisées au cours de ce travail .....	217
3.2. Constructions d'expression chez <i>Dictyostelium</i> générées au laboratoire .....	217
3.3. Constructions d'expression chez <i>Dictyostelium</i> obtenues de la communauté <i>Dictyostelium</i> .....	218
3.4. Constructions d'expression en bactéries réalisées au cours de ce travail .....	218
4. Souches .....	218
4.1. Souches de <i>Dictyostelium</i> .....	218
4.2. Souches bactériennes .....	219
5. Anticorps .....	220
5.1. Utilisation en immunofluorescence .....	220
5.2. Utilisation en Western blot .....	220

II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	221
<b>1. Sous-clonage</b> .....	221
<b>2. Préparation de bactéries compétentes d'<i>E. coli</i></b> .....	221
<b>3. Extraction d'acides nucléiques de <i>Dictyostelium</i></b> .....	222
3.1. <i>Extraction d'ADN génomique de Dictyostelium</i> .....	222
3.2. <i>Extraction d'ARN totaux de Dictyostelium</i> .....	222
<b>4. Southern blot</b> .....	222
III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE .....	223
<b>1. Culture cellulaire</b> .....	223
<b>2. Transformation de <i>Dictyostelium</i> et clonage des cellules</b> .....	224
<b>3. Fractionnement subcellulaire</b> .....	224
<b>4. Microscopie</b> .....	225
4.1. <i>Imagerie sur cellules non fixées</i> .....	225
4.2. <i>Imagerie sur cellules fixées</i> .....	225
<b>5. Tests de conditions de stress sur cellules de <i>Dictyostelium</i></b> .....	226
5.1. <i>Protocole « erlen »</i> .....	226
5.2. <i>Protocole « tube »</i> .....	226
<b>6. Développement multicellulaire</b> .....	227
<b>7. Mesure de l'activité endocyttaire</b> .....	227
7.1. <i>Pinocytose</i> .....	227
7.2. <i>Phagocytose</i> .....	227
<b>8. Adhésion</b> .....	228
8.1. <i>RICM</i> .....	228
8.2. <i>Adhésion en boîte</i> .....	228
<b>9. Étude de la motilité cellulaire</b> .....	229
9.1. <i>Motilité exploratoire</i> .....	229
9.2. <i>Chimiotactisme</i> .....	229
<b>10. Suivi de la réponse au stress par mesure de la densité optique</b> .....	229
IV. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE .....	230
<b>1. Analyse des protéines</b> .....	230
1.1. <i>Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide</i> .....	230
1.2. <i>Coloration des protéines</i> .....	230
1.2.1. <i>Coloration au bleu de Coomassie</i> .....	230
1.2.2. <i>Coloration au nitrate d'argent</i> .....	230
1.3. <i>Western blot</i> .....	231
<b>2. Purification de protéines recombinantes en bactéries</b> .....	231
2.1. <i>Test d'expression des protéines recombinantes</i> .....	232
2.2. <i>Purification de protéines recombinantes</i> .....	232
<b>3. Production et purification d'anticorps</b> .....	233
<b>4. Déphosphorylation des protéines à la phosphatase alcaline</b> .....	233
<b>5. Co-immunoprécipitation</b> .....	233
<b>6. Préparation de fraction Triton X-100 insoluble</b> .....	234
<b>7. Préparation de cytosol de <i>Dictyostelium</i></b> .....	235
<b>8. Test d'interaction protéines/phospholipides (<i>lipid blot overlay</i>)</b> .....	235
<b>9. Essais de co-sédimentation avec l'actine-F</b> .....	235
<b>10. Test de <i>pull-down</i></b> .....	236
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	237
<b>ANNEXES</b> .....	265
<b>Annexe 1 : Séquence de la protéine AdcA</b> .....	265
<b>Annexe 2 : Séquence de la protéine FrmC</b> .....	267
<b>Article Publié Dans <i>Cell Communication and signalling</i></b> .....	273



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

**INTRODUCTION****PARTIE 1 : LES ARRESTINES, DES ADAPTATEURS MULTIFONCTIONNELS**

Figure 1 : Aligement des séquences des arrestines visuelles et $\beta$ -arrestines humaines .....	2
Figure 2 : Arbres phylogénétiques des membres du clan arrestine identifiés chez <i>H sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. discoideum</i> , <i>D. melonagaster</i> et <i>C. elegans</i> .....	4
Figure 3 : Organisation structurale des arrestines .....	6
Figure 4 : Régulation des RCPGs par les arrestines .....	10
Figure 5 : Sites d'interaction des arrestines .....	12
Figure 6 : Changements conformationnels induits par l'activation de la $\beta$ -arrestine 1 .....	12
Figure 7 : Trafic des RCPGs le long de la voie endocytaire .....	20
Figure 8 : Régulation du devenir des RCPGs de classe A et de classe B .....	22
Figure 9 : Rôle des arrestines dans la signalisation cellulaire .....	28
Figure 10 : Régulation des voies MAPKs par les arrestines .....	30
Figure 11 : Régulation de la transcription génique par les $\beta$ -arrestines .....	36
Figure 12 : Régulation des arrestines par modifications post-traductionnelles .....	38
Figure 13 : Régulation de la fonction des arrestines par oligomérisation .....	48
Figure 14 : Structure schématique des arrestines conventionnelles et non conventionnelles présentes chez l'homme et la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	52
Figure 15 : Séquence du motif de liaison à la clathrine de TXNIP .....	54
Figure 16 : Interaction de ARRDC-1 avec la machinerie ESCRT .....	56
Figure 17 : Implication des arrestines non conventionnelles de <i>S. cerevisiae</i> dans la régulation de cargos membranaires .....	58
Figure 18 : Différents rôles de TXNIP dans la régulation du transporteur GLUT1 .....	62
Figure 19 : Régulation de récepteur $\beta$ 2-adrénergique par la $\beta$ -arrestine 2 et ARRDC-3 .....	64
Figure 20 : Régulation de la signalisation pH-dépendante chez <i>A. nidulans</i> .....	70
Figure 21 : Régulation du transporteur Jen1 chez <i>S. cerevisiae</i> .....	74
Figure 22 : Régulation du récepteur Notch par les $\beta$ -arrestines et ARRDC-1 .....	78
Tableau 1 : Exemples de protéines de surface n'appartenant pas à la famille des RCPGs conventionnels régulées par les arrestines .....	26
Tableau 2 : Membres du clan arrestine chez différents organismes ( <i>H. sapiens</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>C. elegans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. discoideum</i> et <i>A. nidulans</i> ) .....	50

**PARTIE 2 : L'AMIBE *Dictyostelium discoideum***

Figure 23 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes .....	80
Figure 24 : Cycle de développement de l'organisme <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	82
Figure 25 : Représentation schématique des arrestines non conventionnelles de <i>Dictyostelium</i> .....	84
Figure 26 : Séquence et organisation multi-modulaire de la protéine AdcA .....	86
Figure 27 : AdcA est localisée sur les compartiments endocytaires .....	88

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### PARTIE 1 : ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE ADC A EN CONDITION DE STRESS

Figure 28 : AdcA répond au stress hyper-osmotique.....	92
Figure 29 : AdcA répond au stress hyper-osmotique par phosphorylation.....	94
Figure 30 : La réponse d'AdcA au stress hyper-osmotique est dose-dépendante.....	96
Figure 31 : AdcA répond à des stress variés.....	96
Figure 32 : AdcA est phosphorylée suite à un stress hyper-osmotique en condition de carence.....	98
Figure 33 : Voies de signalisation activées en stress hyper-osmotique en condition de carence : données bibliographiques.....	100
Figure 34 : Changements morphologiques cellulaires engendrés par un stress hyper-osmotique.....	102
Figure 35 : Macropinocytose en condition de stress hyper-osmotique.....	104
Figure 36 : Corrélation entre la phosphorylation d'AdcA et la phase de latence de l'activité endocyttaire en condition de stress hyper-osmotique.....	104
Figure 37 : Impact d'un stress hyper-osmotique sur l'organisation de l'actine.....	106
Figure 38 : STATc est activée par un stress hyper-osmotique en conditions végétatives.....	106
Figure 39 : Réponse cellulaire en conditions de stress hyper-osmotique.....	108
Figure 40 : La phosphorylation d'AdcA n'est pas dépendante de la voie DokA/AMPc.....	110
Figure 41 : La réponse d'AdcA n'est pas strictement dépendante d'une voie GMPc- ou calcium- dépendante..	110
Figure 42 : Réponse d'AdcA dans différents contextes mutants pour des protéines kinases.....	112
Figure 43 : Une diminution du pH intracytosolique permet la phosphorylation d'AdcA.....	114
Figure 44 : Les stress conduisant à la phosphorylation d'AdcA entraînent également un arrondissement cellulaire.....	116
Figure 45 : La dépolymérisation du cytosquelette d'actine conduit à la phosphorylation d'AdcA et de STATc.....	116
Figure 46 : La déphosphorylation d'AdcA est partiellement dépendante du facteur de transcription STATc.....	120
Figure 47 : La récupération de l'activité endocyttaire en condition de stress hyper-osmotique est retardée en l'absence de STATc.....	122
Figure 48 : Analyse phénotypique du mutant <i>adcA</i> en condition de stress hyper-osmotique.....	122
Figure 49 : AdcA est phosphorylée sur son domaine N-terminal.....	124
Figure 50 : AdcA est phosphorylée sur plusieurs sérines.....	126
Figure 51 : Localisation subcellulaire des mutants d' <i>adcA</i> .....	128
Figure 52 : Modèle de la réponse au stress hyper-osmotique chez <i>Dictyostelium</i> .....	140
Tableau 3 : Analyse phénotypique des mutants d' <i>adcA</i> .....	128

### PARTIE 2 : ÉTUDE FONCTIONNELLE D'UN PARTENAIRE D'ADCA, LA PROTÉINE FRMC

Figure 53 : Représentation schématique des séquences nucléique et protéique de la protéine FrmC.....	146
Figure 54 : Caractéristiques du domaine FERM de FrmC.....	148
Figure 55 : Représentation schématique des protéines à domaine FERM de <i>Dictyostelium</i> .....	150
Figure 56 : Domaine LRR de FrmC.....	150
Figure 57 : Structure secondaire du domaine N-terminal de FrmC.....	152
Figure 58 : Génération d'anticorps anti-FrmC <sup>1-334</sup> .....	154
Figure 59 : Obtention d'anticorps anti-peptides.....	154
Figure 60 : Construction de mutants <i>frmC</i> .....	156
Figure 61 : Validation de l'interaction AdcA/FrmC.....	158
Figure 62 : Domaine(s) d'AdcA interagissant avec FrmC.....	160
Figure 63 : Domaine(s) d'interaction de FrmC interagissant avec AdcA.....	162
Figure 64 : Le domaine GST-FrmC <sup>1-334</sup> purifié interagit avec AdcA.....	164
Figure 65 : Expression temporelle de FrmC.....	164
Figure 66 : Localisation subcellulaire de FrmC.....	166
Figure 67 : La localisation de FrmC est indépendante de l'actine-F.....	168

Figure 68 : FrmC interagit avec des phosphoinositides .....	168
Figure 69 : Localisation des domaines de FrmC .....	170
Figure 70 : Croissance des cellules <i>frmC</i> .....	172
Figure 71 : Activité endocyttaire des cellules <i>frmC</i> .....	172
Figure 72 : Les mutants de <i>frmC</i> présentent un défaut d'adhésion .....	176
Figure 73 : Activité phagocytaire des mutants de surexpression de <i>frmC</i> .....	176
Figure 74 : Étude de l'adhésion précoce des mutants de <i>frmC</i> par RICM.....	178
Figure 75 : Intégrité du cytosquelette d'actine dans le mutant <i>frmC</i> .....	180
Figure 76 : Motilité des mutants <i>frmC</i> nuls .....	182
Figure 77 : Capacité d'adhésion des cellules <i>adcA</i> .....	182
Figure 78 : L'interaction AdcA/FrmC est maintenue en stress hyper-osmotique.....	184
Figure 79 : Localisation de FrmC en condition de stress hyper-osmotique.....	184
Figure 80 : FrmC participe à la récupération cellulaire face au stress hyper-osmotique .....	186
Figure 81 : FrmC forme des oligomères .....	190
Figure 82 : Interaction intramoléculaire de FrmC.....	192
Figure 83 : Co-immunoprécipitation de FERM <sub>GFP</sub> .....	194
Figure 84 : Partenaires protéiques et lipidiques identifiés ou potentiels de la protéine FrmC.....	202
Figure 85 : Proposition de modèle du mécanisme de fonctionnement du couple AdcA/FrmC.....	206
Tableau 4 : Le domaine FERM de FrmC n'interagit la queue cytosolique des protéines SibA, B et C dans des expériences de double hybride .....	194
Tableau 5 : Partenaires du domaine FERM de FrmC identifiés par spectrométrie de masse .....	196



# INTRODUCTION

---

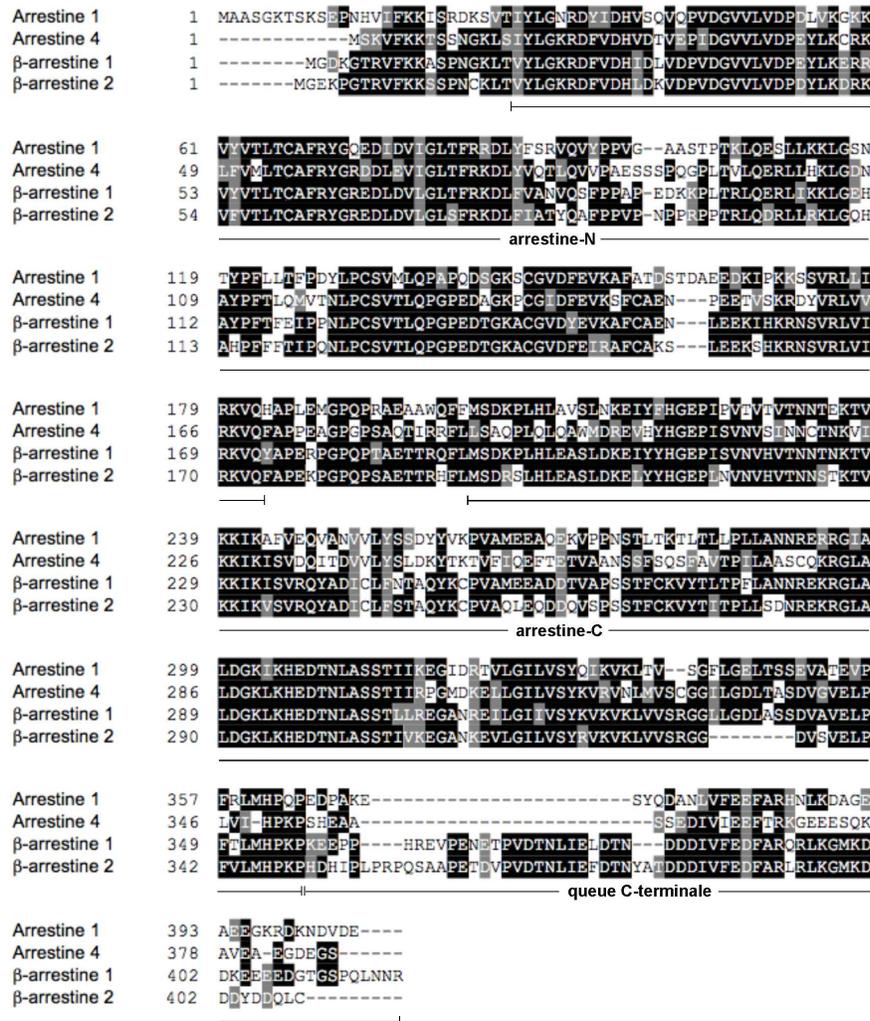


## PARTIE 1 : LES ARRESTINES, DES ADAPTATEURS MULTIFONCTIONNELS

### I. LES PROTÉINES DU CLAN « ARRESTINE »

#### 1. La découverte des premiers membres du clan arrestine

L'identification des premiers membres de cette superfamille de protéines remonte aux années 70. L'arrestine 1 est tout d'abord identifiée comme un antigène soluble (d'où son nom initial d'antigène S) capable d'induire l'uvéïte, une infection rétinienne auto-immune associée à une perte de fonctions du photorécepteur rhodopsine, un membre de la famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires (RCPG) (Wacker, 1972; Faure et al., 1976; Wacker and Kalsow, 1976). En 1977, cet antigène S est isolé et caractérisé (Dorey and Faure, 1977; Wacker et al., 1977). Parallèlement, l'équipe de Kühn identifie une protéine de 48 kDa enrichie dans les disques des segments externes des cellules photo-réceptrices en bâtonnet après illumination (Kühn, 1978). Cette protéine est capable d'interagir avec la rhodopsine et de moduler la signalisation en aval de ce récepteur (Wilden et al., 1986a). En 1985, la même équipe met en évidence que l'antigène S et cette protéine de 48 kDa correspondent à la même protéine et l'appellation *arrestine* est proposée, en référence à sa capacité d'arrêter la signalisation des protéines G en aval de la rhodopsine (Miller et al., 1986; Pfister et al., 1985; Wilden et al., 1986a, 1986b; Zuckerman and Cheasty, 1986). La forme bovine de cette arrestine dite visuelle du fait de sa présence dans les cellules rétiniennes est clonée et entièrement séquencée en 1987 (Shinohara et al., 1987; Yamaki et al., 1987). A la même période, l'équipe de Lefkowitz qui s'intéresse alors au fonctionnement d'un autre RCPG, le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique ( $\beta$ 2-AR), sur des cellules de cerveau de bœuf propose un mode de régulation pour ce récepteur similaire à celui de la rhodopsine, impliquant une kinase mais aussi une protéine supplémentaire afin de permettre sa désensibilisation optimale (Benovic et al., 1986, 1987a, 1987b). Des similitudes fonctionnelles avec la protéine de 48 kDa mènent à proposer l'hypothèse que cette protéine « manquante » pourrait être un analogue de l'arrestine visuelle. Un crible sur une banque d'ADNc de cerveau de bœuf utilisant un fragment d'ADN codant pour l'arrestine visuelle comme sonde permettra d'identifier une nouvelle protéine présentant environ 60 % d'identité de séquence avec l'arrestine visuelle. Cette protéine sera nommée naturellement  $\beta$ -arrestine du fait de son rôle inhibiteur de l'activité du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (Lohse et al., 1990).



**Figure 1 : Alignement des séquences des arrestines visuelles et β-arrestines humaines.**

Les séquences des arrestines visuelles 1 et 2 et des isoformes 1 des β-arrestines 1 et 2 ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal-Oméga et l'alignement coloré sous Boxshade. Les boîtes noires correspondent aux acides aminés conservés et les boîtes grises aux acides aminés partageant des propriétés similaires. Sont indiqués les sous-domaines arrestine-N et arrestine-C et la queue C-terminale des protéines.

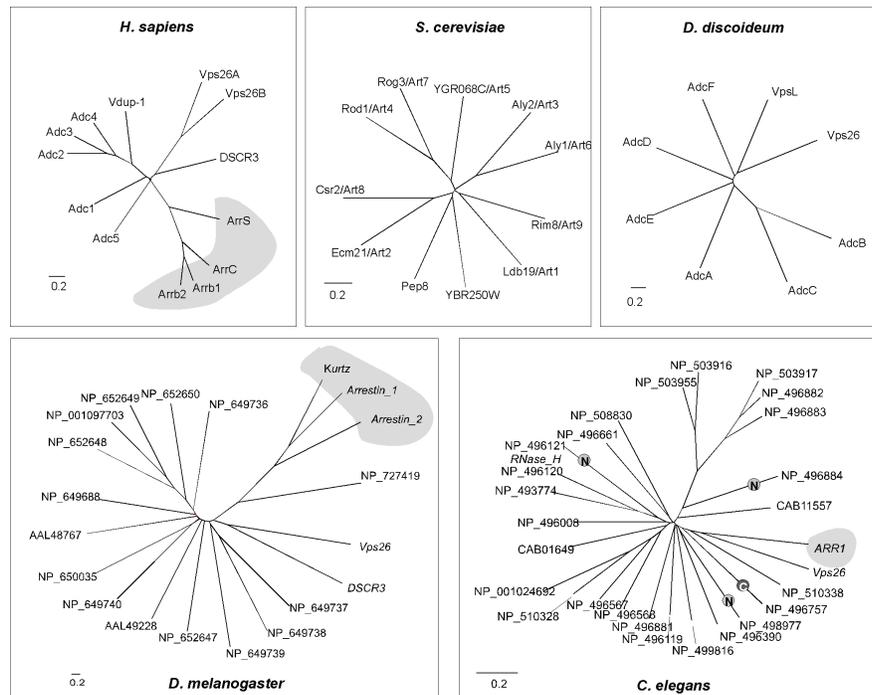
## 2. Le répertoire des arrestines visuelles et $\beta$ -arrestines

Dans les années qui suivent la découverte de ces premières arrestines, deux autres protéines seront rapidement identifiées, étendant le répertoire des arrestines à 4 membres chez les Mammifères :

- deux **arrestines visuelles** spécifiquement et massivement exprimées dans les cellules photo-réceptrices rétiniennes nommées arrestines S et C (ou arrestines 1 et 4) et à un moindre niveau dans la glande pinéale qui partage une origine embryologique commune avec les cellules photo-réceptrices (Smith et al., 1994). Au niveau de la rétine, l'arrestine 1 représente un constituant majeur des cellules en bâtonnet alors que l'arrestine 4 est plus spécifique des cellules photo-réceptrices en cône (Craft et al., 1994).
- deux  **$\beta$ -arrestines**, les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 (ou encore arrestines 2 et 3), présentant une homologie de séquence globale avec les arrestines visuelles avoisinant les 70 % et exprimées de façon ubiquitaire en dehors de la rétine avec un niveau élevé dans les tissus neuronaux et la rate. Au niveau de la séquence protéique, les différences majeures avec les arrestines visuelles résident dans l'extrémité N-terminale et surtout dans leur queue C-terminale (Figure 1).

Plusieurs isoformes, résultant d'épissage alternatif, ont également été caractérisées pour l'arrestine 1 et les deux  $\beta$ -arrestines. L'arrestine 1 de bœuf est exprimée sous la forme d'une protéine de 404 acides aminés mais également de deux variants, l'un qui se caractérise par l'absence des acides aminés 338 à 345 et l'autre appelé p44 dans lesquels les 35 derniers acides aminés sont remplacés par une alanine unique (Smith et al., 1994; Yamaki et al., 1987, 1990). Ce variant p44 a un effet inhibiteur sur la rhodopsine bien plus efficace que la version entière du fait d'une conformation « constitutivement » active de la protéine (voir paragraphe II.1). En ce qui concerne les  $\beta$ -arrestines, au moins deux variants d'épissage alternatif sont exprimés qui présentent dans la partie C-terminale une délétion des résidus 334-341 pour la  $\beta$ -arrestine 1 (région absente chez la  $\beta$ -arrestine 2) et une insertion de 11 acides aminés en position 361 pour la  $\beta$ -arrestine 2 (Parruti et al., 1993; Sterne-Marr et al., 1993). A la différence des variants de la  $\beta$ -arrestine 2, qui sont exprimés de façon ubiquitaire avec une prédominance systématique de la version courte, les variants long et court de la  $\beta$ -arrestine 1 présentent des enrichissements relatifs différents en fonction des tissus (Sterne-Marr et al., 1993). L'impact de cet épissage alternatif sur le fonctionnement des deux  $\beta$ -arrestines n'a pas été étudié en détail.

Dans la suite du texte et dans un but de simplification, ces arrestines (*beta* et visuelles) ont été regroupées sous le terme d'arrestines conventionnelles. En dehors des Mammifères, des représentants de ces arrestines conventionnelles ont été identifiés chez les poissons et les amphibiens (deux arrestines visuelles et une  $\beta$ -arrestine), la drosophile *Drosophila melanogaster* (deux arrestines



**Figure 2 :** Arbres phylogénétiques des membres du clan arrestine identifiés chez *H sapiens*, *S. cerevisiae*, *D. discoideum*, *D. melanogaster* et *C. elegans* (extrait de Aubry et al., 2009). Les arrestines conventionnelles ont été grisées.

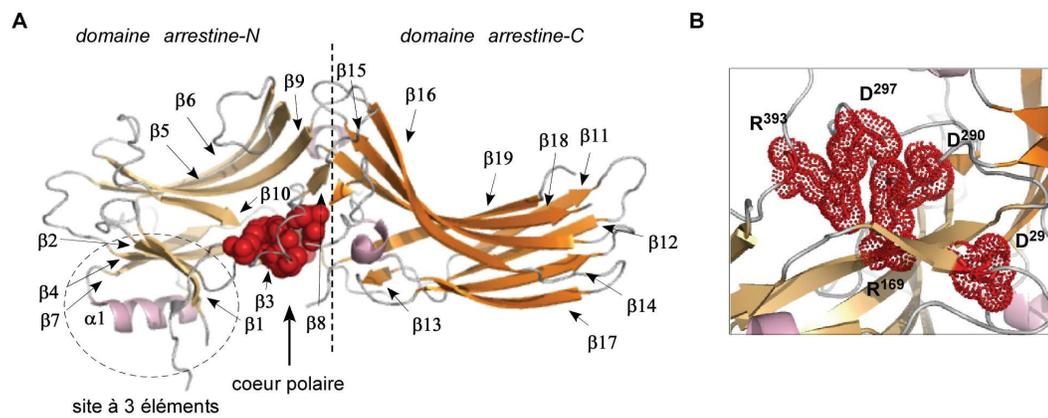
visuelles et une  $\beta$ -arrestine appelée Kurtz) ou encore le nématode *Coenorhabditis elegans* (une  $\beta$ -arrestine). Cette famille de protéines semble par contre restreinte au règne animal, ce qui a conduit à l'idée, remise en question récemment, que les arrestines auraient émergé tardivement dans l'évolution.

### 3. Des arrestines conventionnelles au clan arrestine

Depuis peu, la famille des arrestines conventionnelles a été étendue par l'identification de protéines apparentées chez les Mammifères, mais également chez des organismes ne possédant pas d'arrestines conventionnelle comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou encore l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Alvarez, 2008; Aubry et al., 2009). Des essais de modélisation structurale par homologie indiquent en effet, que malgré une homologie de séquences bien plus faible qu'au sein de la famille des arrestines conventionnelles, toutes ces protéines possèdent un cœur arrestine modélisable à partir de la structure connue des arrestines conventionnelles. Selon les protéines, ce cœur arrestine est parfois étendu en N-terminal ou plus souvent en C-terminal par des domaines ou extensions susceptibles d'apporter des propriétés supplémentaires en terme de localisation, de fonction et de liaison à des partenaires (Alvarez, 2008; Aubry et al., 2009; Gurevich and Gurevich, 2006a) (voir paragraphe III.1).

L'identification de ces nouveaux membres a donné naissance au « clan arrestine » regroupant ainsi ces protéines avec les arrestines conventionnelles. Le terme générique d' $\alpha$ -arrestines a été proposé pour baptiser ces nouvelles arrestines (Alvarez, 2008). Dans la littérature, elles apparaissent néanmoins sous des appellations diverses en fonction des organismes : ARRDCs (*Arrestin domain-containing*) chez les Mammifères, ARTs (*Arrestin-related trafficking adaptators*) chez la levure *S. cerevisiae* ou encore Adcs (*Arrestin domain-containing*) chez *Dictyostelium* ou la Drosophile. Les Mammifères possèdent 5 ARRDCs (ARRDC-1 à -5) en plus de la protéine VDUP1 (*Vitamin D3 upregulated protein 1*) aussi appelée TXNIP (*Thioredoxin-interacting protein*). Ont pu être identifiées 26 ARRDCs chez *C. elegans*, 17 Adcs chez *D. melanogaster*, 10 ARTs chez *S. cerevisiae* plus la protéine Spo23 (*Sporulation protein 23*, ne possédant qu'une partie du domaine arrestine) et les protéines apparentées Bull1 à 3, 6 Adcs (*Arrestin-domain containing*) chez *Dictyostelium* et 10 arrestines non conventionnelles chez *Aspergillus nidulans* (Figure 2 et voir paragraphe III.1). Le terme d'arrestines non conventionnelles a été plus généralement utilisé dans la suite du texte pour les distinguer des arrestines conventionnelles. Cette famille de protéines sera présentée de façon détaillée dans le paragraphe III.

Enfin, le clan arrestine inclut également un ensemble de protéines plus éloignées, sans homologie de séquences avec les différentes arrestines mais qui présentent ou dont la modélisation suggère une structure de type *arrestin-fold*. Il s'agit de la famille Vps26 comprenant notamment son membre



**Figure 3 : Organisation structurale des arrestines.**

**A.** Structure de la  $\beta$ -arrestine 1 (1JSY) indiquant le domaine arrestine-N (l'hélice  $\alpha 1$  et brins  $\beta 1$  à  $10$ ,  $\beta 20$ ), le domaine arrestine-C (brins  $\beta 11$  à  $19$ ), le cœur polaire et le site d'interaction à 3 éléments, visualisée avec PyMol. **B.** Zoom du cœur polaire contenant les résidus  $R^{169}$ ,  $R^{393}$ ,  $D^{29}$ ,  $D^{290}$  et  $D^{297}$ .

fondateur, la protéine Vps26 (*Vacuolar protein sorting 26*), une sous-unité du rétromère impliquée dans le transport rétrograde des endosomes vers l'appareil de Golgi et la protéine DSCR3 (*Down syndrome critical region gene 3*) impliquée dans le Syndrome de Down (Aubry and Klein, 2013; Aubry et al., 2009; Shi et al., 2006). Des homologues de la protéine humaine Vps26 sont présents chez tous les Eucaryotes, plantes incluses à la différence des arrestines. Le clan arrestine pourrait s'étendre à nouveau du fait de l'identification récente d'autres membres présentant une structure modélisée de type *arrestin-fold* (Aubry and Klein, 2013).

L'identification de ces nouvelles protéines du clan arrestine a amené à revoir leur origine phylogénétique et à proposer que les arrestines non conventionnelles soient les ancêtres des arrestines conventionnelles et qu'elles aient elles-mêmes divergé d'un ancêtre commun apparu après la séparation entre les plantes et la branche animal-champignon puisqu'aucun homologue d'arrestines conventionnelle ou non conventionnelle n'a été retrouvé chez les plantes (Alvarez, 2008). Néanmoins, l'utilisation de la séquence de l'arrestine non conventionnelle AdcA de *Dictyostelium* dans une recherche d'homologues par BlastP a permis d'identifier un homologue de la protéine chez le picophytoplancton, *Micromonas pusilla*. Or *Micromonas* est considérée comme l'ancêtre de la lignée des plantes vertes, ce qui laisse envisager l'existence possible de membres de cette superfamille chez les plantes, mais dont la séquence serait trop éloignée pour être décelés de façon convaincante.

## II. LES ARRESTINES CONVENTIONNELLES

### 1. Structure des arrestines conventionnelles

Des études cristallographiques ont permis d'établir la structure tridimensionnelle des arrestines conventionnelles (Figure 3.A). Les arrestines visuelles et  $\beta$ -arrestines présentent des structures extrêmement proches qui suggèrent une conservation des mécanismes moléculaires régulant leur fonctionnement. Nous verrons néanmoins par la suite, qu'elles présentent des caractéristiques et spécificités qui ne semblent pas être étendues à l'ensemble des membres de cette sous-famille de protéines.

Ces arrestines sont constituées d'une hélice  $\alpha$  en N-terminal suivie de 20 brins  $\beta$  répartis sur 2 sous-domaines d'environ 150 acides aminés chacun et d'une queue en C-terminale (Granzin et al., 2012; Hirsch et al., 1999; Milano et al., 2002, 2006; Sutton et al., 2005; Zhan et al., 2011). Les sous-domaines sont organisés en 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles rappelant la structure de la fibronectine de type III, et reliés entre eux par une région flexible d'une dizaine de résidus (a.a. 174 à 181 chez la  $\beta$ -



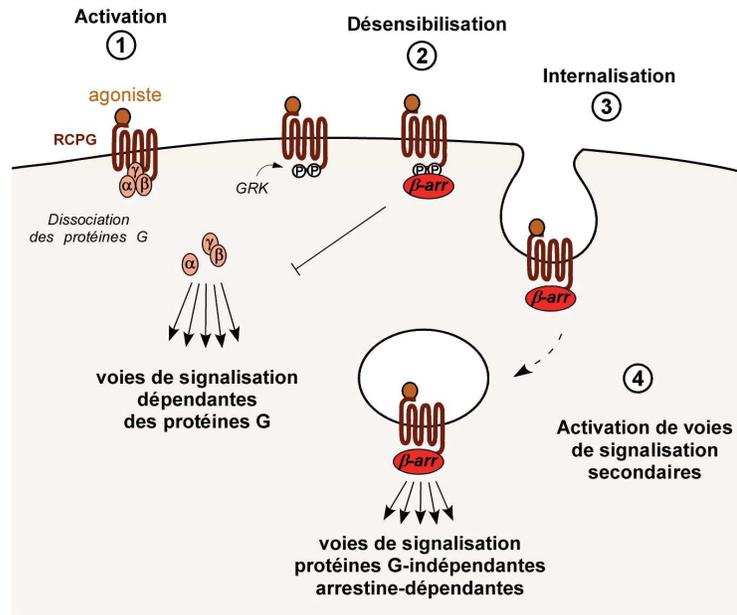
arrestine 1) (Campbell and Spitzfaden, 1994). Le sous-domaine N (arrestine-N) est constitué de l'hélice  $\alpha 1$ , et des brins  $\beta 1$  à 10 et 20, le sous-domaine C (arrestine-C) des brins  $\beta 11$  à 19.

A l'état basal, les arrestines sont maintenues dans une conformation « fermée » qui met en jeu deux domaines d'interactions intramoléculaires : (1) un cœur polaire enfoui entre les deux domaines N et C, constitué d'acides aminés chargés amenés par le domaine N et la queue C-terminale (R<sup>169</sup> et R<sup>393</sup>, D<sup>29</sup>, D<sup>290</sup> et D<sup>297</sup> chez la  $\beta$ -arrestine 1, retrouvés conservés chez les 3 autres arrestines de Mammifères) (Figure 3.B) et (2) un site dit « à trois éléments » mettant en jeu un ensemble d'interactions hydrophobes via des acides aminés répartis sur le brin  $\beta 1$ , l'hélice  $\alpha 1$  et la queue C-terminale (Gurevich and Gurevich, 2003, 2006b; Vishnivetskiy et al., 2000). Ces deux sites jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'arrestine permettant le maintien de la protéine dans une conformation basale contrainte, avec la queue C-terminale repliée sur le cœur polaire et rendue ainsi inaccessible.

Dans des conditions particulières d'interaction avec des récepteurs membranaires ou des partenaires protéiques sur lesquelles nous reviendrons dans le chapitre II.2, ces arrestines peuvent adopter d'autres conformations. La liaison avec un récepteur activé conduit au passage à une conformation « ouverte » où la libération de la queue C-terminale de l'arrestine permet le recrutement d'acteurs de la machinerie d'endocytose (Gurevich and Gurevich, 2006b; Kern et al., 2009; Krupnick et al., 1997a; Vishnivetskiy et al., 2002). Cette deuxième conformation semble encore différente de celle obtenue pour les arrestines en liaison avec les microtubules conférant à chacune des états et des propriétés spécifiques (Coffa et al., 2011; Hanson et al., 2006a, 2007a).

## 2. Fonctions des arrestines conventionnelles

L'identification des arrestines comme acteur dans la désensibilisation de la rhodopsine et du récepteur  $\beta 2$ -adrénergique a très rapidement placé cette famille de protéines dans un rôle de régulateurs des RCPGs. Aujourd'hui, nous savons effectivement que les arrestines sont capables d'interagir avec un grand nombre de RCPGs mais aussi avec d'autres types de cargos membranaires tels que des récepteurs aux cytokines, aux facteurs de croissance ou encore des canaux ioniques. Ces protéines peuvent également servir d'adaptateurs pour le recrutement des machineries d'endocytose et d'ubiquitination responsables du devenir des récepteurs. Enfin, elles sont capables d'activer des voies de signalisation diverses comme des cascades de MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*), des voies de régulation du cytosquelette ou de la transcription. Ces différents aspects seront passés en revue successivement.



**Figure 4 : Régulation des RCPGs par les arrestines.**

Suite à leur activation par leur ligand, les protéines G hétéro-trimériques se dissocient du RCPG et permettent l'activation de voies de signalisation spécifiques (1). Le RCPG est phosphorylé spécifiquement par les GRKs (2). Les arrestines se fixent sur la queue cytosolique des RCPGs activés conduisant à leur désensibilisation et leur internalisation dans la voie endocytaire (3). Sur les endosomes, le RCPG active d'autres voies de signalisation, indépendantes des protéines G.

## 2.1. Rôle des arrestines dans la régulation de cargos membranaires

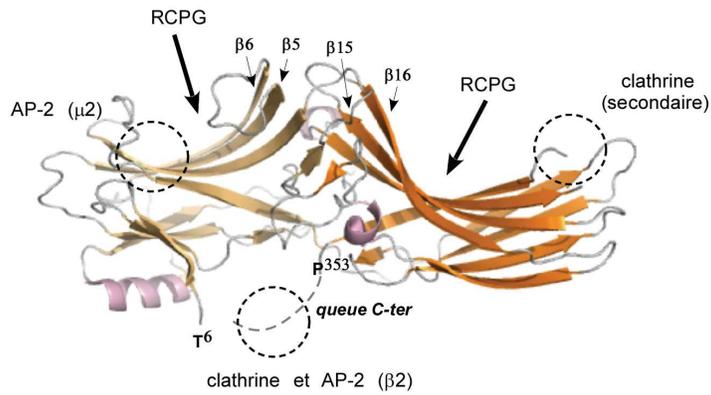
### 2.1.1. Régulation des RCPGs

Les RCPGs constituent une large famille de récepteurs membranaires (environ 800 gènes dans le génome humain) retrouvés dans l'ensemble des tissus des Mammifères (Fredriksson et al., 2003). Ils assurent la reconnaissance de toute une gamme de signaux extracellulaires comme des chimiokines, des hormones, des neurotransmetteurs ou encore des photons et permettent la génération d'une réponse cellulaire adaptée via des protéines G hétéro-trimériques qui leur sont associées. La fixation du ligand sur le récepteur induit son changement de conformation et l'activation des protéines G hétéro-trimériques par échange du GDP par un GTP, résultant en la dissociation des sous unités  $G\alpha$  et  $G\beta,\gamma$  (Figure 4). Ces sous-unités peuvent alors réguler divers effecteurs incluant des phospholipases, des adénylyl cyclases et des canaux ioniques, modulant ainsi le niveau de divers messagers secondaires et l'activation de cascades de signalisation spécifiques. Suite à son activation, le récepteur est phosphorylé et désensibilisé, empêchant sa sur-stimulation en situation d'exposition prolongée au ligand et éventuellement internalisé dans des vésicules endocytaires. Depuis ces endosomes, il pourra alors être soit recyclé après déphosphorylation soit acheminé jusqu'aux lysosomes pour y être dégradé (Tan et al., 2004). Ces trois étapes de désensibilisation-internalisation-dégradation/recyclage des RCPGs mettent en jeu les arrestines.

- **Désensibilisation des RCPGs par les arrestines**

L'activation du récepteur, suite à la fixation de son ligand, conduit à sa phosphorylation rapide au niveau de la queue C-terminale ou de certaines boucles cytosoliques, assurée par des sérine/thréonine kinases spécifiques, les GRKs (*G protein-coupled receptor kinase*) (Kohout and Lefkowitz, 2003; Oakley et al., 1999, 2001; Zhang et al., 1999). Cette phosphorylation permet le recrutement des arrestines, empêchant la réassociation des protéines G hétéro-trimériques sur le récepteur et l'activation des voies de signalisation en aval, dépendantes de ces protéines G (Figure 4). La liaison des arrestines contribue donc directement à la désensibilisation du récepteur (Benovic et al., 1987a; Ferguson et al., 1996; Krupnick and Benovic, 1998).

Au niveau de l'arrestine, plusieurs sites de liaison aux RCPGs ont été caractérisés, assurant d'une part, la reconnaissance de la forme activée du récepteur (spécificité) et d'autre part, celle des groupements phosphates portés par le récepteur (site dit « senseur de phosphate ») (Hanson and Gurevich, 2006; Hanson et al., 2006b; Pulvermüller et al., 2000; Vishnivetskiy et al., 2004, 2010, 2011). En effet, à l'exception de quelques RCPGs comme les récepteurs à l'hormone lutéinisante/choriogonadotropine (LHCGR) et à l'orexine-1 (OX1R), la vaste majorité des récepteurs pris en charge par les arrestines sont effectivement phosphorylés (Milasta et al., 2005; Min et al., 2002; Mukherjee et al., 2002; Walther and Ferguson, 2013). Dans le cas contraire, des *clusters* de

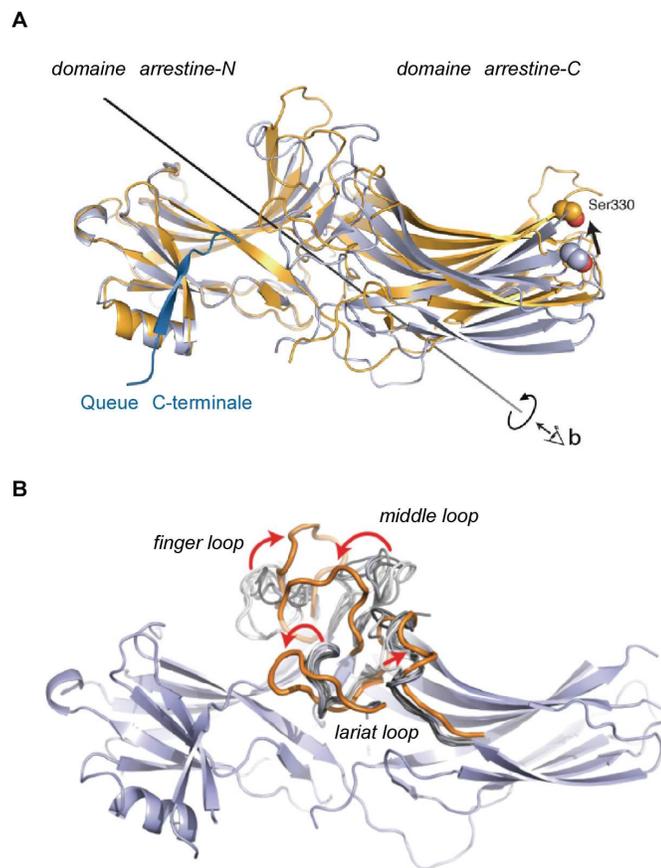


**Figure 5 : Sites d'interaction des arrestines.**

Localisation des sites d'interaction aux RCPGs (flèches) ainsi que des sites d'interaction avec la clathrine, canonique ( $\beta$ -arrestines) et secondaire (arrestines visuelles et  $\beta$ -arrestine 1) et avec les sous-unités  $\beta 2$  et  $\mu 2$  du complexe AP-2 ( $\beta$ -arrestines) (cercle). La queue C-terminale est schématisée par un trait en pointillé.

**Figure 6 : Changements conformationnels induits par l'activation de la  $\beta$ -arrestine 1** (modifiée depuis Shukla et al., 2013).

**A.** Structure de la  $\beta$ -arrestine 1 (1G4M) sous sa forme inactive (jaune) et sous sa forme active (bleu) en association avec le peptide phosphorylée du récepteur  $V_2R$ . Le domaine C-terminal subit une rotation et un déplacement par rapport au domaine N-terminal. **B.** Les boucles (*finger*, *middle* et *lariat loop*) subissant un mouvement lors de l'activation sont indiquées avec des flèches.



résidus acides présents dans les domaines intracellulaires du récepteur semblent jouer le rôle normalement attribué aux groupements phosphates.

Des travaux menés sur l'arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 1 ont montré que la forme activée du récepteur est reconnue par une large zone dans la région concave des arrestines impliquant des sites à la fois dans le domaine N et le domaine C (Hanson and Gurevich, 2006; Hanson et al., 2006b; Pulvermüller et al., 2000; Vishnivetskiy et al., 2004, 2010, 2011). La spécificité d'interaction de l'arrestine 1 pour la rhodopsine comparée à la large gamme de récepteurs RCPGs reconnue par les  $\beta$ -arrestines a permis de définir, par la création d'arrestines chimériques, que les acides aminés 49 à 90 du domaine N (brins  $\beta$ 5 et 6 et boucles adjacentes) et 237 à 268 du domaine C (brins  $\beta$ 15 et 16) des  $\beta$ -arrestines jouent un rôle clé dans la spécificité de reconnaissance des récepteurs (Figure 5). Ainsi, l'échange de ses régions de l'arrestine visuelle aux  $\beta$ -arrestines suffit à inverser les spécificités respectives de ces deux arrestines pour leur RCPGs cibles (Vishnivetskiy et al., 2004). Les travaux de Vishnivetskiy *et al.* ont permis d'identifier dans chacun des deux sites, des acides aminés clés conférant cette spécificité de reconnaissance (Vishnivetskiy et al., 2011). L'impact de mutations dans ces régions indique également une contribution relative du site « senseur de phosphate » et des sites de reconnaissance du récepteur activé, permettant l'interaction avec le RCPG, différente pour l'arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 1.

La fonction « senseur de phosphates » primaire semble être assurée par le site d'interaction à 3 éléments (voir chapitre II.1) via la liaison des résidus phosphorylés au niveau de deux lysines du brin  $\beta$ 1 ( $K^{14}$  et  $K^{15}$  pour l'arrestine-1,  $K^{10}$  et  $K^{11}$  chez la  $\beta$ -arrestine 1) (Gimenez et al., 2012; Vishnivetskiy et al., 2000). Cette première étape de reconnaissance conduit à une série de réarrangements structuraux permettant la formation d'un complexe [récepteur activé phosphorylé]/[arrestine activée] de forte affinité. Des travaux récents ont permis d'obtenir la structure cristalline de formes actives d'arrestines (la  $\beta$ -arrestine 1 en complexe avec un peptide phosphorylé correspondant à la queue C-terminale du récepteur à la vasopressine  $V_2R$  et le variant p44 de l'arrestine 1 bovine délété de son extrémité C-terminale) et permettent de proposer le modèle suivant : la liaison des phosphates au niveau du site à 3 éléments conduirait à une déstabilisation de ce site et au déplacement de la queue C-terminale (Figure 6) (Kim et al., 2013; Shukla et al., 2013). Ce déplacement aurait pour conséquence l'extraction du résidu  $R^{393}$  du cœur polaire ( $\beta$ -arrestine 1), porté par la queue C-terminale, conduisant à sa déstabilisation, possiblement par excès de charges négatives et à la rotation de la boucle contenant les résidus  $D^{290}$  et  $D^{297}$  (*ariat loop*), permettant la stabilisation de la forme activée de la protéine. D'autres acides aminés dont la lysine  $K^{294}$  également présente dans la *ariat loop* pourraient par liaison à des groupements phosphates participer à la restructuration de l'arrestine. Le déplacement de la queue C-terminale, le mouvement conséquent de plusieurs boucles (*finger loop*, *middle loop*, *ariat loop*)



notamment dans la région concave de liaison des récepteurs, associés à la rotation des domaines N et C l'un par rapport à l'autre, permettraient aux arrestines de lier leur(s) cible(s) de façon très stable.

De façon intéressante, les travaux de Hanson *et al.* montrent que les sites d'interaction aux RCPGs sont également impliqués dans la liaison des arrestines avec les microtubules (Hanson et al., 2006a, 2007a). Dans cette interaction, le mouvement de la queue C-terminale semble aussi jouer un rôle important puisque sa délétion favorise l'interaction arrestine/microtubule (Hanson et al., 2007a). Par contre, la flexibilité de la protéine, assurée par la région entre les domaines N et C, est plutôt défavorable pour stabiliser l'interaction (Hanson et al., 2007a). Ces résultats suggèrent l'existence d'une troisième conformation adoptée par les arrestines, avec pour chacune des spécificités propres régulant ainsi la disponibilité de la protéine pour ces différents interactants.

La liaison arrestine-récepteur a pour effet le découplage des protéines G hétéro-trimériques du récepteur par encombrement stérique et la désensibilisation du récepteur. Les arrestines peuvent compléter cette désensibilisation en favorisant l'atténuation de la réponse dépendante des protéines G par la dégradation des messagers secondaires générés par cette voie. Ceci a été décrit pour le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique de myocytes de cœur où les phosphodiesterases PDE<sub>4</sub>D-3 et -5 sont recrutées de façon arrestine-dépendante au niveau du récepteur permettant d'accélérer la dégradation de l'AMPc ou encore pour le récepteur muscarinique M1 où les  $\beta$ -arrestines permettent le recrutement de la diacylglycérol kinase sur le récepteur activé, conduisant à la transformation du messager secondaire du diacylglycérol en acide phosphatidique (Nelson et al., 2007; Perry et al., 2002).

Les changements conformationnels occasionnés par la liaison du RCPG phosphorylé autorisent par ailleurs l'accessibilité des arrestines à des partenaires cytosoliques sur des sites jusque là masqués dans la forme non activée de la protéine. En particulier, l'exposition de la queue C-terminale assure le recrutement d'acteurs de la machinerie d'endocytose dans l'environnement du récepteur.

- ***Les arrestines participent à l'internalisation des RCPGs via leur rôle d'adaptateur d'acteurs de l'endocytose***

- *Recrutement de la clathrine*: La clathrine est une protéine endocytaire qui joue un rôle essentiel dans l'internalisation d'un grand nombre de récepteurs en tant qu'élément structural majeur dans la formation d'une sous-catégorie de vésicules endocytaires, les vésicules recouvertes de clathrine. Bien que la plupart des RCPGs accèdent à la voie endocytaire via des puits/vésicules à clathrine, ces récepteurs ne lient pas directement la molécule et nécessitent l'implication de protéines adaptatrices susceptibles de faire le lien entre la clathrine et la protéine membranaire cible.

Sur leur queue C-terminale, les  $\beta$ -arrestines possèdent un motif classique d'interaction avec la chaîne lourde de la clathrine (*clathrin-box*), de type L $\Phi$ x $\Phi$  [D/E] (où  $\Phi$  représente un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé polaire quelconque) : LIELD pour la  $\beta$ -arrestine 1 et LIEFD pour la  $\beta$ -arrestine 2 (Figure 5). Des mutations dans cette *clathrin-box* affectent la liaison à la clathrine et la



séquestration des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques dans la voie endocytaire (Goodman et al., 1996; Kim and Benovic, 2002; Krupnick et al., 1997b). Un second site d'interaction avec la clathrine de type [L/I][L/I]GxL a été mis en évidence chez le variant long de la  $\beta$ -arrestine 1 au niveau de la boucle située entre les brins  $\beta$ 18 et 19, faisant l'objet d'épissage alternatif dans la forme courte (voir paragraphe II.1 ; Figure 5) (Kang et al., 2009). Ce site n'est pas présent chez la  $\beta$ -arrestine 2, du fait de l'absence de cette région dans la protéine. En revanche, il est conservé chez les arrestines visuelles qui ne possèdent pas la *clathrin-box* canonique dans l'extrémité C-terminale.

- Recrutement de la protéine adaptatrice AP-2 : Les  $\beta$ -arrestines sont également capables de lier la protéine AP-2 (*adaptor protein 2*), une protéine oligomérique constituée de 4 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2 et  $\sigma$ 2) qui sert également d'adaptateur entre la clathrine et des cargos membranaires. Un site d'interaction avec la sous-unité  $\beta$ 2 a été identifié sur la queue C-terminale à proximité du site de liaison à la clathrine ([D/E]xxFxx[F/L]xxxR) ainsi qu'un site de liaison à la sous-unité  $\mu$ 2 localisé à l'extrémité N-terminale des  $\beta$ -arrestines ([Y/F]xx $\phi$ , <sup>54</sup>YVTL chez la  $\beta$ -arrestine 1, <sup>55</sup>FVTL chez la  $\beta$ -arrestine 2), conservé chez les arrestines visuelles (Figure 5) (Kim and Benovic, 2002; Laporte et al., 1999, 2002; Marion et al., 2007; Schmid et al., 2006). Cette interaction AP-2/arrestine est essentielle pour permettre une internalisation optimale du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et du récepteur à la vasopressine. La phénylalanine F<sup>55</sup>, présente chez la  $\beta$ -arrestine 2, joue un rôle important dans cette interaction. En effet, cette arrestine est plus affine pour la sous-unité  $\mu$ 2 que la  $\beta$ -arrestine 1 et la substitution de la tyrosine Y<sup>54</sup> en phénylalanine chez cette dernière augmente d'une part, sa capacité d'interaction avec AP-2 et d'autre part, l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique dépendante de la  $\beta$ -arrestine 1 (Marion et al., 2007).

- Interaction avec d'autres acteurs protéiques : Parallèlement à la clathrine et l'adaptine AP-2, d'autres acteurs endocytaires, absents dans les puits recouverts de clathrine mais qui contribuent à l'internalisation des RCPGs, sont recrutés par les  $\beta$ -arrestines. C'est le cas notamment de la petite protéine G ARF6 (*ADP-ribosylation factor*) et des régulateurs ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*) et EFA6 (*Exchange factor for ARF6*) ou encore de la protéine NSF (*N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein*) (Claing et al., 2001; Macia et al., 2012; McDonald et al., 1999).

La protéine ARF6 participe à l'internalisation de divers récepteurs tel que les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques et muscariniques M2, les récepteurs à l'angiotensine (AT<sub>1</sub>R), à la vasopressine (V<sub>2</sub>R) et à l'endothéline B (ET<sub>B</sub>R) en facilitant notamment le recrutement de la protéine AP-2 et de la clathrine dans l'environnement du récepteur activé (Claing et al., 2001; Houndolo et al., 2005; Paleotti et al., 2005; Poupart et al., 2007). Des données *in vitro* ont montré que les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 via leur domaine C sont capables d'interagir avec ARF6, préférentiellement sous sa forme GDP (Claing et al., 2001; Macia et al., 2012). Suite à la stimulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, la  $\beta$ -arrestine 1 est



capable également de lier le facteur d'échange EFA6, conduisant à l'activation de ARF6 à proximité du complexe arrestine-récepteur (Macia et al., 2012). Par ailleurs, les  $\beta$ -arrestines interagissent également de façon constitutive avec le facteur d'échange ARNO (Claing et al., 2001). L'organisation spatiale et temporelle du recrutement  $\beta$ -arrestine-dépendant de ces différents acteurs contrôlant l'internalisation des récepteurs activés reste encore à préciser.

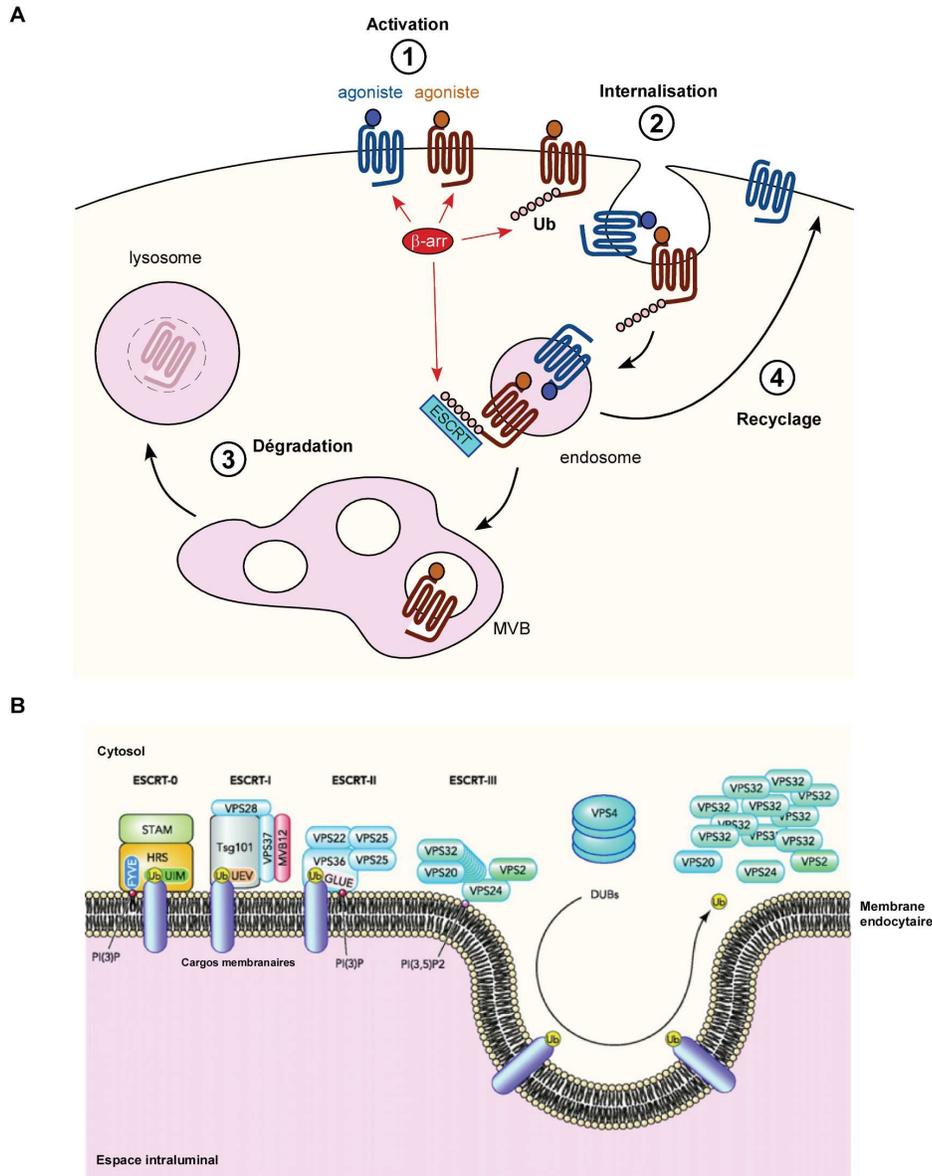
- *Interaction avec les phosphoinositides* : En dehors des acteurs protéiques, les phosphoinositides de la membrane plasmique - en particulier le  $PI(4,5)P_2$  (phosphoinositide-4,5-diphosphate) - jouent également un rôle primordial dans l'adressage des complexes récepteurs/arrestines vers les puits à clathrine. Plusieurs acteurs de la machinerie d'endocytose sont stabilisés à la membrane plasmique grâce au  $PI(4,5)P_2$  et une quantité moindre de ce phosphoinositide à la membrane plasmique altère fortement l'endocytose des RCPGs (Antonescu et al., 2011; Gaidarov and Keen, 1999; Jackson et al., 2010; Zoncu et al., 2007).

Les deux  $\beta$ -arrestines possèdent un site de liaison de forte affinité aux phosphoinositides ( $\sim 1,4 \mu M$  pour le  $PI(4,5)P_2$ ,  $\sim 0,3 \mu M$  pour le  $PI(3,4,5)P_3$ ) dans leur domaine arrestine-C. Trois résidus (K<sup>233</sup>, R<sup>237</sup>, K<sup>251</sup> chez la  $\beta$ -arrestine 2) sont essentiels pour médier cette interaction et leur substitution en glutamine conduit, en plus d'une perte d'interaction entre les arrestines et les phosphoinositides, à une absence quasi complète de prise en charge du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique dans la voie endocyttaire malgré un maintien de l'interaction de l'arrestine avec le récepteur et avec la clathrine, révélant l'importance de l'interaction arrestine/ $PI(4,5)P_2$  pour son internalisation (Gaidarov et al., 1999). Le  $PI(4,5)P_2$  permettrait une stabilisation de l'arrestine et un renforcement de son ancrage à la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que les  $\beta$ -arrestines régulent également la production de  $PI(4,5)P_2$  à la membrane plasmique en interagissant avec la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase permettant sa génération à partir du  $PI(4)P$  (Nelson et al., 2008). Cette interaction est elle-même sous le contrôle du  $PI(4,5)P_2$  via une boucle de régulation positive.

Le site de liaison des phosphoinositides est également reconnu par l' $IP_6$  (Inositol hexaphosphate) avec une meilleure affinité ( $\sim 0,08 \mu M$ ) que le  $PI(4,5)P_2$  et le  $PI(3,4,5)P_3$  (Gaidarov et al., 1999), permettant une double régulation des arrestines, à la membrane plasmique et dans le cytosol. En effet, l' $IP_6$ , qui est particulièrement abondant dans le cytoplasme des cellules, a été décrit comme un régulateur clé des arrestines en favorisant l'état oligomérique des  $\beta$ -arrestines et en modulant ainsi leur localisation subcellulaire (Milano et al., 2006) (voir paragraphe II.3.2).

- ***Les arrestines contrôlent le trafic endocyttaire des RCPGs via le recrutement d'ubiquitine ligases***

Une fois internalisés, les RCPGs peuvent être dirigés soit vers la voie de dégradation, soit vers la membrane plasmique pour y être recyclés. La voie principale menant à la dégradation passe par l'ubiquitination des récepteurs et leur prise en charge éventuelle par des membres de la machinerie ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*) (Dores and Trejo, 2012).



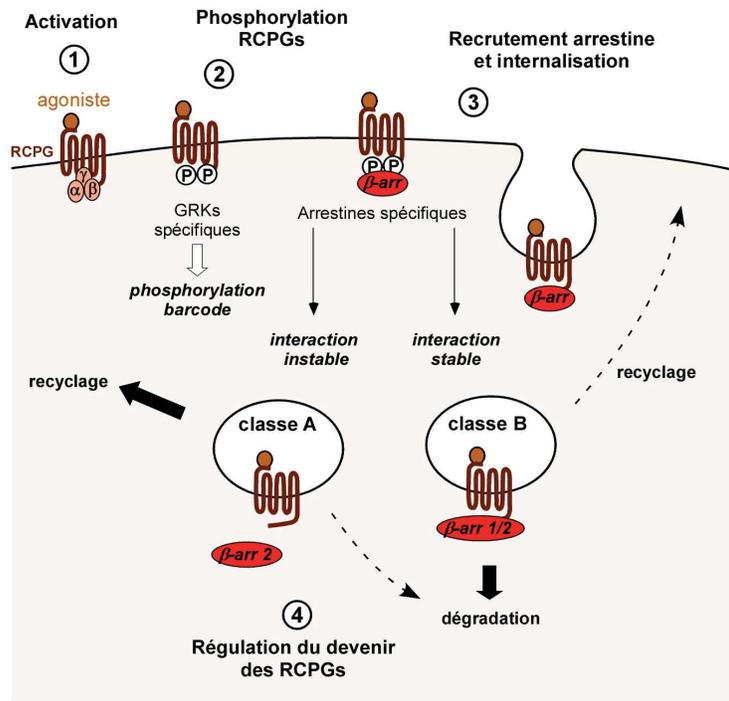
**Figure 7 : Trafic des RCPGs le long de la voie endocytaire.**

**A.** Suite à leur activation, les RCPGs peuvent faire l'objet de modifications post-traductionnelles par ubiquitination (Ub) (1). Après internalisation dans la voie endocytaire, l'étiquette ubiquitine est reconnue par la machinerie ESCRT permettant le ciblage de RCPGs (marron) vers un compartiment endocytaire intermédiaire, les corps multivésiculaires (MVB), et leur dégradation ultérieure par des enzymes lysosomales (3). En l'absence d'ubiquitination, les RCPGs (bleu) sont recyclés à la membrane plasmique (4). **B.** La machinerie ESCRT 4 sous-complexes ESCRT 0, I, II, III qui sont recrutés à la membrane endosomale et assurent la séquestration de cargos membranaires ubiquitinés dans des vésicules intraluminales des MVBs. La reconnaissance de l'étiquette ubiquitine est assurée par des domaines spécifiques - UIM, UEV, GLUE - portés par certains membres de la machinerie. L'ATPase VPS4 participe à la formation des vésicules et au recyclage des constituants du complexe ESCRT III (extrait de Malerød et al., 2011)

L'ubiquitination s'opère au niveau des résidus lysine où se fixent de façon covalente une ou plusieurs ubiquitines, une petite molécule de 76 acides aminés. Les chaînes de poly-ubiquitines formées, de structures variées, et la mono-ubiquitine sont utilisées comme signal d'internalisation dans la voie endocytaire ou encore comme signal de ciblage vers la dégradation par le protéasome dans le cas de protéines solubles ou dans la voie endo-lysosomale quand elle est portée par des cargos membranaires. Au niveau de la voie endocytaire, l'ubiquitine peut être reconnue par différents membres de la machinerie ESCRT via des modules de reconnaissance de l'ubiquitine (UBD, *ubiquitin-binding domain*) qui assure la liaison et la séquestration des cargos dans des vésicules intra-luminales qui seront dégradées après fusion avec les lysosomes (Figure 7). C'est le cas notamment pour les RCPGs qui utilisent cette machinerie après leur ubiquitination pour permettre leur dégradation (Hasdemir et al., 2007; Henry et al., 2011; Marchese et al., 2003). Toutefois, les données récentes de la littérature indiquent un certain degré de variabilité dans la composition des complexes ESCRT mis en jeu en fonction des RCPGs cibles et le nombre et la nature des autres acteurs impliqués faisant le lien éventuel entre le récepteur et les constituants ESCRT (Dores and Trejo, 2014). Dans cette régulation du devenir des RCPGs, les arrestines vont permettre de les orienter vers la voie de dégradation en permettant leur ubiquitination.

Le premier exemple illustrant cette fonction des arrestines a été celui du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique. Suite à son activation par son ligand, le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique peut être rapidement ubiquitiné puis dégradé. L'ubiquitination du récepteur n'est pas nécessaire à son internalisation mais est essentielle pour permettre sa dégradation. Dans des fibroblastes d'embryon de souris dépourvus des 2  $\beta$ -arrestines, l'équipe de Shenoy *et al.* a mis en évidence l'absence d'ubiquitination de ce récepteur, restaurée uniquement par la réintroduction de la  $\beta$ -arrestine 2 (Shenoy et al., 2001). Il a été montré par la suite que cette  $\beta$ -arrestine est capable de recruter la protéine Nedd4, une ubiquitine ligase de la famille des HECT responsable de l'ubiquitination du récepteur  $\beta$ -adrénérique 2 et conduisant ainsi à sa dégradation (Shenoy et al., 2008).

L'ubiquitination du récepteur est le résultat d'un équilibre contrôlé entre l'activité ubiquitine-ligase de Nedd4 et ubiquitine-protéase de USP33 et USP20, les protéines assurant la déubiquitination du récepteur. La surexpression de USP20 et USP33 favorise le recyclage des récepteurs à la membrane alors que leur co-extinction par ARN interférence abolit le recyclage et stimule sa dégradation lysosomale (Berthouze et al., 2009). USP33 est associée de façon constitutive au récepteur  $\beta$ 2-adrénérique à l'état basal mais interagit également avec la  $\beta$ -arrestine 2 dans des conditions d'activation du récepteur. A l'inverse, l'interaction de USP33 avec l'adréno-récepteur diminue avec son activation. La  $\beta$ -arrestine 2 agirait donc à la fois en recrutant Nedd4 sur le récepteur activé et aussi en déplaçant l'ubiquitine protéase susceptible d'interférer avec le processus d'ubiquitination. Les  $\beta$ -arrestines ne possèdent pas de motifs canoniques de type [P/L]PxY permettant le recrutement des



**Figure 8 : Régulation du devenir des RCPGs de classe A et de classe B.**

Suite à leur activation, les RCPGs sont phosphorylés par des GRKs spécifiques. La queue phosphorylée des RCPGs de classe A recrutent préférentiellement la  $\beta$ -arrestine 2, avec laquelle elle forme un complexe instable alors que celle des RCPGs de classe B interagissent avec les 2  $\beta$ -arrestines avec la même affinité et forment un complexe stable (*phosphorylation barcode*). Les RCPGs de classe A sont souvent rapidement recyclés vers la membrane plasmique et les RCPGs de classe B sont généralement dirigés vers la voie de dégradation.

protéines de la famille Nedd4 via leurs domaines WW. Aussi, les bases moléculaires permettant ce recrutement restent encore obscures. Les arrestines non conventionnelles, qui elles possèdent des motifs [P/L]PxY et semblent réguler des cibles communes avec les  $\beta$ -arrestines, pourraient jouer un rôle d'intermédiaires dans cet échafaudage multi-protéique (voir paragraphe III.2).

Aujourd'hui, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des arrestines dans la dégradation d'autres RCPGs, comme le récepteur à la vasopressine 2 ou le récepteur aux opiacés  $\mu$ , parfois de façon indépendante de leur rôle d'adaptateur de la machinerie d'ubiquitination comme dans le cas du récepteur à la chimiokine CXCR4 (Bhandari et al., 2007; Groer et al., 2011; Martin et al., 2003). En effet, la protéine Itch/AIP4 responsable de l'ubiquitination de CXCR4 et nécessaire pour sa dégradation, est recrutée directement par le récepteur de façon  $\beta$ -arrestine indépendante (Marchese et al., 2003). La  $\beta$ -arrestine est toutefois capable de lier Itch et cette interaction qui a lieu au niveau du compartiment endosomal après internalisation du récepteur permettrait l'ubiquitination d'un constituant de la machinerie ESCRT, Hrs (*Hepathocyte growth-factor-regulated tyrosine kinase substrate*), recruté via un autre partenaire de la  $\beta$ -arrestine, STAM-1 (*Signal transducing adaptor molecule-1*), également membre avec Hrs du complexe ESCRT 0 (Bhandari et al., 2007; Malik and Marchese, 2010). Le *knock-down* de la  $\beta$ -arrestine 1 conduit à une diminution du transfert de CXCR4 des endosomes vers les lysosomes (Bhandari et al., 2007). Associés au fait que la perte de l'interaction  $\beta$ -arrestine/STAM-1 accélère la dégradation de CXCR4, ces résultats ont conduit au modèle suivant qui illustre un fonctionnement des  $\beta$ -arrestines à différentes étapes du trafic : la  $\beta$ -arrestine 1 permettrait la prise en charge de CXCR4 par la machinerie ESCRT au niveau de compartiments endocytaires pré-lysosomaux mais contrôlerait également l'équilibre dégradation vs recyclage en modulant l'activité de tri de Hrs par son ubiquitination.

- ***La stabilité du complexe arrestine/RCPGs participant directement à la régulation du devenir des RCPGs***

La famille des RCPGs regroupe un grand nombre de récepteurs qui ont pu être séparés en 2 classes en fonction des plusieurs critères. Les 2 classes se différencient par leur cinétique de recyclage et la durée de leur association avec les arrestines. Les récepteurs de **classe A** comme les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, les récepteurs à la dopamine ( $D_{1A}$ ) ou à l'endothéline A1 ( $ET_{A1}R$ ) fixent préférentiellement la  $\beta$ -arrestine 2 que la  $\beta$ -arrestine 1 et forment un complexe instable qui se dissocie très rapidement après internalisation (Figure 8). Ces récepteurs recyclent rapidement à la surface cellulaire. Les récepteurs de **classe B** comme les récepteurs à la vasopressine ( $V_2R$ ) ou à l'angiotensine ( $AT_{1a}R$ ) fixent les deux  $\beta$ -arrestines avec la même affinité et sont maintenus dans un complexe stable avec les arrestines sur les endosomes et souvent acheminés jusqu'aux lysosomes pour y être dégradés (Oakley et al., 2000, 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2003).



Bien que ces caractéristiques de classification s’appliquent à une grande majorité de RCPGs, certains échappent à la règle comme les récepteurs à la somatostatine (sst), par exemple. En effet, le sous-type sst2A interagit de manière stable avec l’arrestine (comportement classe B) mais est recyclé très rapidement (comportement classe A). Inversement, les sous-types sst3 et sst5 montrent les caractéristiques des récepteurs de classe A mais s’engagent plutôt vers une voie de dégradation (Tulipano et al., 2004). Par ailleurs, la répartition dans ces deux classes varie avec les conditions de stimulation des récepteurs (temps de stimulation, nature de l’agoniste, type cellulaire). Ainsi, la stimulation prolongée du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, classiquement rapidement recyclé, par certains agonistes conduit à son acheminement vers les lysosomes et sa dégradation (Moore et al., 2007; Shenoy et al., 2008).

La préférence des RCPGs pour une arrestine en particulier est directement liée à son état de phosphorylation. En effet, les arrestines sont capables de reconnaître l’état de phosphorylation de la queue cytosolique des RCPGs et l’échange de cette extrémité C-terminale d’un récepteur de classe A avec celle d’un récepteur de classe B suffit à inverser leurs affinités respectives pour les  $\beta$ -arrestines (Oakley et al., 2000). Le profil de phosphorylation d’un RCPG varie en fonction de l’élément permettant son activation et le recrutement subséquent de GRKs spécifiques. Ainsi, les GRKs participent également à la régulation du comportement type classe A *versus* classe B du récepteur (Nobles et al., 2011; Shenoy et al., 2006). Par exemple, la phosphorylation du récepteur  $\beta$ -adrénérique par GRK2 conduit à un profil de type classe A avec son maintien à la membrane plasmique, alors que sa phosphorylation par GRK5 et 6 conduit à une localisation endosomale du récepteur, profil de type classe B (Shenoy et al., 2006).

Ces différentes caractéristiques, définissant le devenir des RCPGs a donné naissance à la notion de « *phosphorylation barcode* », traduisant ainsi le recrutement spécifique d’un membre arrestine, dépendant du type d’activation du RCPG et qui pourrait refléter le changement de conformation adoptée par les arrestines activées régulant ainsi leurs propriétés fonctionnelles, associées à ces différentes conformations.

### 2.1.2. Rôle des arrestines dans la régulation d’autres types de récepteurs

Alors que les arrestines ont été décrites pendant de nombreuses années comme des régulateurs spécifiques des RCPGs canoniques, le répertoire de leurs cibles membranaires n’a fait qu’augmenter depuis une dizaine d’années, indiquant un rôle plus général pour ces adaptateurs protéiques.

Ce répertoire inclut les récepteurs à 7 hélices transmembranaires atypiques tels que Smoothened (Chen et al., 2003a, 2004) mais également des récepteurs aux facteurs de croissance tels que le récepteur tyrosine kinase IGF-1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*) (Lin et al., 1998; Rakhit et

Cargos membranaires	Caractéristiques	Références
Frizzled	RCPG atypique	Chen et al., 2003
Smoothed	RCPG atypique	Chen et al., 2004
TGF- $\beta$ III R	RTK	Chen et al., 2003
NHE5, NHE1	Echangeurs Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Szabo et al., 2005 Simonin et Fuster., 2010
IGF-1R	RTK	Lin et al., 1998 Girnita et al., 2005
TRPV4	Canal ionique	Shukla et al., 2010
Notch	Protéine à 1TM	Mukherjee et al., 2005
Néphrine	Protéine à 1TM	Quack et al., 2006
Cav2.2	Canal calcique	Puckerin et al., 2006
VE-cadhérine	Protéine d'adhésion	Hebda et al., 2013 Gavard and Gutkind, 2006
Aph-1A	Sous-unité de la $\gamma$ -secrétase	Thathiah et al., 2013

**Tableau 1 : Exemples de protéines de surface n'appartenant pas à la famille des RCPGs conventionnels régulés par les arrestines.**

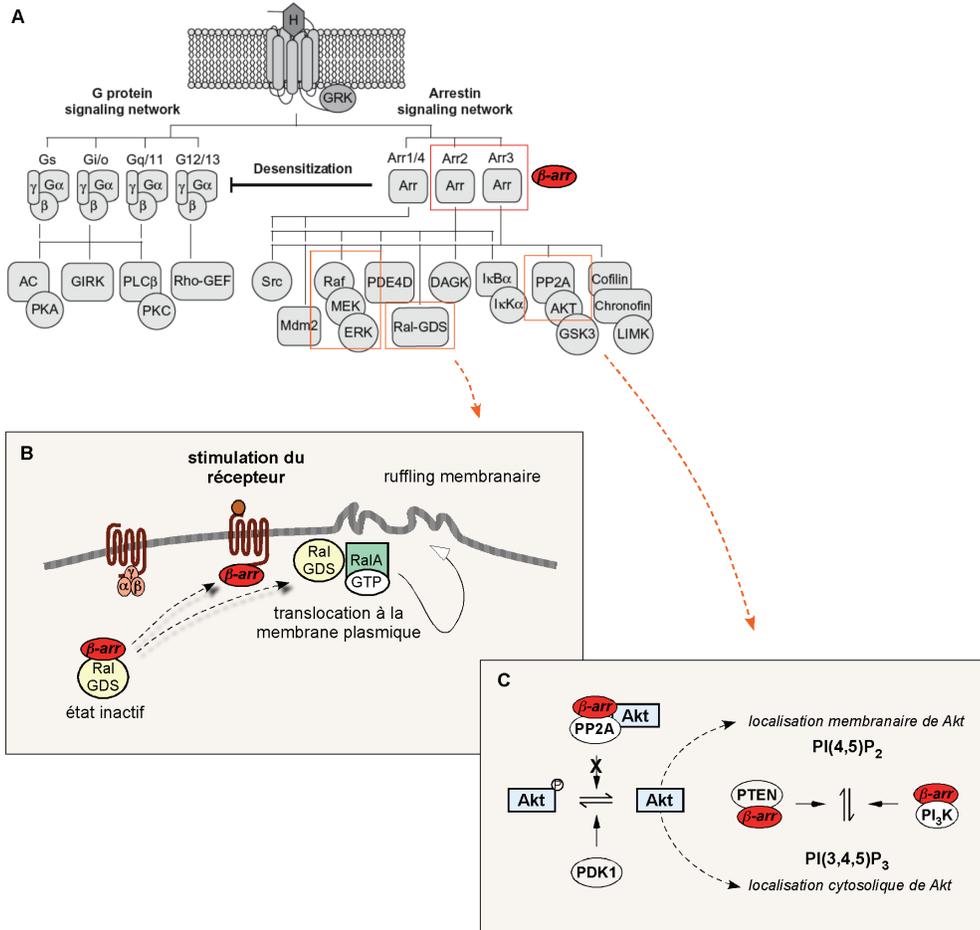
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase, TM : passage transmembranaire.

al., 2001), des récepteurs aux cytokines comme les récepteurs au TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) de type III (Chen et al., 2003b), ou encore des échangeurs sodium/proton de la famille NHE (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger*) (Szabó et al., 2005) (Tableau 1). Pour ces cargos membranaires, et comme décrit précédemment pour les RCPGs, les arrestines semblent reconnaître la forme phosphorylée de leur cible. En revanche, dans le cas de la néphrine ou encore du canal calcium voltage-dépendant Ca<sub>v</sub>2.2, une interaction a été décrite avec la forme non phosphorylée des protéines (Puckerin et al., 2006; Quack et al., 2006). Dans la plupart des cas, la liaison des arrestines à ces cargos membranaires s'accompagne de leur internalisation et de leur dégradation dans la voie endocytaire. La  $\beta$ -arrestine 1 sert d'intermédiaire pour l'ubiquitination de NHE1, TRPV4 (*Transient receptor potential cation channel V4*) ou encore IGF-1R permettant le recrutement des E3 ubiquitine ligases AIP4, Nedd4-1 ou Mdm2 respectivement (Girnita et al., 2005; Shukla et al., 2010; Simonin and Fuster, 2010).

Aussi, chez la drosophile, la protéine Kurtz, unique homologue de  $\beta$ -arrestine chez cet organisme, a été impliqué dans la régulation du récepteur Notch. La signalisation en aval de ce récepteur contrôle divers processus développementaux et intervient dans de nombreuses pathologies humaines telles que le cancer ou des dysfonctionnement du système cardiovasculaire et immunitaire (Aster, 2014). Après interaction avec ses ligands, le récepteur Notch est clivé en 2 peptides dont l'un transloque dans le noyau permettant une réponse cellulaire adaptée par transcription de gènes spécifiques (Bray, 2006). En l'absence d'activation, Notch est constitutivement internalisé et dégradé dans la voie lysosomale, dégradation dépendante de son ubiquitination par l'ubiquitine ligase Deltex, l'homologue de Itch chez les Mammifères (Chastagner et al., 2008; Wilkin et al., 2004). Des études révèlent qu'en l'absence de Kurtz, Notch est accumulé à la surface de la cellule provoquant une sur-activation des voies de signalisation Notch-dépendantes (Mukherjee et al., 2005). Kurtz interagit avec Notch et Deltex et sert de protéine adaptatrice permettant l'ubiquitination et la dégradation subséquente de Notch (Matsuno et al., 1995; Mukherjee et al., 2005). Nous verrons par la suite que les  $\beta$ -arrestines de Mammifères, en partenariat avec les arrestines non conventionnelles, contrôlent également le devenir de Notch (Paragraphes III.2.2 et III.3.3).

## 2.2. Rôle des arrestines dans la régulation de la signalisation intracellulaire

A travers leur rôle de régulateur des RCPGs, les arrestines participent à la régulation des voies de signalisation en aval de ces récepteurs, notamment en inhibant les voies dépendantes des protéines G hétéro-trimériques. Depuis une quinzaine d'année, de nombreux exemples de la littérature montrent que les arrestines contrôlent également diverses voies de signalisation indépendante de protéines G hétéro-trimériques (Figure 9).



**Figure 9 : Rôle des arrestines dans la signalisation cellulaire.**

**A. Voies de signalisation activées par les RCPGs** (extrait de Luttrell and Miller, 2013). Suite à leur activation, les RCPGs peuvent activer différentes voies de signalisation dépendantes des petites protéines G et des arrestines. Les principaux acteurs de ces voies sont détaillés. **B. Arrestines et petites protéines G.** A l'état basal, le complexe Ral-GDS/ $\beta$ -arrestine est retrouvé dans le cytosol. Suite à l'activation du récepteur fMLP, les  $\beta$ -arrestines permettent le recrutement de Ral-GDS à la membrane plasmique où elle va activer RalA. L'activation de RalA conduit au réarrangement du cytosquelette et à la migration cellulaire. **C. Arrestines et voie Akt/PI<sub>3</sub>K.** La  $\beta$ -arrestine 2 interagit avec Akt et PP2A conduisant à la perte de l'interaction Akt/PP2A et empêchant l'inhibition de Akt par déphosphorylation. Les  $\beta$ -arrestines interagissent également avec la PI<sub>3</sub>K et PTEN permettant de réguler la formation de PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique nécessaire pour permettre la localisation de Akt au niveau de cette membrane, essentielle pour son activation par PDK1.

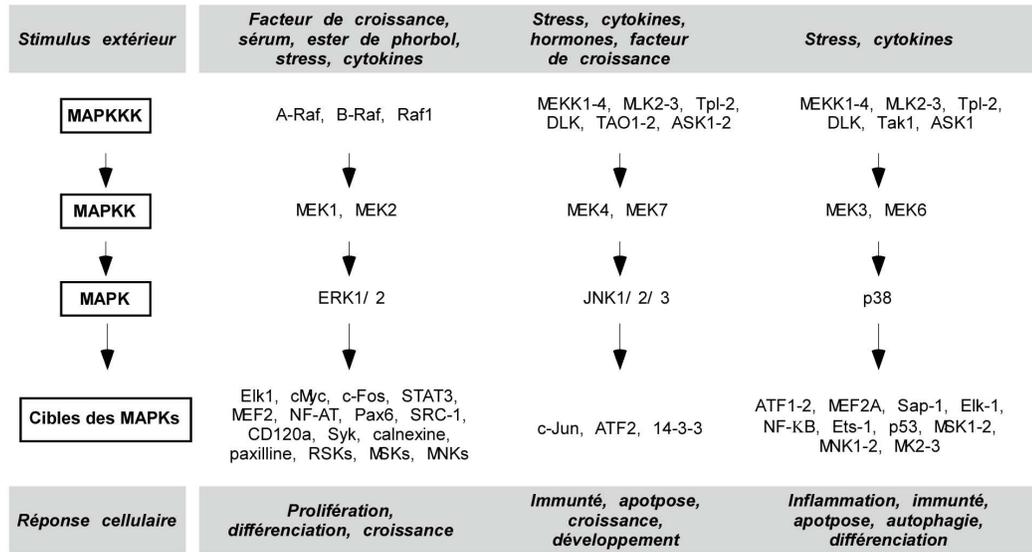
### 2.2.1. Activation des petites protéines G par les $\beta$ -arrestines

Plusieurs équipes se sont intéressées au rôle des arrestines dans l'activation des petites protéines G (ou GTPase) (Claing, 2013). Cette classe de protéines (qui inclut les protéines Ras, Rho, Rab, ARF et Ran) est activée par les GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), permettant l'échange de leur GDP en GTP et inhibée par les GAP (*GTPase-activating protein*), jouant le rôle inverse, en réponse à divers stimuli. Précédemment, nous avons mentionné la capacité des  $\beta$ -arrestines à interagir avec une de ces petites protéines G, la protéine ARF6 (Paragraphe II.2.1.1). Des travaux ont également montré un rôle des  $\beta$ -arrestines dans la régulation de la protéine *Ras-like* RalA, suite à l'activation des récepteurs à l'angiotensine ou au fMLP (*formyl-Met-Leu-Phe*) (Bhattacharya et al., 2002; Godin et al., 2010). Aucune étude n'a démontré une interaction directe RalA/arrestine mais, par contre, les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 sont capables d'interagir avec l'activateur de RalA, Ral-GDS (Bhattacharya et al., 2002; Kim et al., 2010). Après la stimulation du récepteur au fMLP, le complexe  $\beta$ -arrestine/Ral-GDS, présent dans le cytosol, se dissocie et Ral-GDS transloque à la membrane plasmique conduisant à l'activation de RalA et au réarrangement du cytosquelette d'actine (Figure 9.B) (Bhattacharya et al., 2002). Malgré la dissociation du complexe, le recrutement de Ral-GDS à la membrane est dépendant des arrestines, par un mécanisme encore inconnu. Des résultats similaires ont été obtenus pour le récepteur à l'angiotensine dont la stimulation aboutit à l'activation de la phospholipase C (PLC) et la production d'IP<sub>3</sub>. L'activation de la PLC est dépendante de RalA et nécessite l'intervention des  $\beta$ -arrestines qui permettent la translocation de Ral-GDS à la membrane plasmique (Godin et al., 2010).

Les arrestines participent également à la régulation des petites protéines G de type Rho, bien décrites pour leur rôle dans la régulation du réarrangement du cytosquelette (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Kaibuchi et al., 1999). En effet, suite à l'activation du récepteur à l'angiotensine II 1A, la  $\beta$ -arrestine 1 est nécessaire pour permettre une activation optimale de RhoA et la formation de fibres de stress (Anthony et al., 2011; Barnes et al., 2005). Les travaux d'Anthony *et al.* ont montré que la  $\beta$ -arrestine 1 est en fait capable d'interagir avec la protéine ARHGAP21, GAP de RhoA, et que le complexe arrestine/ARHGAP21 facilite l'activation de RhoA (Anthony et al., 2011). Dans un contexte différent, une étude a montré que la  $\beta$ -arrestine 2 interagit avec RhoA et participe aussi à son activation permettant les mouvements d'extension – convergence et la polarisation cellulaire lors du développement embryonnaire chez le Xénope (Kim and Han, 2007).

Enfin, les arrestines participent aussi à la régulation de Cdc42, par désactivation, en aval des récepteurs au TGF- $\beta$ 3 et des récepteur PAR-2 (*protease activated receptor 2*), inhibant ainsi la migration cellulaire et l'activité PI<sub>3</sub>K, respectivement (Mythreye and Blobel, 2009; Wang et al., 2007a). Plusieurs exemples décrivent également le rôle des arrestines dans la signalisation d'autres

A



B

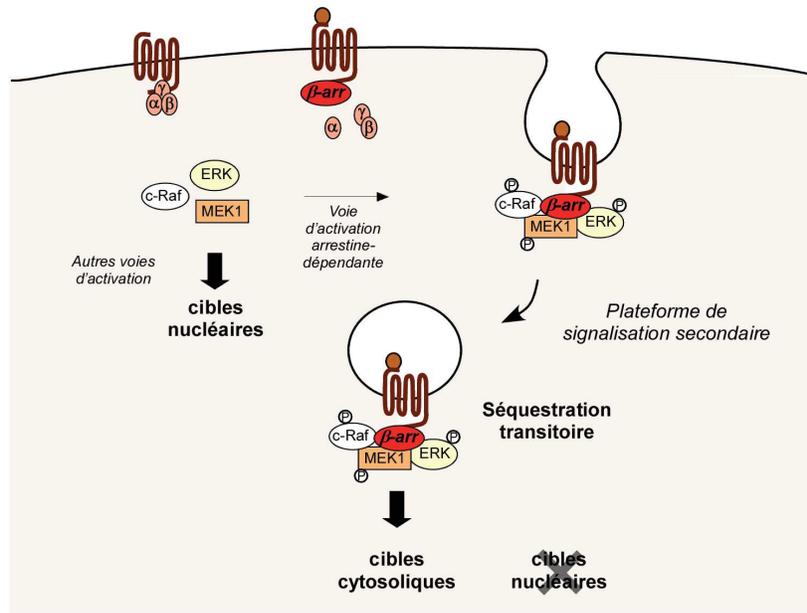


Figure 10 : Régulation des voies MAPKs par les arrestines.

**A. Cascades de signalisation des MAPK.** Les voies des MAPKs sont activées suite à un stimulus du milieu extérieur qui induit une cascade de phosphorylation. Les MAPKKKs sont phosphorylées et phosphorylent à leur tour des MAPKKs qui permettent la phosphorylation des MAPKs. Les MAPKs vont ensuite phosphoryler une variété de protéines dont d'autres protéines kinases ou des facteurs de transcription qui permettent une réponse adaptée de la cellule. Les acteurs des voies ERKs, JNK et p38 qui interviennent aux différentes étapes de la cascade sont détaillés. **B. Régulation de ERK par les  $\beta$ -arrestines.** Après activation du RCPG, les  $\beta$ -arrestines permettent son internalisation et le recrutement de c-Raf1, MEK1 et ERK1/2 au niveau des endosomes. La formation du complexe conduit à l'activation de ERK1/2 et à sa séquestration sur les endosomes influençant la nature des cibles qui vont être activées.

GTPases comme Rac1, associées aux voies des MAPKs, et seront développés dans le paragraphe suivant.

### 2.2.2. Régulation des voies MAPK par les arrestines

La voie des MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) est l'une des cascades de signalisation les plus importante de la cellule, activée en réponse à divers stimuli et permettant la régulation de processus cellulaires essentiels tels que la migration cellulaire, la croissance ou encore l'apoptose. Ces sérine/thréonine kinases sont phosphorylée par des MAPK kinases (MAPKK), elles même activées par des MAPK kinase kinases (MAPKKK) (Figure 10.A). Une fois phosphorylée, les MAPKs transloquent dans le noyau pour activer certains facteurs de transcription ou activent des cibles solubles directement dans le cytosol. Chez les Mammifères, 5 groupes de MAPK sont répertoriés comprenant ERK1/2 (*Extracellular regulated kinase 1 et 2*), p38, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), ERK3 et ERK5.

Dans ces cascades des MAPKs, les arrestines vont jouer un rôle dans leur activation et permettre leur redistribution subcellulaire. Ces rôles ont été largement décrits pour les protéines ERK1 et 2 (ERK1/2) mais aussi pour JNK3 et p38. Les arrestines vont servir de protéine adaptatrice dans l'activation de ces voies, permettant l'assemblage des différents acteurs des voies MAPKs. Plusieurs études montrent que les arrestines interagissent directement avec ERK2, c-Raf1 et MEK1 (Coffa et al., 2011; Hanson et al., 2007a; Meng et al., 2009; Song et al., 2009). Ainsi, la  $\beta$ -arrestine 1 est retrouvée complexée avec c-Raf1 et ERK1/2 activés en aval du récepteur PAR-2 et la  $\beta$ -arrestine 2 avec c-Raf1, ERK1/2 et MEK1 en aval du récepteur AT<sub>1A</sub> (Figure 10.B) (DeFea et al., 2000; Luttrell et al., 2001; Tohgo et al., 2002). De nouveau, les différences de stabilité des interactions récepteur/ $\beta$ -arrestine 1 ou 2 jouent un rôle clé dans la signalisation ERK-dépendante (Tohgo et al., 2003). Alors que suite à l'activation du récepteur AT<sub>1A</sub>, une diminution de l'expression de la  $\beta$ -arrestine 1 provoque une activation moindre de ERK1/2, celle de la  $\beta$ -arrestine 2 induit leur sur-activation (Ahn et al., 2004; Lee et al., 2008). Dans ce cas, seule la  $\beta$ -arrestine 1 sert d'activateur de la signalisation ERK, la  $\beta$ -arrestine 2 étant impliquée uniquement dans la désensibilisation du récepteur, expliquant les phénotypes observés. De façon intéressante, les travaux récents de Coffa *et al.* montrent que l'interaction des arrestines avec ERK2 est dépendante de leur conformation. Ainsi, ERK2 lie préférentiellement la conformation associée aux microtubules des arrestines plutôt que les formes inactive libre et active associé aux récepteurs et permet le recrutement de ERK2 au niveau des microtubules (Coffa et al., 2011; Hanson et al., 2007a).

Par ailleurs, la  $\beta$ -arrestine 2, présente dans le complexe JNK3 - MEK4 - ASK1 après stimulation du récepteur AT<sub>1A</sub>, participe à la phosphorylation de JNK3 par recrutement de sa kinase MEK4 mais aussi à travers son interaction avec DSP MKP7 (*Dual-Specificity Phosphatase MAP Kinase Phosphatase 7*), la phosphatase de JNK3 (Masuda et al., 2001; McDonald et al., 2000; Miller et al.,



2001; Tanoue et al., 2001). Rapidement après la stimulation du récepteur  $AT_{1A}$ , MKP7 se dissocie de l'arrestine, favorisant ainsi l'activation de JNK3 et s'associe de nouveau plus tardivement permettant la déphosphorylation de JNK3 (Willoughby and Collins, 2005). Ainsi la  $\beta$ -arrestine 2 permet de réguler le niveau d'activation de JNK3 par recrutement de sa kinase mais aussi de sa phosphatase.

La formation de ces complexes conduit également à la séquestration de JNK3 et de ERK1/2 dans le cytosol empêchant l'activation de facteur de transcription dans le noyau en faveur de voies de signalisation dépendantes de cibles cytosoliques (Figure 10.B) (Luttrell et al., 2001; McDonald et al., 2000; Scott et al., 2002; Tohgo et al., 2002).

Enfin, malgré une bibliographie moins étoffée, il a été montré que la  $\beta$ -arrestine 1 est aussi retrouvée en complexe avec certains acteurs de la cascade p38, ASK1, MKK3 et p38 elle-même, nécessaire pour l'internalisation du récepteur PAF (*Platelet-activating factor*) et la réorganisation subséquente du cytosquelette (McLaughlin et al., 2006). Deux études montrent aussi que la  $\beta$ -arrestine 2 joue un rôle dans l'activation de la voie p38 en aval des récepteurs CXCR4 et  $\beta$ 2-adrénérique (Gong et al., 2008; Sun et al., 2002). La stimulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique conduit à une activation bi-phasique de p38, précoce et tardive. Alors que la phase tardive implique la PKA (*Protein kinase A*), la présence de la  $\beta$ -arrestine 2 est nécessaire pour permettre la première phase d'activation de p38, qui implique aussi la GTPase Rac1 et la NADPH oxydase, et conduit au réarrangement du cytosquelette (Gong et al., 2008).

### 2.2.3. Régulation de la voie $PI_3K$ -Akt par les arrestines

La voie  $PI_3K$ -Akt est largement décrite pour son rôle dans la protection de la cellule contre l'apoptose. La sérine/thréonine kinase Akt est activée par phosphorylation par la kinase PDK1 (*Phosphatidyl-dependent kinase I*) au niveau de la membrane plasmique et inhibée par la phosphatase PP2A (*Protein phosphatase 2A*). La localisation membranaire de Akt, essentielle pour son activation, est permise grâce à son interaction avec le  $PI(3,4,5)P_3$  (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) à travers son domaine PH (*Plextrin homology*). L'activation de Akt dépend donc aussi de la  $PI_3K$  qui permet d'une part, la génération de  $PI(3,4,5)P_3$  à partir du  $PI(4,5)P_2$  (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) et d'autre part, la translocation de la PDK1 à la membrane plasmique.

Différents travaux montrent que les  $\beta$ -arrestines sont impliquées dans la régulation de cette voie, suite à la stimulation de plusieurs récepteurs comme le récepteur à l'IGF-1, à la dopamine D2 ou encore PAR-2, notamment à travers la capacité de la  $\beta$ -arrestine 2 à interagir avec Akt et sa phosphatase PP2A (Figure 9.C) (Beaulieu et al., 2005; Povsic et al., 2003; Wang et al., 2007b).



Par ailleurs, en régulant la conversion du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en PI(4,5)P<sub>2</sub>, la phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), au même titre que la PI<sub>3</sub>K, participe à la régulation de la signalisation Akt. Les travaux de Lima-Fernandes *et al.* ont montré que les β-arrestines 1 et 2 interagissent avec le domaine C2 de PTEN *in vivo* et que cette interaction est suffisante pour activer son activité lipide phosphatase *in vitro* (Lima-Fernandes *et al.*, 2011). Dans la cellule, la signalisation RhoA-dépendante est décrite pour stimuler l'activité catalytique de PTEN. Cette régulation est en partie médiée en favorisant l'association PTEN-arrestines *in vitro*. Une augmentation de cette interaction est également montrée *in vivo* suite à l'activation du récepteur à l'acide lysophosphatidique (LPA1-R). Ainsi en interagissant avec PTEN et la PI<sub>3</sub>K (Wang and DeFea, 2006) qui contrôle la formation de PI(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique, les β-arrestines régulent l'activation de Akt (Figure 9.C).

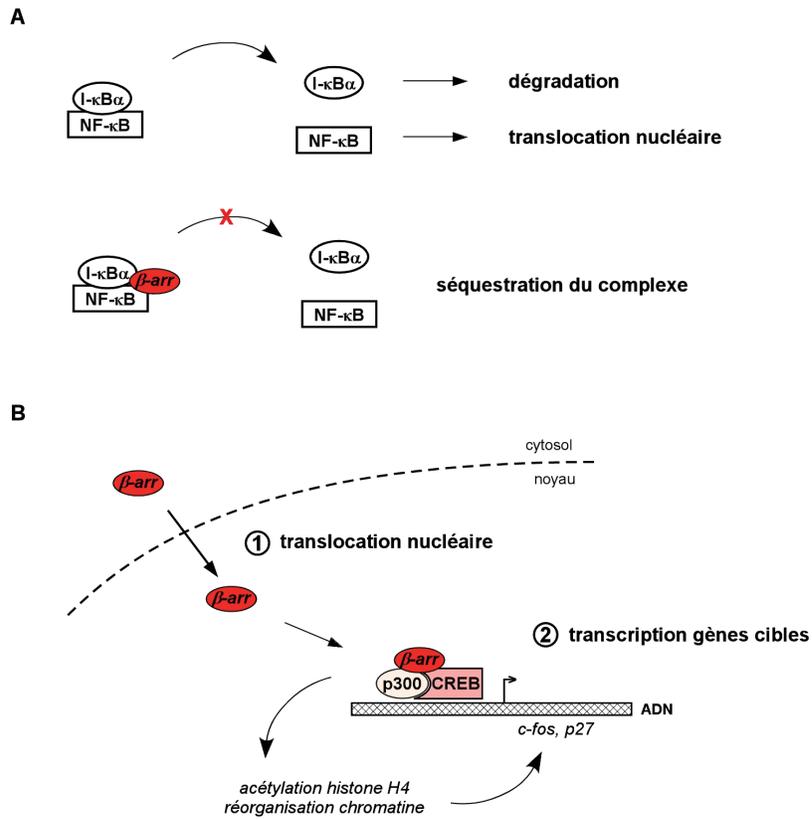
### 2.3. Régulation du cytosquelette par les arrestines

De part leur régulation des voies de signalisation dépendantes des MAPKs, notamment RhoA ou RalA, les arrestines participent indirectement au réarrangement du cytosquelette d'actine (Anthony *et al.*, 2011; Barnes *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2002; Godin *et al.*, 2010). Plusieurs études montrent que les arrestines participent de façon plus directe à la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine à travers son interaction avec certains régulateurs de la polymérisation de l'actine.

En effet, les β-arrestines sont capables d'interagir avec la filamine en aval du récepteur AT<sub>1A</sub> où elles pourraient participer au recyclage de molécules d'adhésion avec la participation des protéines ERK1/2 (Scott *et al.*, 2006) et avec la cofiline, protéine essentielle pour la formation de nouveaux filaments d'actine notamment pendant la migration cellulaire (Oser and Condeelis, 2009; Wang *et al.*, 2007c), ainsi que ses régulateurs, la LIMK (*Lin11 Isl-1 Mec-3 kinase*), slingshot et la chronophine (Xiao *et al.*, 2010; Zoudilova *et al.*, 2007, 2010). La cofiline est activée par déphosphorylation par les phosphatases slingshot et chronophine et par inhibition de sa kinase LIMK. Alors que la β-arrestine 2 facilite la déphosphorylation de la cofiline en interagissant directement avec slingshot, la chronophine et la cofiline elle-même, la β-arrestine 1 inhibe sa phosphorylation par interaction avec la LIMK. A travers leur interaction avec ces régulateurs, les β-arrestines permettent ainsi l'activation de la cofiline et la formation de fibre de stress, en aval de 2 RCPGs, les récepteurs PAR-2 et AT<sub>1A</sub> (Xiao *et al.*, 2010; Zoudilova *et al.*, 2007, 2010).

### 2.4. Régulation de la transcription par les arrestines

En plus de leur localisation cytoplasmique depuis laquelle elles peuvent transloquer sur la membrane plasmique et la voie endocytaire, les β-arrestines peuvent transiter dans le noyau en



**Figure 11 : Régulation de la transcription génique par les  $\beta$ -arrestines.**

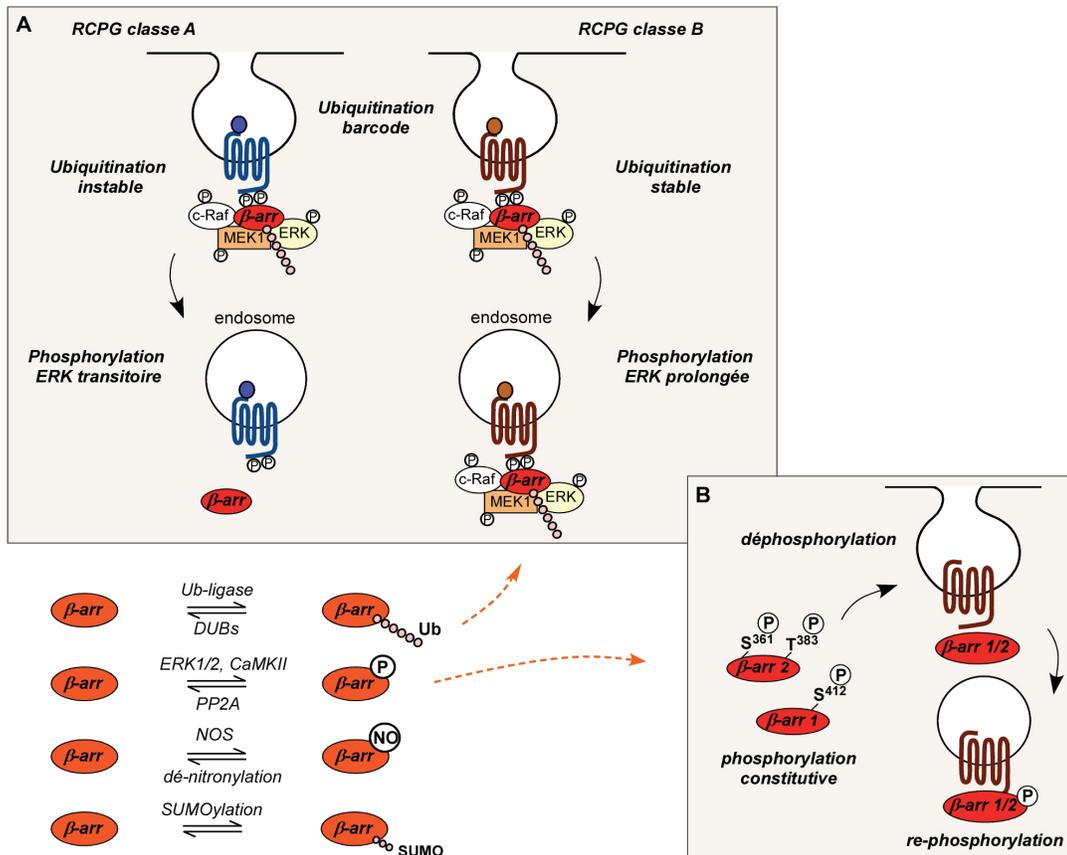
**A.** Les  $\beta$ -arrestines régulent la transcription par séquestration de partenaires protéiques. Dans le cas du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, les  $\beta$ -arrestines interagissent avec NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B $\alpha$  et séquestrent le complexe dans le cytosol empêchant la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. **B.** La  $\beta$ -arrestine 1 active la transcription de gènes dépendant de CREB. La stimulation de certains récepteurs aux opiacés provoque la translocation nucléaire de la  $\beta$ -arrestine 1 qui participe alors à la formation du complexe p300/CREB permettant la réorganisation de la chromatine et la transcription de gènes cibles tels que *c-fos* ou *p27*.

réponse à des signaux spécifiques grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) (Hoepfner et al., 2012; Scott et al., 2002; Wang et al., 2003a). Ce signal d'import nucléaire a été localisé sur la région charnière basique K<sup>157</sup>-K<sup>170</sup> de la  $\beta$ -arrestine 1, conservée chez la  $\beta$ -arrestine 2 (Hoepfner et al., 2012). De façon intéressante, ce site correspond, au moins en partie, au site secondaire de liaison à l'IP<sub>6</sub> qui permet l'oligomérisation des  $\beta$ -arrestines (voir chapitre I.3.2). Cette liaison à l'IP<sub>6</sub> et l'état oligomérique pourraient modifier l'accessibilité du site de translocation dans le noyau et réguler ainsi les fonctions nucléaires des  $\beta$ -arrestines.

A la différence de la  $\beta$ -arrestine 1, la  $\beta$ -arrestine 2 possède une séquence d'export nucléaire (NES) <sup>388</sup>VxxxFxxLxL localisée sur l'extrémité C-terminale de la protéine qui maintient la protéine sous une forme extranucléaire (Scott et al., 2002). L'inhibition par la leptomycine B de la machinerie d'export impliquant la chaperone CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) conduit à l'enrichissement de la  $\beta$ -arrestine 2 dans le noyau (Scott et al., 2002). Dans certaines conditions physiologiques, la  $\beta$ -arrestine 2 peut néanmoins s'accumuler dans le noyau. C'est le cas notamment dans les spermatozoïdes après stimulation des récepteurs olfactifs hOR 17-4 (Neuhaus et al., 2006).

Ces propriétés permettent aux  $\beta$ -arrestines différents types de régulation de la réponse transcriptionnelle : 1) une régulation indirecte par la séquestration de régulateurs de facteurs de transcription conduisant à un changement d'activité ou de distribution subcellulaire, des facteurs de transcription cibles, 2) une régulation directe par interaction avec la machinerie transcriptionnelle au niveau du noyau (Figure 11).

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que les formes extranucléaires des  $\beta$ -arrestines sont capables d'interagir avec de nombreux effecteurs susceptibles pour certains d'entre eux de réguler l'activité de facteurs de transcription. C'est le cas notamment des MAPKs. Les  $\beta$ -arrestine 1 et 2 sont également capables, en réponse à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, d'interagir avec I $\kappa$ B $\alpha$ , un régulateur négatif du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans la réponse auto-immune, l'inflammation, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. La liaison aux arrestines conduit à la séquestration du complexe I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B dans le cytosol, empêchant la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation nucléaire du facteur de transcription nécessaire à la réponse transcriptionnelle NF- $\kappa$ B dépendante (Figure 11.A) (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). De même, l'activation du récepteur TLR-IL1R (*Toll-like receptor interleukine-1 receptor*) conduit à un complexe entre les  $\beta$ -arrestines et la protéine TRAF6, empêchant l'auto-ubiquitination de TRAF6 et l'activation de NF- $\kappa$ B et d'un autre facteur de transcription, AP1 (Wang et al., 2006). La  $\beta$ -arrestine 2 est également capable d'activer la réponse transcriptionnelle par la séquestration d'un régulateur dans le cytoplasme loin de sa cible nucléaire. C'est le cas de l'ubiquitine ligase Mdm2 qui, dans des conditions basales, est majoritairement localisée dans le noyau où elle assure l'ubiquitination du facteur de transcription p53,



**Figure 12 : Régulation des arrestines par modifications post-traductionnelles.**

Les arrestines subissent différentes modifications post-traductionnelles (ubiquitination, phosphorylation, nitrosylation et SUMOylation) qui régulent certaines de leurs fonctions. **A. Ubiquitination des arrestines et devenir des RCPGs.** Suite à l'activation des RCPG, les arrestines sont recrutées sur la queue phosphorylée du récepteur et sont ubiquitinées. Associées aux RCPGs de classe B, l'ubiquitination des arrestines est stable provoquant un maintien du complexe sur les endosomes favorisant l'activation de voie de signalisation au niveau de ces endosomes (par exemple la voie ERK). En revanche, pour les RCPGs de classe A, l'ubiquitination des arrestines est moins stable conduisant à la dissociation rapide du complexe RCPG/arrestine et empêchant l'activation de voie de signalisation au niveau de la voie endocytaire. **B. Phosphorylation des arrestines et internalisation des RCPGs.** Dans le cytosol, les β-arrestines sont constitutivement phosphorylées, sur les résidus S<sup>412</sup> pour la β-arrestine 1 et S<sup>361</sup> et T<sup>383</sup> pour la β-arrestine 2. Suite à l'activation du RCPG, les arrestines sont recrutées sur la queue phosphorylée du récepteur et sont rapidement déphosphorylées et peuvent alors recruter certains acteurs de la machinerie d'endocytose permettant l'internalisation du RCPG. Après internalisation, les β-arrestines sont rapidement déphosphorylées.

permettant ainsi sa dégradation. L'activation des récepteurs aux opiacés ou des récepteurs à la bradykinine conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle p53-dépendante du fait de la rétention de Mdm2 en complexe avec la  $\beta$ -arrestine 2 dans le cytoplasme (Shenoy et al., 2001; Wang et al., 2003b).

Les  $\beta$ -arrestines sont également capables de réguler l'activité transcriptionnelle en agissant directement dans le noyau. C'est le cas de la  $\beta$ -arrestine 1 qui, suite à la stimulation de certains récepteurs aux opiacés (les récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$ ), transloque massivement dans le noyau et participe à la formation d'un complexe nucléaire sur la région promotrice de deux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, les gènes *c-fos* et *p27/kip* (Kang et al., 2005). Ce complexe qui inclut le facteur de transcription CREB et l'histone acétyltransférase p300, permet le remodelage local de la chromatine par acétylation de l'histone H4 et l'augmentation de la transcription des gènes cibles (Figure 11.B). A noter que la stimulation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques ou du récepteur  $\mu$  aux opiacés n'induit pas de réponse similaire.

### 3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des arrestines

#### 3.1. Modifications post-traductionnelles

##### 3.1.1. Ubiquitination

L'implication de l'ubiquitination comme mode de régulation des arrestines a été initialement mise en évidence sur la  $\beta$ -arrestine 2 de Mammifères (Shenoy et al., 2001). En réponse à l'activation de divers RCPGs, les  $\beta$ -arrestines sont en effet poly-ubiquitinées et leur profil d'ubiquitination corrèle avec l'appartenance des récepteurs RCPGs aux classes A ou B (voir paragraphe II.2.1.1) (Perroy et al., 2004; Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy et al., 2001). Les  $\beta$ -arrestines peuvent faire l'objet (1) d'une ubiquitination transitoire qui disparaît dans les quelques minutes qui suivent l'internalisation du récepteur dans le cas des récepteur de classe A ou (2) d'une ubiquitination soutenue qui peut durer plus d'une heure après la stimulation du récepteur et son internalisation dans le cas des récepteurs de classe B (Figure 12.A).

Le profil de phosphorylation du récepteur semble en partie dicter le profil d'ubiquitination des arrestines associées qui détermine la durée de l'interaction arrestine-récepteur. Ainsi, l'expression d'une protéine chimère  $\beta$ -arrestine-ubiquitine, mimant une protéine constitutivement ubiquitinée, conduit à un complexe stable même avec des récepteurs de classe A (mimant le comportement des récepteurs de classe B) alors que l'expression d'une  $\beta$ -arrestine mutée sur l'ensemble des lysines ubiquitinables ( $\beta$ -arrestine 0K) ne s'associe que de façon transitoire avec les récepteurs de classe B.



Au delà d'un rôle dans la stabilisation de l'interaction avec le RCPG activé, l'utilisation de ces mêmes mutants a permis d'établir que l'ubiquitination des  $\beta$ -arrestines joue un rôle clé dans l'internalisation du récepteur dans la voie endocytaire en favorisant l'interaction avec la machinerie d'endocytose et dans l'activation de cascades de signalisation spécifique du récepteur internalisé (Shenoy et al., 2007). A titre d'exemple, l'expression d'une  $\beta$ -arrestine constitutivement ubiquitinée augmente l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et son maintien sur des endosomes, alors qu'un mutant non ubiquitinable est incapable de promouvoir l'internalisation ni du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (classe A) ni du récepteur à la vasopressine de type 2 (classe B).

Les résidus ubiquitinés en réponse à l'activation du récepteur  $AT_{1A}$  ont été identifiés comme étant les lysines  $K^{11}$  et  $K^{12}$  sur la  $\beta$ -arrestine 2, ces mêmes lysines impliquées comme senseur de phosphate dans la première étape de liaison des RCPGs activés (Shenoy and Lefkowitz, 2005). Cependant, ces lysines ne semblent pas être des cibles dans le cas notamment du récepteur à la vasopressine, lequel activé permettrait l'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine 2 sur les lysines  $K^{18}$ ,  $K^{107}$ ,  $K^{108}$ ,  $K^{207}$  et  $K^{296}$  (Shenoy and Lefkowitz, 2005). Ces résultats suggèrent la participation d'ubiquitine ligases distinctes ou des modulations au niveau de la conformation adoptée par les  $\beta$ -arrestines susceptibles de modifier l'accessibilité de certaines lysines. Plusieurs ubiquitine ligases ont été identifiées comme partenaires des  $\beta$ -arrestines, telles que AIP4 ou Nedd4 mais jusque là, seule l'ubiquitine ligase E3 Mdm2 a été impliquée dans leur propre ubiquitination (Bhandari et al., 2007; Shenoy et al., 2001, 2008).

Par ailleurs, la cinétique de dé-ubiquitination corrèle avec la dissociation des  $\beta$ -arrestines de leurs récepteurs activés et implique l'ubiquitine protéase USP33 (Shenoy et al., 2009). Dans le cas du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (classe A), comme mentionné précédemment, USP33 est associée au récepteur en l'absence de ligand, donc bien avant le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et serait transférée sur l'arrestine activée suite à la stimulation du récepteur, conduisant à sa dé-ubiquitination et sa dissociation rapide du récepteur après internalisation. Dans le cas du récepteur à la vasopressine (classe B), il semble que la conformation adoptée par la  $\beta$ -arrestine suite à l'activation du récepteur ne soit pas propice à la liaison d'USP33, repoussant la phase de dé-ubiquitination à une étape plus tardive du trafic (Shenoy et al., 2009).

Comme dans le cas de la spécificité dépendante du profil de phosphorylation des récepteurs activés – *phosphorylation barcode* – l'état d'ubiquitination des arrestines semble également dicter le devenir des RCPGs. Ces profils d'ubiquitination distincts (*ubiquitination barcode*), spécifiques des récepteurs, pourrait expliquer la diversité de comportements observée pour les RCPGs.



### 3.1.2. Sumoylation

Parallèlement à leur ubiquitination, les travaux de Wyatt *et al.* ont montré que les arrestines pouvaient également être sumoylées en réponse à l'activation de RCPGs (Wyatt et al., 2011). SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) est une petite protéine de 12 kDa structurellement proche de l'ubiquitine et son addition sur des protéines cibles par des SUMO-ligases au niveau de sites consensus de type  $\Phi$ -K-X-D/E (où  $\Phi$  est un résidu aliphatique et K la lysine acceptatrice engagée dans une liaison isopeptidique avec SUMO) peut conduire à une régulation de la fonction de la protéine sumoylée.

Bien que la  $\beta$ -arrestine 2 présente 2 sites consensus de sumoylation (K<sup>295</sup> et K<sup>400</sup>), la lysine K<sup>400</sup> localisée sur la queue C-terminale de l'arrestine semble être le site principal de sumoylation en réponse à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Sa mutation en arginine conduit non seulement à une perte de sumoylation mais interfère également avec l'internalisation du récepteur. Les travaux de Wyatt *et al.* suggèrent que la sumoylation de l'arrestine faciliterait l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ 2 de la protéine AP-2 (Wyatt et al., 2011). Un alignement de séquences des arrestines de différentes espèces indique que cette lysine K<sup>400</sup> n'est pas conservée de façon systématique, notamment chez l'homme (Aubry and Klein, 2013). En revanche, la lysine K<sup>295</sup> est retrouvée très conservée, suggérant que ce site pourrait faire l'objet d'une régulation par sumoylation de façon générale chez les arrestines visuelles et les  $\beta$ -arrestines. Ce site se localise en dehors de la queue C-terminale, suggérant que cette modification post-traductionnelle n'interfererait pas avec le site de liaison à l'AP-2.

### 3.1.3. Phosphorylation

Plusieurs travaux ont fait état d'une régulation des arrestines par phosphorylation. Dans le cytosol, les  $\beta$ -arrestines sont sous une forme constitutivement phosphorylées et sont rapidement déphosphorylées suite à leur recrutement à la membrane plasmique sur leur RCPG cible activé (Figure 12.B) (Lin et al., 1997, 1999). La  $\beta$ -arrestine 1 est phosphorylée sur la sérine S<sup>412</sup> par les MAPK ERK1/2 (Lin et al., 1999). Cette même sérine S<sup>412</sup> peut également être phosphorylée par la protéine kinase GRK5 en réponse à l'activation des récepteurs à la sérotonine 5-HT4 (Barthet et al., 2009). Ce site n'est pas conservé chez la  $\beta$ -arrestine 2 qui est en revanche phosphorylée sur la thréonine T<sup>383</sup> (site primaire) par la caséine kinase II et sur la sérine S<sup>361</sup> (site secondaire) (numérotation correspondant à la protéine de rat) (Kim et al., 2002; Lin et al., 2002). Par ailleurs, la protéine phosphatase PP2A identifiée comme partenaire de la  $\beta$ -arrestine 2 dans des conditions d'activation de divers récepteurs dont le récepteur à l'angiotensine II AT<sub>1a</sub>R et celui à la dopamine D<sub>2</sub>R pourrait assurer cette déphosphorylation (Beaulieu et al., 2005; Xiao et al., 2007). Après internalisation sur les endosomes, les arrestines sont rapidement ramenées à leur état phosphorylé.



L'identification des sites de phosphorylation et leur mutation ont permis de mettre à jour une régulation phosphorylation-dépendante différente pour les 2  $\beta$ -arrestines. Les 2 protéines sont rapidement déphosphorylées après stimulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique mais le rôle de cette déphosphorylation semble complètement différent dans les 2 cas. Alors que l'état déphosphorylé de la  $\beta$ -arrestine 1 est nécessaire pour permettre l'internalisation du récepteur et son interaction avec ses partenaires endocytaires (clathrine, AP-2) ou la protéine kinase Src, cet état n'interfère avec aucun de ces aspects pour la  $\beta$ -arrestine 2 (Kim and Benovic, 2002; Lin et al., 1997, 1999; Luttrell et al., 1999). Les arrestines visuelles sont également régulées par phosphorylation. En réponse à la lumière, la sérine S<sup>366</sup> est phosphorylée par la kinase calcium/calmoduline-dépendante CaMKII et comme dans le cas de la  $\beta$ -arrestine 2, cette phosphorylation empêche l'interaction avec la clathrine (Kahn and Matsumoto, 1997; Kiselev et al., 2000; Matsumoto et al., 1994).

Parallèlement à ce cycle de phosphorylation/déphosphorylation sur S/T régulant l'accès à la queue cytoplasmique, les travaux de Marion *et al.* ont mis en évidence une autre boucle de régulation au niveau de l'extrémité N-terminale de la  $\beta$ -arrestine 1. Alors que l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique conduit à la déphosphorylation de la sérine S<sup>412</sup>, elle induit également la phosphorylation de la tyrosine Y<sup>54</sup> par la protéine kinase Src (Marion et al., 2007). Le résidu Y<sup>54</sup> est situé dans le site Y/FVTL de liaison à la chaîne  $\mu$  des adaptines AP-2. La mutation Y<sup>54</sup>F augmente l'interaction de la  $\beta$ -arrestine 1 avec la chaîne  $\mu$  et également l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique. La phosphorylation de ce résidu pourrait ainsi moduler les propriétés de cette arrestine. Chez la  $\beta$ -arrestine 2 de Mammifères (comme chez la  $\beta$ -arrestine de Drosophile ou de Xénope), cet acide aminé est remplacé par une phénylalanine. Cette substitution ainsi que les rôles distincts de la phosphorylation sur S/T pourraient expliquer les différences observées entre les deux  $\beta$ -arrestines en terme d'efficacité d'interaction avec AP-2 et d'internalisation des RCPGs.

#### 3.1.4. Nitrosylation

Depuis récemment, des travaux montrent qu'en dehors de la phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitination, la  $\beta$ -arrestine 2 subit également des modifications par nitrosylation. Cette modification consiste en l'incorporation d'un groupement oxyde nitrique (NO) sur un atome de soufre par la NO synthase (NOS). La  $\beta$ -arrestine 2 est nitrosylée sur la cystéine C<sup>410</sup>, localisée sur la queue C-terminale de la protéine suite à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique (Ozawa et al., 2008). Ce site de nitrosylation n'est pas conservée chez la  $\beta$ -arrestine 1. De façon intéressante, la nitrosylation de la  $\beta$ -arrestine 2 semble jouer le même rôle que la phosphorylation de la  $\beta$ -arrestine 1 sur S<sup>412</sup> (absente chez la  $\beta$ -arrestine 2) à savoir le recrutement des acteurs endocytaires AP-2 et clathrine, après le détachement de la NOS. Ainsi, dans le cas de la  $\beta$ -arrestine 1, l'internalisation du



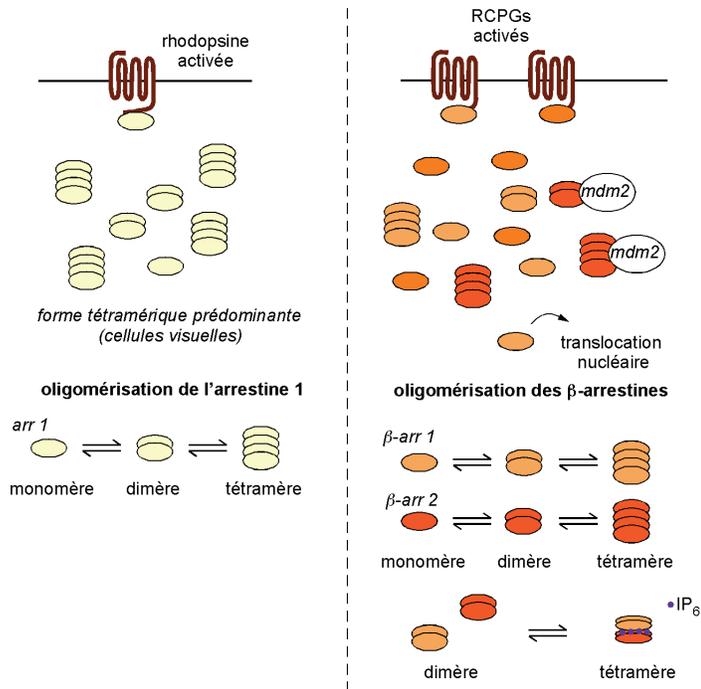
récepteur  $\beta$ 2-adrénergique serait facilitée par la phosphorylation de la protéine, alors que dans le cas de la  $\beta$ -arrestine 2, elle serait plutôt médiée par sa nitrosylation.

### 3.2. Oligomérisation

En dehors de leur régulation par modifications post-traductionnelles, certaines fonctions des arrestines sont régulées par leur état oligomérique. La capacité des arrestines à former des oligomères avait été observée avant même leur caractérisation fonctionnelle comme régulateur des RCPGs, sur l'arrestine visuelle 1 (Wacker et al., 1977). Cette propriété, observable sur la structure cristalline de l'arrestine 1 a été confirmée par diverses approches notamment de SAXS (*small angle X-ray scattering*) ou d'ultracentrifugation analytique (Hanson et al., 2007b; Imamoto et al., 2003; Schubert et al., 1999) et également validée pour les  $\beta$ -arrestines (Milano et al., 2006; Storez et al., 2005; Xiao et al., 2007). Les arrestines sont capables de s'associer sous forme d'homo-dimères et d'homo-tétramères mais également de former des hétéro-oligomères dans le cas des  $\beta$ -arrestines (Figure 13) (Milano et al., 2006; Storez et al., 2005).

Malgré le fort degré de conservation entre les différents membres de cette famille d'arrestines (arrestines visuelles et  $\beta$ -arrestines), il semble néanmoins que l'oligomérisation de ces protéines mette en jeu des mécanismes distincts. L'arrestine 1 des cellules en bâtonnet forme des tétramères dans les conditions de concentrations physiologiques ( $\sim 100 \mu\text{M}$ ) et cette forme tétramérique semble être la forme prédominante (Hanson et al., 2007b; Imamoto et al., 2003). Alors que les 2 formes (tétramérique et monomérique) sont capable de lier les microtubules, seule la forme monomérique est associée à la rhodopsine activée (Hanson et al., 2007a). L'oligomérisation réversible de la protéine pourrait en fait moduler la disponibilité de la protéine vis à vis de son récepteur, la forme tétramérique représentant plutôt une forme de stockage de l'arrestine visuelle.

A la différence de l'arrestine 1, l'arrestine 4 et les  $\beta$ -arrestine 1 et 2 ne s'organisent en oligomères *in vitro* qu'à des concentrations bien supérieures ( $\sim 500$  et  $100 \mu\text{M}$  respectivement) à celles rencontrées dans les cellules (4 et  $0,01 \mu\text{M}$  respectivement). Par contre, l'addition d' $\text{IP}_6$  (inositol hexaphosphate), un inositol polyphosphate très abondant dans le cytosol des cellules (jusqu'à  $100 \mu\text{M}$  dans certains types cellulaires), facilite l'oligomérisation de ces arrestines, faisant de l' $\text{IP}_6$  un régulateur clé *in vivo*. De façon intéressante, l' $\text{IP}_6$  inhibe l'oligomérisation de l'arrestine 1 (Hanson et al., 2008a; Milano et al., 2006). Toutefois, étant donné l'effet de l' $\text{IP}_6$  sur la formation des dimères et des tétramères d'arrestine 1 (augmentation du  $K_D$ dimère de 37 à  $120 \mu\text{M}$  et du  $K_D$ tétramère de 7,5 à  $18 \mu\text{M}$ ), ainsi que les concentrations respectives d'arrestine 1 ( $> 1\text{mM}$ ) et d' $\text{IP}_6$  dans la cellule, l'impact de l' $\text{IP}_6$  sur l'équilibre entre la forme monomérique et oligomérique risque d'être limité à moins de



**Figure 13 : Régulation de la fonction des arrestines par oligomérisation.**  
 L'arrestine visuelle (*arr 1*) est présente majoritairement sous une forme tétramérique, contrairement aux β-arrestines. Seules les formes monomériques des arrestines sont capables d'interagir avec leur récepteurs cibles. Les formes oligomériques de la β-arrestine 1 (*β-arr 1*) permettent leur interaction avec mdm2 et celles de la β-arrestine 2 (*β-arr 2*) empêchent sa translocation nucléaire.

l'intervention d'autres acteurs cellulaires. Ces résultats suggèrent néanmoins une organisation structurale oligomérique distincte pour ces différentes protéines.

Deux sites de liaison à l'IP<sub>6</sub> ont été identifiés chez les β-arrestines, l'un de forte affinité sur le domaine arrestine-C (Kd~0,04 μM) impliquant, pour la β-arrestine 1, les acides aminés K<sup>232</sup>, R<sup>236</sup>, K<sup>250</sup>, K<sup>324</sup> et K<sup>326</sup> et l'autre de plus faible affinité sur le domaine arrestine-N (Kd~2,6 μM) impliquant les résidus K<sup>157</sup>, K<sup>160</sup> et R<sup>161</sup> (Milano et al., 2006). La mutation d'un des deux sites est suffisante pour empêcher la formation de l'oligomère *in vitro*. La structure exacte des oligomères de β-arrestines est encore incertaine. Les résultats des travaux de cristallisation de Milano *et al.* qui proposent que dans l'oligomère, l'IP<sub>6</sub> soit en interaction avec deux monomères, via le site du domaine arrestine-N de l'un et le site du domaine arrestine-C de l'autre, pourrait ne pas refléter complètement la conformation de l'oligomère en solution puisque Hanson *et al.* ont montré que l'IP<sub>6</sub> augmente également l'homooligomérisation de la β-arrestine 2 qui, de plus, nécessite moins d'énergie (Hanson et al., 2008a; Milano et al., 2006). Ainsi, les auteurs proposent plutôt une homo-oligomérisation de deux hétérodimères identiques (Figure 13).

Comme mentionné précédemment, le site de haute affinité localisé dans le domaine arrestine-C correspond également au site de liaison des phosphoinositides membranaires, en interaction avec les β-arrestines suite à la liaison du RCPG activé (Gaidarov et al., 1999). En accord avec cette observation, c'est la forme monomérique des β-arrestines qui lie le récepteur activé. L'affinité des β-arrestines pour l'IP<sub>6</sub> (~μM) est largement inférieure à leur affinité pour les récepteurs activés (~nM) donc l'IP<sub>6</sub> n'entre pas directement en compétition avec les récepteurs (Gurevich et al., 1995; Milano et al., 2006). En revanche, elle est du même ordre que leur affinité pour certains partenaires cellulaires comme les microtubules ou la calmoduline dont les sites de liaison sur l'arrestine se situent aussi sur la même face de la protéine que ceux de l'IP<sub>6</sub> (Hanson et al., 2006a, 2007a; Wu et al., 2006; Xu et al., 2008).

L'oligomérisation des arrestines pourrait ainsi être un régulateur clé de leur fonctionnement en modulant d'une part leur localisation subcellulaire, mais également leur capacité à interagir avec leurs partenaires. Comme précisé dans le paragraphe I.2.4, le site de liaison à l'IP<sub>6</sub> de faible affinité se superpose au site de translocation nucléaire identifié récemment par Hoepfner *et al.* (Hoepfner et al., 2012). En accord avec cette observation, il a été montré que la forme oligomérique de la β-arrestine 1 est plutôt cytosolique dans des cellules non activées et que des formes « constitutivement » monomériques du fait de mutations interférant avec la liaison à l'IP<sub>6</sub> s'accumulent dans le noyau (Milano et al., 2006; Storez et al., 2005). Cette observation toutefois ne s'applique pas à la β-arrestine 2, majoritairement cytosolique du fait de la séquence d'export nucléaire localisée sur l'extrémité C-terminale de la protéine (Scott et al., 2002). Dans le cas de la β-arrestine 1, l'oligomérisation pourrait

Espèce	Arrestines conventionnelles		Arrestines non conventionnelles	
	visuelles	$\beta$ -arrestines	nb	Appellation
<i>H. sapiens</i>	2	2	6	ARRDC ( <b>Arrestin Domain-Containing</b> ) 1 à 5 et TXNIP
<i>D. melanogaster</i>	2	1 (Kurtz)	17	ADCs ( <b>Arrestin Domain-Containing</b> )
<i>C. elegans</i>	1	/	26	ARRD ( <b>Arrestin Domain-Containing</b> )
<i>S. cerevisiae</i>	/		13	Art ( <b>Arrestin related trafficking adaptators</b> ) 1 à 10, Bul1 à 3
<i>D. discoideum</i>	/		6	Adc ( <b>Arrestin-domain containing</b> ) A à F
<i>A. nidulans</i>	/		10	Art ( <b>Arrestin-related trafficking adaptators</b> ) A à G, ApyA, PalF, CreD

**Tableau 2 : Membres « arrestines » chez différents organismes (*H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *D. discoideum* et *A. nidulans*).**  
Le nombre et l'appellation spécifique des arrestines conventionnelles (visuelles et  $\beta$ -arrestines) et non conventionnelles sont indiqués pour chacune des espèces.

assurer l'existence d'un pool cytosolique d'arrestines rapidement mobilisable en cas d'activation de récepteurs membranaires. Par ailleurs, ce mutant monomérique des  $\beta$ -arrestines conserve ses propriétés de liaison à la clathrine, à la protéine AP-2 ou encore à la filamine ainsi que sa capacité à interagir avec des RCPGs activés et médier leur internalisation et activer les MAPKs ERK1/2 (Boullaran et al., 2007; Hanson et al., 2008a, 2008b; Milano et al., 2006). En revanche, la  $\beta$ -arrestine 2 constitutivement monomérique est incapable de lier l'ubiquitine ligase Mdm2 et d'assurer sa relocalisation cytoplasmique, favorisant de ce fait la dégradation Mdm2-dépendante du facteur de transcription p53 (Boullaran et al., 2007).

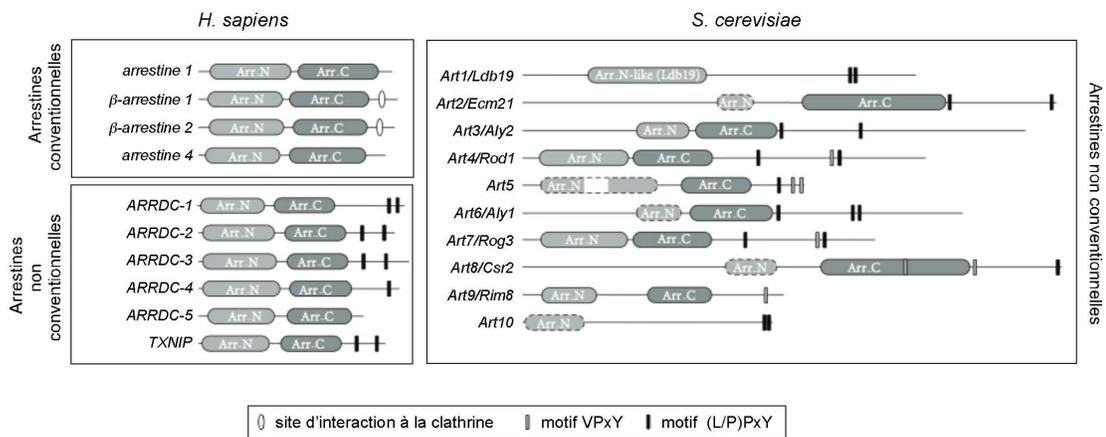
### III. LES ARRESTINES NON CONVENTIONNELLES

En dehors des  $\beta$ -arrestines et arrestines visuelles, comme mentionné précédemment, la famille des arrestines comprend également des arrestines dites non conventionnelles, retrouvées aussi bien chez les Mammifères que chez les nématodes ou encore les organismes moins complexes comme la levure ou encore l'amibe qui ne possèdent d'ailleurs que cette sous-famille d'arrestines. Le tableau 2 récapitule l'ensemble des membres « arrestine » et leur appellation chez différentes espèces. La fonction de ces arrestines non conventionnelles sera abordée dans le paragraphe III.2.

Plusieurs de ces nouveaux membres n'étaient pas connus avant leur rattachement récent au clan des arrestines. C'est le cas notamment de la plupart des représentants chez la drosophile ou le nématode. Par contre, les protéines TXNIP, ARRDC-4 (appelée alors DRH1 pour *down-regulated in advanced hepatocellular carcinoma*) ou encore ARRDC-2 (désignée ILAD-1 pour *induced by lysergic acid diethylamide-1*) avaient fait l'objet d'études spécifiques et leur homologie avec les arrestines conventionnelles avait déjà été rapportée (Chen and DeLuca, 1994; Nichols and Sanders-Bush, 2004; Nishiyama et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). Les travaux sur PalF et CreD chez le champignon filamenteux *Aspergillus nidulans*, quant à eux, font partie des résultats pionniers dans le domaine des arrestines non conventionnelles, mettant en évidence l'existence de membres apparentés aux arrestines conventionnelles chez des organismes non-animaux (Boase and Kelly, 2004; Herranz et al., 2005).

#### 1. Caractéristiques des arrestines non conventionnelles

Alors que l'organisation structurale de l'ensemble des arrestines conventionnelles a été étudiée de façon extensive, seule la protéine TXNIP de Mammifères bénéficie aujourd'hui de données cristallographiques (Hwang et al., 2014; Polekhina et al., 2013). L'essentiel des informations structurales disponibles sur les protéines arrestines non conventionnelles dérive donc de travaux de



**Figure 14 : Structure schématique des arrestines conventionnelles et non conventionnelles présentes chez l'homme et la levure *S. cerevisiae*** (modifiée depuis Becuwe et al., 2012). A noter que les protéines apparentées Bul 1 à 3 ne sont pas représentées.

modélisation à partir de la structure des  $\beta$ -arrestines et des arrestines visuelles (Alvarez, 2008; Aubry et al., 2009). Dans la plupart des cas, la structure prédite indique une organisation en deux domaines constitués exclusivement de brins  $\beta$  formant chacun un sandwich de feuillets  $\beta$ . A la différence des arrestines conventionnelles, l'hélice amphipathique  $\alpha 1$  du domaine arrestine-N, qui participe au maintien des arrestines conventionnelles dans une conformation inactive, n'est pas modélisée de façon systématique, ce qui pose la question de son existence. Par ailleurs, les domaines arrestine-N et -C ne ménageraient pas de cœur polaire, suggérant un mode de fonctionnement distinct pour cette catégorie d'arrestines, au moins pour ce qui est des mécanismes conduisant à leur activation. Ces particularités devront être confirmées avec la résolution de structures cristallines pour ces différents membres du clan arrestine.

Les résultats de structure obtenus sur le domaine arrestine-N seul de TXNIP ou sur la protéine TXNIP complexée à son partenaire, la thioredoxine, confirment effectivement une organisation en deux domaines en feuillets  $\beta$ , similaire à celle des domaines arrestine-N et -C des arrestines conventionnelles. En revanche, l'agencement des deux domaines l'un par rapport à l'autre apparaît très différent, suggérant que TXNIP pourrait adopter une structure globale spécifique, distincte de celle des arrestines conventionnelles, au moins dans certaines conditions (Hwang et al., 2014).

Au delà du cœur arrestine (domaines arrestine-N et -C), les arrestines non conventionnelles présentent une extension souvent C-terminale différente de la queue C-terminale des arrestines conventionnelles, qui s'en distingue dans la plupart des cas par l'absence des sites canoniques de liaison à la clathrine et à la protéine AP-2 décrits chez les arrestines conventionnelles et par la présence d'un ou plusieurs motifs de type [P/L]PxY, généralement absents chez les arrestines conventionnelles (Figure 14). Ces motifs sont connus pour interagir avec les domaines WW, des modules protéiques d'environ 40 acides aminés contenant deux résidus tryptophanes et présents dans un large panel des protéines de structure et de signalisation comme les ubiquitine ligases de la famille HECT (Salah et al., 2012).

## **2. Fonctions des arrestines non conventionnelles**

Du fait de leur découverte plus récente, la littérature concernant les arrestines non conventionnelles est plus limitée. Toutefois, les travaux menés jusqu'à présent sur ces nouveaux membres suggèrent une conservation de fonctions pour ces deux sous-familles de protéines en tant que protéine d'échafaudage, dans l'internalisation et le trafic de divers récepteurs.

P3C2A	AELEKLLDDSFETKKTPL
β-arrestin-1	TPVDTNLIELDTNDDIVFE
β-arrestin-2	VPVDTNLIIEFDNYATDDDI
AP180	ATAWGDLLEGDSLALSSVF
Epsin1	GKESSLMDLADVFTAPAPA
Epsin2	LPQQTTLLDLMDALPSSGPA
AP2B1	GDLGDLNLDLGPVNVFQ
GGA1	PSASVSLDDELMSLGLSDP
GGA2	PSADRNLDDLQAQPAFCPL
TXNIP	ESPTTFLDDMDGSQDSP
consensus	-PLΦPΦP-

**Figure 15 : Séquence du motif de liaison à la clathrine de TXNIP** (extrait de Wu et al., 2013).

Alignement du motif de TXNIP, localisé en aval du domaine arrestine-C de la protéine, avec les motifs canoniques de liaison à la clathrine d'autres protéines.

## 2.1. Les arrestines non conventionnelles, des protéines d'échafaudage

### 2.1.1. Recrutement d'acteurs du trafic vésiculaire

Malgré des différences structurales, les arrestines non conventionnelles, comme les arrestines conventionnelles, sont capables d'interagir avec des acteurs du trafic endocyttaire.

- Clathrine et complexes AP : Différentes études ont montré que les protéines ARRDC-3, ARRDC-4 et TXNIP de Mammifères, ainsi que les protéines Art6/Aly1 et Art3/Aly2 de *S. cerevisiae* interagissent avec la clathrine et des membres de la famille des AP (O'Donnell et al., 2010; Shea et al., 2012; Wu et al., 2013).

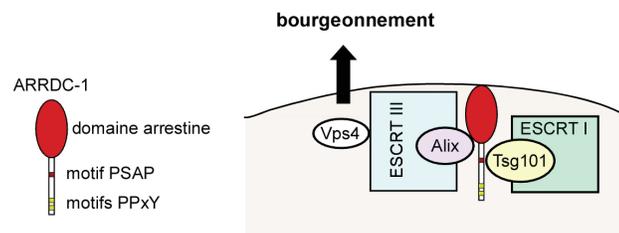
Ainsi, Art6/Aly1 et Art3/Aly2 sont capables de lier le complexe AP-2 et/ou un autre adaptateur de la clathrine, la protéine AP-1 (O'Donnell et al., 2013). Alors que le complexe AP-2 est impliqué à la membrane plasmique dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine, le complexe AP-1 est présent sur les endosomes et le réseau trans-golgien où il participe au trafic de vésicules entre ces deux organelles (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003). Les sites exacts d'interaction avec ces acteurs du trafic n'ont pas été encore identifiés. Néanmoins, les travaux de O'Donnell *et al.* ont établi que l'interaction avec AP-1 met en jeu la sous-unité Apl4 du complexe AP-1, l'équivalent de la sous-unité  $\gamma$  de la protéine AP-1 de Mammifères et au moins le domaine arrestine-N de Aly1 (O'Donnell et al., 2010).

La protéine TXNIP est en partie localisée à la membrane plasmique et sur des vésicules recouvertes de clathrine. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que TXNIP s'associe avec la chaîne lourde de la clathrine et la protéine AP-2 et que cette interaction pourrait faire intervenir un motif di-leucine localisé en aval du domaine arrestine-C de TXNIP et rappelant la *clathrin-box* de la queue C-terminale des  $\beta$ -arrestines (Figure 15) (Wu et al., 2013). Ce motif est essentiel pour permettre la localisation de TXNIP sur des vésicules à clathrine.

Ces observations suggèrent donc que, comme les arrestines conventionnelles, les arrestines non conventionnelles pourraient participer à la séquestration de cargos membranaires dans des vésicules recouvertes de clathrine.

- Machinerie ESCRT : Plusieurs travaux ont mis en évidence que les arrestines non conventionnelles, comme les  $\beta$ -arrestines, sont capables d'interagir avec la machinerie ESCRT. Néanmoins, à la différence des  $\beta$ -arrestines, ces interactions s'étendent à différents constituants de la machinerie.

Une première étude sur la protéine Art9/Rim8 de *S. cerevisiae* avait mis en évidence l'interaction directe d'Art9 avec la protéine Tsg101 qui participe au complexe ESCRT I de la machinerie ESCRT dans des conditions de modification du pH extracellulaire (Herrador et al., 2010). Une étude systématique par une approche double-hybride menée sur les ARRDCs de Mammifères a permis d'établir que ARRDC-1, -2 et -3 sont toutes les trois capables d'interagir avec la protéine Alix, une



**Figure 16 : Interaction de ARRDC-1 avec la machinerie ESCRT** (d'après Kuo and Freed, 2012).

L'arrestine non conventionnelle de Mammifères, ARRDC-1, interagit directement avec la membrane plasmique à travers son domaine arrestine-N. ARRDC-1 interagit avec Tsg101 du complexe ESCRT I, à travers son motif PSAP et avec Alix du complexe ESCRT III. En partenariat avec ces machineries et la protéine Vps4, ARRDC-1 participe au bourgeoisement cellulaire.

protéine associée au complexe ESCRT III et que la protéine ARRDC-1 lie également la protéine Tsg101 du complexe ESCRT I. ARRDC-1 est la seule ARRDC à posséder un site PSAP connu pour lier Tsg101 et la troncation de la queue C-terminale de ARRDC-1 portant ce motif conduit à une perte de la liaison ARRDC-1/Tsg101. La protéine ARRDC-3, par contre, interagit avec le complexe ESCRT 0 via la protéine Hrs (Malik and Marchese, 2010; Shea et al., 2012). En accord avec ces interactions, ces protéines ARRDCs sont retrouvées associées aux compartiments de « classe E » induits par un blocage de la machinerie ESCRT ou encore aux sites de bourgeonnement viral qui implique aussi une partie des complexes ESCRT (Rauch and Martin-Serrano, 2011).

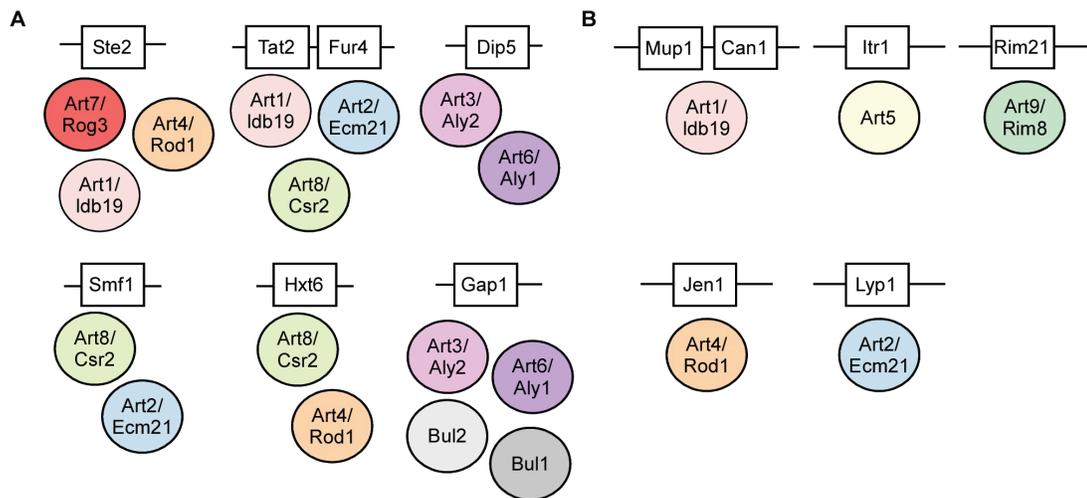
Des travaux plus récents de Nabhan *et al.* ont confirmé l'interaction PSAP-dépendante de ARRDC-1 avec Tsg101 et mis en évidence que la co-expression de ARRDC-1 et Tsg101 conduit à la redistribution de Tsg101 depuis les endosomes vers la membrane plasmique où est enrichie ARRDC-1, ce qui n'est pas observé avec un mutant dans le site PSAP (PAAP) de ARRDC-1 (Nabhan et al., 2012). Ces mêmes travaux ont établi que ARRDC-1 participe à la formation de microvésicules extracellulaires au niveau de la membrane plasmique appelées ARMMs (*Arrestin domain containing protein 1-mediated microvesicles*), un processus impliquant également des composants de la machinerie ESCRT (Figure 16).

### 2.1.2. Recrutement d'acteurs de la machinerie d'ubiquitination

Les motifs [P/L]PxY présents sur la queue C-terminale des arrestines non conventionnelles leur permettent d'interagir avec des protéines de la famille des ubiquitines ligases HECT via leur domaines WW.

Ce rôle d'adaptateur d'ubiquitine ligase a été bien établi chez *S. cerevisiae* ou encore *A. nidulans*. Chez ce dernier, Boase et Kelly ont montré en 2004 que les protéines CreD et ApyA, qui seront plus tard intégrées dans le clan arrestine, sont capables d'interagir avec l'ubiquitine ligase de type Nedd4 Hula (Boase and Kelly, 2004). Les données alors disponibles sur les  $\beta$ -arrestines et l'identification de domaines *arrestine-like* dans ces deux protéines avaient amené les auteurs à proposer qu'elles puissent servir d'intermédiaire, par le recrutement de la ligase, dans l'ubiquitination d'un substrat cible préalablement phosphorylé. Chez la levure, les ARTs interagissent avec Rsp5, l'unique orthologue de la protéine Nedd4 de Mammifères présent chez cet organisme (Becuwe et al., 2012; Hatakeyama et al., 2010; Herrador et al., 2010; Herranz et al., 2005; Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009; Nikko et al., 2008). Cette interaction permet non seulement leur propre ubiquitination (paragraphe III.3.1) mais également celle de partenaires membranaires dont elles régulent le trafic intracellulaire (paragraphe III.2.2).

Chez les Mammifères, plusieurs études ont montré que l'ensemble des ARRDCs de Mammifères à l'exception de ARRDC-5, dépourvue de motifs [P/L]PxY, sont capables d'interagir avec une ou



**Figure 17 : Implication des arrestines non conventionnelles de *S. cerevisiae* dans la régulation de cargos membranaires.**

Les récepteurs Rim21 et Ste2 ainsi que les transporteurs d'acides aminés Gap1, de méthionine Mup1, d'arginine Can1, de lysine Lyp1, de tryptophane Tat2, d'uracile Fur4, d'acides carboxyliques Dip5, de lactate Jen1, de manganèse Smf1, d'inositol Itr1, de glucose Hxt6 sont régulés par les ARTs. Certains d'entre eux sont reconnus par différents membres de la famille selon les conditions de stimulus extracellulaire.

plusieurs de ces ubiquitine ligases HECT, tels que Nedd4, Itch/Aip4, WWP1 et WWP2 (Nabhan et al., 2010; Puca et al., 2013; Rauch and Martin-Serrano, 2011; Shea et al., 2012). Une étude récente menée sur la protéine ARRDC-3 a mis en évidence que les deux motifs [P/L]PxY de ARRDC-3 sont capables d'interagir avec chacun de 4 motifs WW de Nedd4, avec néanmoins des affinités différentes (Qi et al., 2014).

Les arrestines non conventionnelles partagent donc avec les arrestines conventionnelles un mode de fonctionnement similaire par le recrutement de divers acteurs clés du trafic vésiculaire connus pour leurs rôles dans la formation de vésicules ou encore l'étiquetage par ubiquitination et le tri de cargos membranaires transitant par la voie endocytaire. A travers leur rôle d'adaptateurs d'acteurs/régulateurs du trafic, les arrestines non conventionnelles jouent un rôle majeur dans la régulation de l'internalisation et du trafic de cargos membranaires. Ce rôle a été largement illustré chez la levure *S. cerevisiae* dans le cas de transporteurs de la membrane plasmique. En fait, un large éventail de protéines membranaires est maintenant connu comme étant la cible de ces arrestines, depuis les transporteurs jusqu'aux intégrines en passant par les RCPGs, certains étant déjà des cibles connus des  $\beta$ -arrestines.

## 2.2. *Les arrestines non conventionnelles régulent des cargos membranaires de natures diverses*

### 2.2.1. *Régulation de transporteurs de la membrane plasmique*

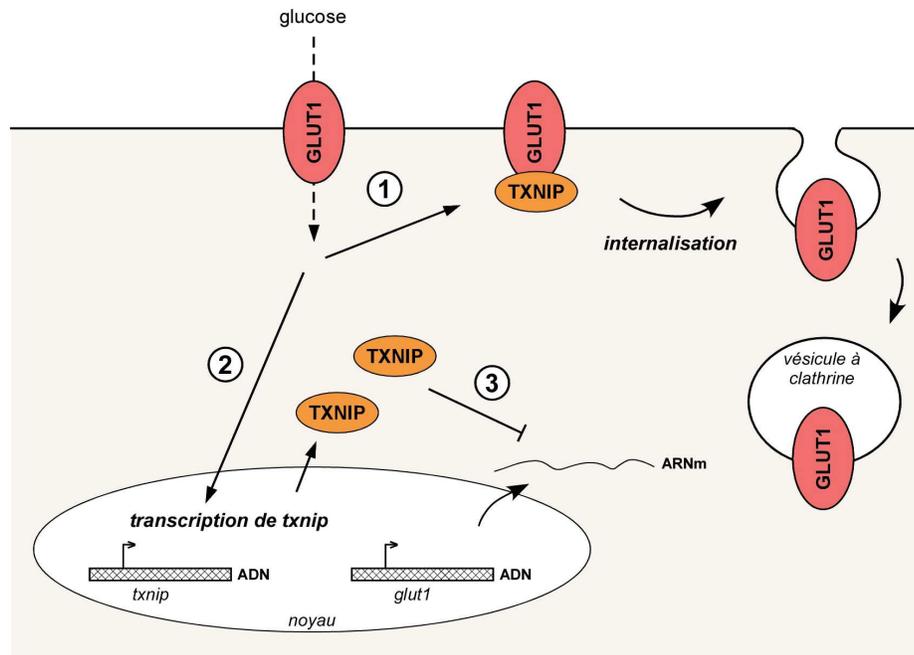
Sur les treize ARTs présentes chez la levure *S. cerevisiae*, onze ont été décrites pour participer à l'internalisation de transporteurs membranaires (Figure 17). Chez cet organisme, les transporteurs de la membrane plasmique font l'objet d'une régulation très complexe permettant l'ajustement optimal du répertoire des transporteurs de surface en fonction des nutriments disponibles dans le milieu extracellulaire ou dans des conditions de stress (Dupré et al., 2004). Cette régulation s'appuie sur un double contrôle d'une part par inhibition de leur expression génique et d'autre part, par l'orientation des transporteurs présent à la membrane plasmique ou en transit dans le réseau trans-golgien (néo-synthèse) vers le compartiment de dégradation (la vacuole chez la levure). L'ubiquitination des transporteurs par l'ubiquitine ligase Rsp5 est une étape essentielle pour leur acheminement vers la vacuole, l'ubiquitine étant utilisé comme signal d'internalisation et de dégradation (Belgareh-Touzé et al., 2008; Hicke, 2001).

Rsp5 (seul représentant des ubiquitine ligases de type HECT chez la levure) est dotée de plusieurs domaines WW, essentiels pour l'ubiquitination de ses cibles membranaires. Or, les transporteurs de levures sont pour la plupart dépourvus de motifs [P/L]PxY de liaison des domaines WW et la caractérisation des protéines ARTs a permis d'identifier les intermédiaires nécessaires à la liaison de



Rsp5 (Alvaro et al., 2014; Becuwe et al., 2012; Hatakeyama et al., 2010; Merhi and André, 2012; Nikko and Pelham, 2009; Nikko et al., 2008). Par exemple, Art1 sert d'adaptateur pour les transporteurs de méthionine Mup1 et d'arginine Can1, Art3/Aly2 pour le transporteur d'acides dicarboxyliques Dip5, Art4/Rod1 pour le transporteur de lactate Jen1, Art5 pour le transporteur d'inositol, Itr1/Bul1/2 pour le transporteur général d'acides aminés Gap1 (Figure 17). L'invalidation de ces protéines ART conduit au maintien de leur(s) transporteur(s) cible(s) à la membrane plasmique dans des conditions induisant normalement leur internalisation dans la souche sauvage. Par ailleurs, l'expression de mutants dans les motifs [P/L]PxY de liaison à Rsp5 de certaines de ces protéines empêche l'ubiquitination de ces récepteurs et interfère avec leur dégradation (Alvaro et al., 2014; Becuwe et al., 2012; Hatakeyama et al., 2010; Lin et al., 2008; Nikko et al., 2008). L'ensemble des observations réalisées sur les arrestines de Levure ont mené au modèle dans lequel elles serviraient d'adaptateurs pour le recrutement de l'ubiquitine-ligase Rsp5 au niveau du cargo membranaire de la membrane plasmique, permettant son ubiquitination, sa prise en charge dans la voie endocytaire et sa dégradation dans la vacuole après reconnaissance au niveau des compartiments endocytaires par la machinerie ESCRT.

La diversité de localisation subcellulaire de ces adaptateurs soulève néanmoins un certain nombre d'interrogations quant à leur(s) site(s) d'action spécifique(s), suggérant la possibilité de fonctions multiples. Dans des conditions basales, le régulateur Art1 des transporteurs Can1 et Mup1 est localisé sur l'appareil de Golgi et très faiblement à la membrane plasmique (Lin et al., 2008). En présence de cycloheximide, un activateur de la dégradation de Can1 et Mup1, Art1 est massivement relocalisé à la membrane plasmique, en accord avec un rôle dans le recrutement de Rsp5 au niveau des transporteurs de la membrane (Lin et al., 2008). En réponse au glucose (signal de dégradation de sa cible Jen1), l'arrestine Art4 par contre n'est pas recrutée de façon visible à la membrane plasmique. Art4 s'accumule au niveau du réseau trans-Golgien où elle contrôlerait l'ubiquitination de Jen1 avant son ciblage vers la vacuole. Ce niveau de régulation autoriserait une redirection possible du transporteur vers la membrane plasmique en cas de fluctuation des conditions nutritionnelles du milieu extérieur (Becuwe, 2014). Les protéines Art3 et Art6 sont quant à elle plutôt enrichies sur la voie endocytaire, au niveau des compartiments pré-vacuolaires. Comme Bul1/2, ces deux protéines sont des régulateurs du trafic du transporteur Gap1 mais à la différence de Bul1/2, elles favorisent le maintien de la protéine à la surface. Dans un milieu riche en azote, la protéine Gap1 est internalisée de façon Rsp5 et Bul1/2-dépendante et dégradée dans la vacuole (Merhi and André, 2012). Le passage à un milieu pauvre en azote conduit à un recyclage de Gap1 depuis les endosomes vers la membrane plasmique et cette fonction a été attribuée aux protéines Art3 et Art6 (O'Donnell et al., 2010). Art3, en interagissant avec AP-1, permettrait le retrait de Gap1 des endosomes et assurerait son transit vers le réseau trans-Golgien dans des vésicules AP-1-positives avant son retour vers la membrane plasmique. En revanche, dans le cas de Dip5, Art3 a été impliqué dans l'internalisation du transporteur à la membrane



**Figure 18 : Différents rôles de TXNIP dans la régulation du transporteur de glucose GLUT1** (modifiée depuis Wu et al., 2013).

L'entrée de glucose dans la cellule provoque, d'une part, le recrutement de TXNIP sur GLUT1, facilitant son internalisation et son accumulation sur des vésicules à clathrine (1) et d'autre part, la stimulation de la transcription du gène *txnip* (2) favorisant ainsi l'internalisation du transporteur. De plus, TXNIP a la capacité de réguler le niveau d'expression de GLUT1 au niveau des ARNm (3).

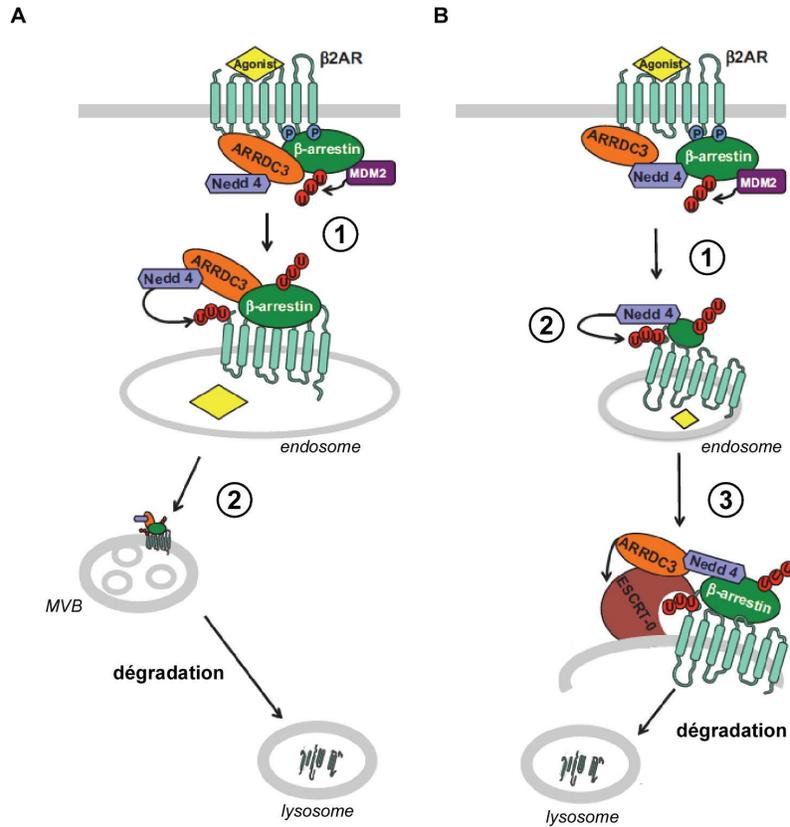
plasmique (Hatakeyama et al., 2010). Dans la littérature, les exemples s'accumulent, suggérant un rôle bien plus large pour les arrestines de Levure que celui de simple adaptateur de Rsp5 pour les transporteurs au niveau de la membrane plasmique. Elles apparaissent en effet aujourd'hui comme des acteurs clés de la réponse cellulaire, en contrôlant différentes étapes du trafic de leurs cibles membranaires au niveau de sites stratégiques le long de la voie d'endocytose et de sécrétion.

Chez les Mammifères, les transporteurs de la membrane plasmique sont également des cibles des arrestines non conventionnelles. Ainsi, la protéine TXNIP participe à l'internalisation du transporteur de glucose GLUT1 (Figure 18) (Wu et al., 2013). Des travaux plus anciens avaient mis en évidence que le niveau d'expression de TXNIP est corrélé avec l'entrée de glucose dans les cellules des tissus périphériques, sa surexpression conduisant à une baisse de transport intracellulaire du sucre (Parikh et al., 2007). En accord avec ces observations, des souris *knock-out* pour *txnip* présentent un phénotype d'hyperlipidémie et d'hypoglycémie (Chutkow et al., 2008). Wu *et al.* viennent d'établir qu'en présence de glucose, TXNIP interagit avec le transporteur GLUT1 et facilite son internalisation depuis la membrane plasmique dans des vésicules recouverte de clathrine (Wu et al., 2013). De façon inattendue néanmoins, une forme tronquée de TXNIP déléetée de sa queue C-terminale (contenant le site de liaison à la clathrine) maintient sa capacité à inhiber le transport du glucose (Patwari et al., 2009). Au cours de leurs travaux, Wu *et al.* ont établi que l'expression de TXNIP induite par le glucose, diminue le niveau d'expression de GLUT1 par un effet au niveau des ARN messagers, indiquant un deuxième niveau de régulation contribuant à la *down*-régulation du transporteur (Wu et al., 2013). En conditions de stress énergétique en revanche, TXNIP est phosphorylée par la protéine AMPK et dégradée, permettant de restaurer l'homéostasie énergétique par entrée de glucose (voir paragraphe II.3.1).

### 2.2.2. Régulation de RCPGs

Alors que les RCPGs semblaient encore récemment être les cibles privilégiées des  $\beta$ -arrestines, les travaux de plusieurs équipes ont mis en évidence ces dernières années une régulation par d'autres membres du clan arrestine. C'est le cas notamment du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique ou encore du récepteur à la vasopressine (Han et al., 2013; Nabhan et al., 2010; Shea et al., 2012).

La protéine ARRDC-3 a été identifiée dans un crible génétique par ARN interférence comme acteur dans la *down*-régulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique (Nabhan et al., 2010). Les travaux de Nabhan *et al.* ont mis en évidence que la protéine ARRDC-3 est associée avec le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique au niveau de la membrane plasmique, ceci même en l'absence de ligand, et que l'addition du ligand stimule cette association. Cette interaction permet l'ubiquitination du récepteur, par le recrutement de l'ubiquitine ligase Nedd4 et conduit à un enrichissement de ARRDC-3 sur des compartiments endocytaires. L'ubiquitination et la dégradation du récepteur sont dépendantes des sites



**Figure 19 : Régulation de récepteur  $\beta$ 2-adrénergique par la  $\beta$ -arrestine 2 et ARRDC-3** (modifiée depuis Pucas et al., 2014).

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la régulation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. **A.** Shea *et al.* proposent une collaboration précoce de ARRDC-3 et de la  $\beta$ -arrestine 2, au niveau de la membrane plasmique où elles permettent le recrutement de Nedd4 (1) et l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. **B.** Han *et al.* Suggèrent plutôt un rôle séquentiel des deux arrestines où la  $\beta$ -arrestine 2 est recrutée rapidement au niveau du récepteur et permet son internalisation (1) suivi du recrutement de Nedd4 sur les endosomes et l'ubiquitination du récepteur (2). ARRDC-3 qui est constitutivement associée à la membrane et qui interagit avec Hrs, intervient plus tardivement, au niveau des endosomes où elle interagit avec le complexe  $\beta$ -arrestine 2/Nedd4, permettant son ciblage vers la dégradation.

[P/L]PxY de ARRDC-3 dont la mutation empêche la liaison de Nedd4 (Figure 19.A) (Nabhan et al., 2010). Selon Patwari *et al.*, la reconnaissance du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique n'est pas spécifique de ARRDC-3 puisque ARRDC-4 et aussi ARRDC-1 mais dans une moindre mesure sont capables de lier le récepteur (Patwari et al., 2011). Ces résultats, confirmés en partie par Shea *et al.*, sont en contradiction partielle avec ceux obtenus par Han *et al.* qui suggèrent plutôt une redondance de fonction avec les autres ARRDCs, ARRDC-2 et -4 (Han et al., 2013; Shea et al., 2012). En revanche, les auteurs proposent un rôle des ARRDCs dans une étape plus tardive du trafic du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, permettant son tri au niveau de compartiment Hrs-positif (Figure 19.B).

La protéine ARRDC-4 est également capable d'interagir avec un autre RCPG, le récepteur à la vasopressine de type II (Shea et al., 2012). Comme dans le cas de ARRDC-3, ARRDC-4 est associé constitutivement à ce récepteur et sa stimulation favorise la formation du complexe et permet le recrutement de Nedd4 sur les endosomes, suggérant des mécanismes de régulation similaire pour ces deux couples arrestine-RCPG.

Chez la levure, Alvaro *et al.* viennent de mettre en évidence le rôle de plusieurs ARTs dans la régulation du RCPG Ste2 (Alvaro et al., 2014). Les récepteurs Ste2 et Ste3 sont impliqués dans le cycle de reproduction sexuée. Présents respectivement à la surface des cellules *MATa* et *MAT $\alpha$* , Ste2 fixe le facteur- $\alpha$  sécrété par les cellules *MAT $\alpha$*  et Ste3 fixe le facteur- $\alpha$  délivré par les cellules *MATa*, permettant la transformation des cellules en gamètes, dépendante de la voie MAPK (Bardwell, 2005; Manahan et al., 2000; Slessareva and Dohlman, 2006). Les récepteurs Ste2 et Ste3 sont régulés constitutivement par endocytose mais leur internalisation est stimulée après fixation de leur phéromone respective (Chvatchko et al., 1986; Schandel and Jenness, 1994). Les protéines Art1/Idb19, Art4/Rod1 et Art7/Rog3 semblent réguler l'internalisation et la signalisation en aval du récepteur Ste2. Le rôle exact de chacune de ces arrestines n'a pas été clairement défini mais les travaux d'Alvaro *et al.* montrent que l'absence de Art1, de Art4 et Art7 ou des trois arrestines conduit à une sensibilité accrue des cellules face au facteur- $\alpha$ , indiquant un rôle de ces protéines dans la régulation négative du récepteur (Alvaro et al., 2014). Ste2 est phosphorylé puis ubiquitiné suite à son activation conduisant à sa dégradation. Art1 et Art4 sont capables de fixer la queue C-terminale du récepteur et pourrait ainsi permettre le recrutement de l'ubiquitine ligase Rsp5 sur le récepteur permettant sa dégradation. Ces travaux montrent également que Art7 participe à la désensibilisation du récepteur en inhibant les voies de signalisation en aval du récepteur (voir paragraphe III.2.3).

### 2.2.3. Régulation d'autres cargos membranaires

En plus de son rôle dans la régulation de récepteurs adrénériques, la protéine ARRDC-3 semble également impliquée dans le trafic intracellulaire de l'intégrine  $\beta$ 4, ITG- $\beta$ 4 (Draheim et al., 2010). Les intégrines sont des molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules qui participent à



l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. Elles sont constituées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et la diversité des combinaisons  $\alpha/\beta$  (parmi un choix de 14 sous-unités  $\alpha$  et 8  $\beta$  chez les Mammifères) permet la liaison d'un large panel de ligands extracellulaires et de partenaires intracellulaires. La liaison de ces ligands active des voies de signalisation diverses contrôlant non seulement l'adhésion et la migration mais également la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Arnaout et al., 2005; Dowling et al., 1996; Fuchs et al., 1997; Germain et al., 2009; Hynes, 2002; Lipscomb et al., 2005; Vicente-Manzanares et al., 2009; Watt, 2002; Wilhelmsen et al., 2006).

L'intégrine- $\beta 4$  est utilisée comme marqueur de la progression tumorale dans divers cancers, en particulier le cancer du sein, l'accumulation de ITG- $\beta 4$  étant corrélée avec une agressivité plus forte de la tumeur. Les travaux de Draheim *et al.* ont permis d'établir que la protéine ARRDC-3 est *down-régulée* au cours de la progression tumorale et que sa surexpression dans une lignée dérivée de cancer du sein conduit à la dégradation de ITG- $\beta 4$  et à sa disparition de la surface cellulaire alors qu'une diminution de son niveau d'expression par ARN interférence conduit à une augmentation sensible du niveau de ITG- $\beta 4$  (Draheim et al., 2010). Dans ces cellules, ARRDC-3 lie l'intégrine  $\beta 4$  préférentiellement sous sa forme activée, phosphorylée sur la sérine S<sup>1424</sup>. Dans ces mêmes conditions, la protéine ITG- $\beta 4$  est retrouvée sous une forme ubiquitinée, amenant les auteurs à proposer, par analogie avec ce qui a été décrit pour les  $\beta$ -arrestines, un rôle de ARRDC-3 dans le trafic et le *turn-over* de la protéine, via une signalisation ubiquitine-dépendante.

Une étude récente propose également un rôle de ARRDC-1 dans la signalisation Notch. En effet, chez les Mammifères, contrairement à la Drosophile, les récepteurs Notch (à l'exception de Notch3) ne possèdent pas de motif [P/L]PxY ne permettant pas un recrutement direct de l'ubiquitine ligase Itch sur le récepteur. Les travaux de Puca *et al.* proposent un rôle coopératif de la  $\beta$ -arrestine et de ARRDC-1 où le recrutement de Itch sur Notch serait médié par l'arrestine non conventionnelle ARRDC-1 via son hétéro-dimérisation avec la  $\beta$ -arrestine (Puca et al., 2013). La  $\beta$ -arrestine, capable d'interagir avec ARRDC-1 *in vitro*, pourrait permettre son recrutement au niveau du récepteur internalisé, laquelle interagirait avec l'ubiquitine ligase Itch, permettant l'ubiquitination de Notch et sa dégradation lysosomale (voir paragraphe III.3.3).

#### 2.2.4. Quels signaux de reconnaissance pour la prise en charge des cargos membranaires ?

Alors que la reconnaissance de leurs cibles membranaires par les arrestines canoniques semble nécessiter de façon assez générale leur phosphorylation préalable, la question en revanche n'a pas été investiguée suffisamment dans le détail pour affirmer que les arrestines non conventionnelles partagent également cette particularité.

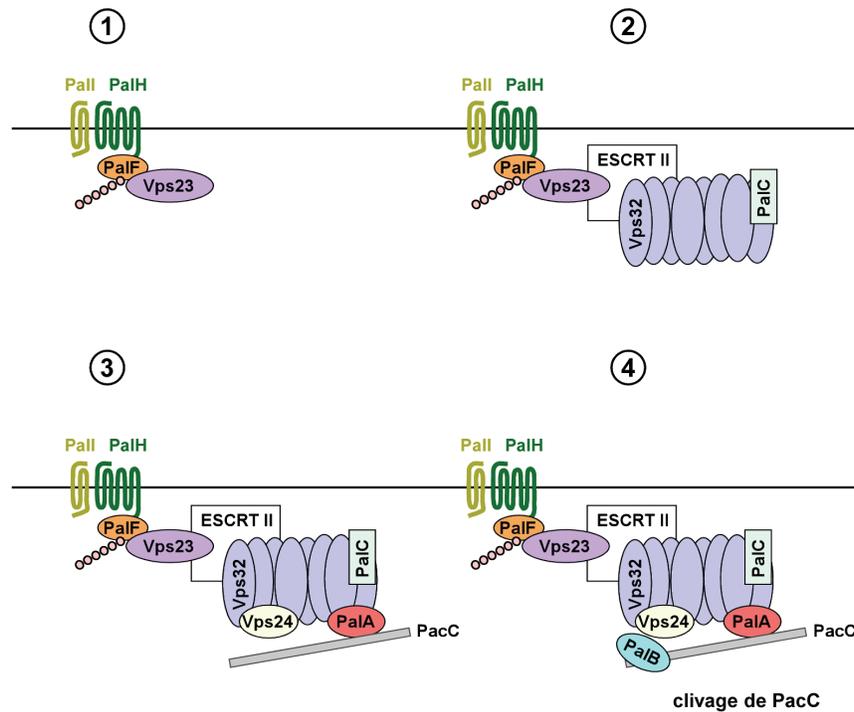


Les travaux de Hatakeyama *et al.* sur *S. cerevisiae* ont montré que le transporteur Dip5 régulé par Art3 en présence d'acide aspartique est phosphorylé sur son extrémité N-terminale au niveau de la séquence <sup>10</sup>TSTSPRNSSSLDS et la mutation de l'ensemble des sérines et thréonines en alanines ou en acides aspartiques affectent partiellement son endocytose (Hatakeyama *et al.*, 2010). Hicke *et al.* ont montré que le récepteur Ste2 est également hyper-phosphorylé sur sa queue C-terminale de façon ligand-dépendante et que cette phosphorylation est nécessaire à son internalisation (Hicke *et al.*, 1998). Le transporteur de manganèse Smf1, quant à lui, est phosphorylé de façon constitutive, mais cette phosphorylation est néanmoins nécessaire à la liaison de son régulateur Art2, suggérant la possibilité d'une reconnaissance de motifs phosphorylés par les arrestines non conventionnelles également.

De façon intéressante et comme observé pour les arrestines classiques, certains des cargos membranaires peuvent être les cibles de plusieurs arrestines, en fonction du stimulus extracellulaire. Par exemple, chez la Levure, dans le cas du transporteur de lysine Lyp1, l'internalisation du transporteur en réponse à un excès de lysine implique la protéine Art1, alors que son internalisation stress-dépendante nécessite l'intervention de Art2 (Lin *et al.*, 2008). De même, l'endocytose du transporteur de glucose Hxt6 en réponse au glucose dépend de Art4/Rod1 alors qu'elle met en jeu Art8/Csr2 quand elle est déclenchée par la cycloheximide (Nikko *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent qu'en fonction du ligand, les transporteurs pourraient adopter une conformation particulière - éventuellement phosphorylation-dépendante - plus favorable à une interaction avec une arrestine donnée. Ceci pourrait également être couplé au déclenchement de cascades de signalisation permettant l'activation spécifique des arrestines, comme illustré pour Art4 ou encore Bul1/2 (Becuwe *et al.*, 2012; Merhi and André, 2012) (voir paragraphe III.3.2).

Les travaux de Patwari *et al.*, qui ont confirmé l'interaction de ARRDC-3 avec le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique ont également mis en évidence la liaison de ARRDC-3 à un autre adrénorécepteur, le récepteur  $\beta$ 3-adrénérique (Patwari *et al.*, 2011). Or, à la différence des autres récepteurs adrénériques, le récepteur  $\beta$ 3-adrénérique n'est pas phosphorylé suite à son activation, nécessitant donc d'identifier d'autres signaux de reconnaissance au moins pour ce type de récepteur.

Bien que le fonctionnement précis et les modes de régulation mis en jeu n'aient pas encore été suffisamment investigués pour construire un modèle unifié, les résultats concernant les arrestines non conventionnelles indiquent clairement aujourd'hui que les fonctions de régulation du trafic de cargos membranaires décrites pour les arrestines canoniques font en fait partie des fonctions ancestrales de cette famille de protéines, partagées par les arrestines non conventionnelles.



**Figure 20 : Régulation de la signalisation pH-dépendante chez *A. nidulans*** (d'après Galindo et al., 2012)

En pH alcalin, l'activation de PalH, maintenu à la membrane plasmique par PalI conduit à l'ubiquitination de l'arrestine-like PalF permettant le recrutement de Vps23 (ESCRT I, équivalent de Tsg101 chez les Mammifères) (1). La formation de ce complexe conduit à la polymérisation de Vps32 et le recrutement de PalC (2). PalA, un homologue de la protéine Alix, est ensuite recrutée au niveau du complexe permettant le recrutement du facteur de transcription PacC (3). A son tour PalB est recrutée sur le complexe à travers son interaction avec Vps24 et clive PacC (4).

### 2.3. Autres rôles des arrestines non conventionnelles

Précédemment nous avons mentionné le rôle de certaines arrestines non conventionnelles de *S. cerevisiae* dans la régulation du récepteur Ste2 (voir paragraphe III.2.2). Alors que Art1/Lbd19 et Art4/Rod1 semblent participer à la *down*-régulation du récepteur à travers leur rôle de protéine d'échafaudage avec l'ubiquitine ligase Rsp5, la protéine Art7/Rog3 quant à elle, semble plutôt jouer un rôle retrouvé plus classiquement chez les arrestines conventionnelles. En effet, Alvaro *et al.* proposent qu'à travers son interaction avec le récepteur Ste2, Art7/Rog3 pourrait désensibiliser Ste2 en empêchant son association avec les protéines G hétéro-trimériques, inhibant ainsi la signalisation en aval (Alvaro *et al.*, 2014).

Le cas de la protéine PalF illustre également des fonctions supplémentaires des arrestines non conventionnelles, qui se distinguent du rôle dans la régulation du trafic des cargos membranaires. PalF chez *A. nidulans* et son orthologue Art9/Rim8 chez *S. cerevisiae* sont impliqués dans la réponse cellulaire face à des modifications du pH extracellulaire (Gomez-Raja and Davis, 2012; Herranz *et al.*, 2005; Hervás-Aguilar *et al.*, 2010). Le passage d'un milieu acide à un milieu plutôt alcalin conduit à la mise en place d'une réponse transcriptionnelle mettant en jeu le récepteur de type RCPG PalH (Rim21 chez la levure), décrit comme senseur du pH extracellulaire et le facteur de transcription PacC (Rim101 chez la levure) (Figure 20) (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007; Díez *et al.*, 2002; Gomez-Raja and Davis, 2012; Herranz *et al.*, 2005; Hervás-Aguilar *et al.*, 2007; Li and Mitchell, 1997; Orejas *et al.*, 1995; Peñalva and Arst, 2004; Rodríguez-Galán *et al.*, 2009). PacC (Rim101) est activé par clivage protéolytique par le recrutement de la protéase de type calpaine PalB (Rim13) par des sous-unités de la machinerie ESCRT (Díez *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2007; Peñas *et al.*, 2007; Rodríguez-Galán *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2012). A la différence des observations faites sur la plupart des ART de *S. cerevisiae*, et qui semblent s'étendre aux membres arrestines de *A. nidulans*, la liaison de PalF (Art9/Rim8) sur le récepteur PalH (Rim21) ne conduit pas à son internalisation. Par contre, elle permet le recrutement de la sous-unité Vps23 (Tsg101 chez les Mammifères) de ESCRT I à la membrane plasmique et la formation de complexes ESCRT dans l'environnement du récepteur membranaire (Galindo *et al.*, 2012).

Ces complexes contenant les protéines Vps32 et Vps24 du complexe ESCRT III vont ensuite permettre de recruter un ensemble de molécules de signalisation dont la protéine PalA (homologue d'Alix des Mammifères, Rim20 chez la levure) et la protéine PalB (Rim13) conduisant à l'activation du facteur de transcription PacC (Rim101), recruté au niveau de la machinerie (Galindo *et al.*, 2012; Herrador *et al.*, 2013; Rodríguez-Galán *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2012). Dans cette situation d'ajustement aux conditions de pH extérieur, PalF (Art9/Rim8) joue un rôle essentiel dans la transduction du signal du récepteur activé jusqu'au facteur de transcription PacC, permettant



l'activation d'une réponse transcriptionnelle adaptée au stimulus. De façon intéressante, la machinerie ESCRT classiquement impliquée dans des aspects de formation de vésicules semble également jouer un rôle différent de son rôle habituel.

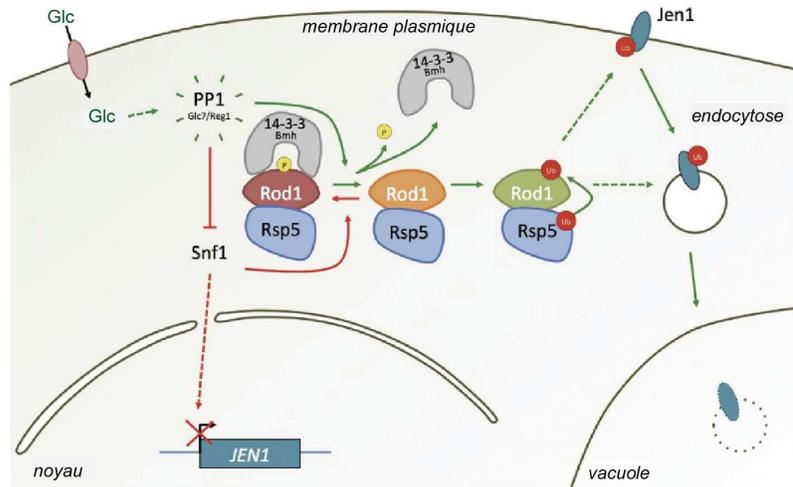
Enfin, la protéine TXNIP semble également assurer des fonctions physiologiques déconnectées de son rôle d'adaptateur dans le trafic de cibles membranaires. Initialement, avant son rattachement au clan arrestine, la protéine TXNIP avait été identifiée comme inhibiteur de la thioredoxine. La thioredoxine est une petite protéine anti-oxydante ubiquitaire qui permet dans la cellule la réduction de protéines par la formation de ponts disulfures. TXNIP interagit directement avec la thioredoxine empêchant son activité anti-oxydante et régule ainsi la réponse au stress oxydant (Junn et al., 2000, 2000; Nishiyama et al., 1999; Patwari et al., 2006; Schulze et al., 2004).

### 3. Régulation des arrestines non conventionnelles

#### 3.1 Par ubiquitination

Comme les arrestines conventionnelles, les arrestines non conventionnelles sont régulées par ubiquitination. Elles sont elle-même la cible de protéines de la famille des ubiquitine ligases Nedd4, en plus de leur rôle d'adaptateurs pour ces mêmes ubiquitine ligases.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les ARTs sont ubiquitinées par la protéine Rsp5 et plusieurs travaux ont montré le rôle crucial de cette modification dans leur fonction (Becuwe et al., 2012; Hatakeyama et al., 2010; Herrador et al., 2010; Herranz et al., 2005; Lin et al., 2008). En effet, l'expression de mutants non-ubiquitinables de Art1/Ldb9 ou encore de Art4/Rod1 conduit respectivement à un défaut d'internalisation des transporteurs d'arginine Can1 ou de lactate Jen1 en réponse à un changement de nutriments dans le milieu extracellulaire qui normalement déclenche leur endocytose (Becuwe et al., 2012; Lin et al., 2008). De même chez *A. nidulans*, la protéine PalF est ubiquitinée en réponse à la modification du pH extracellulaire (pH alcalin) de façon dépendante de l'ubiquitine ligase Hula et du RCPG senseur du pH extérieur PalH. L'expression d'une forme de PalF fusionnée à l'ubiquitine (fusion transcriptionnelle) conduit à une activation constitutive de la voie PalH dans des conditions de pH environnant acide qui normalement maintiennent la voie inactive (Hervás-Aguilar et al., 2010). L'homologue de PalF chez la levure, Art9/Rim8 est également ubiquitiné dans ces mêmes conditions de stress bien que l'ubiquitination ne mette pas en jeu les récepteurs homologues de PalH, Rim21 et Dfg16 (Herrador et al., 2010). De façon intéressante, la protéine Art9 serait maintenue sous une forme mono-ubiquitinée du fait de son interaction avec la sous-unité ESCRT Vps23 qui viendrait limiter l'action de Rsp5 (Herrador et al., 2013).



**Figure 21 : Régulation du transporteur Jen1 chez *S. cerevisiae*** (modifiée depuis Becuwe et al., 2012).

En milieu lactate, la phosphatase PP1 est inactive et la kinase Snf1 est active permettant la phosphorylation de Art4/Rod1, en interaction avec la protéine 14.3.3 (flèches rouges). En présence de glucose, PP1 est activée conduisant d'une part à l'inhibition de Snf1 et d'autre part à la déphosphorylation de Art4/Rod1. La déphosphorylation de Rod1 s'accompagne de son ubiquitination par Rsp5, associée de façon constitutive avec Rod1. Sous cet état « actif », Rod1 permet alors l'ubiquitination Rsp5-dépendante de Jen1, son internalisation et sa dégradation dans la vacuole. La localisation subcellulaire où agit Rod1 sur Jen1 pourrait être à la membrane plasmique ou sur les compartiments endocytaires (pointillé vert). De plus, Snf1 contrôle Jen1 par régulation transcriptionnelle (pointillé rouge).

Chez les Mammifères, les arrestines ARRDCs et TXNIP sont également régulées par ubiquitination. TXNIP est modifiée par la protéine Itch/AIP4 et ARRDC-1, quant à elle, semble pouvoir être ubiquitinée par différentes ubiquitine ligases dont la protéine WWP1 et la protéine WWP2 (Nabhan et al., 2012; Rauch and Martin-Serrano, 2011; Zhang et al., 2010). De façon intéressante, l'interaction de TXNIP avec la thioredoxine empêche son interaction avec Itch et prévient ainsi sa dégradation normalement engendré suite à son ubiquitination (Chutkow and Lee, 2011; Zhang et al., 2010).

L'ubiquitination semble donc être un élément de régulation général des arrestines. Dans le cas des arrestines non conventionnelles, ni l'identité des ubiquitine-protéases impliquées ni les conséquences de l'ubiquitination sur les protéines elles-mêmes ne sont connus. La forme ubiquitinée pourrait adopter une conformation plus favorable à l'interaction avec des protéines partenaires de façon similaire aux autres membres de la famille arrestine. Comme dans le cas de TXNIP, l'ubiquitination pourrait également modifier la durée de vie de la protéine en permettant son adressage vers le protéasome.

### 3.2. Par phosphorylation

Nous avons vu précédemment que les arrestines conventionnelles sont présentes dans le cytosol sous une forme constitutivement phosphorylée. Leur recrutement sur des récepteurs de la membrane plasmique provoque leur déphosphorylation rapide et leur activation (Paragraphe II.3.1). Plusieurs exemples dans la littérature suggèrent une régulation similaire par phosphorylation qui maintiendrait les arrestines non conventionnelles sous une forme inactive. Cette phospho-inhibition a été bien illustrée pour les arrestines de levure.

Ainsi, les travaux de Becuwe *et al.* ont mis en évidence que dans des cellules cultivées en lactate, Art4/Rod1 est maintenue sous une forme phosphorylée en complexe avec la protéine adaptatrice 14.3.3 (Becuwe et al., 2012). L'addition de glucose dans le milieu conduit à la déphosphorylation de Art4 et sa dissociation de 14.3.3, permettant son ubiquitination par Rsp5 ainsi que celle du transporteur de lactate Jen1 conduisant à sa dégradation dans la vacuole (Figure 21). Le cycle de phosphorylation/déphosphorylation est assuré par la protéine kinase Snf1, l'orthologue de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) de Mammifères dont l'activité est inhibée par le glucose (état phosphorylé actif / état non phosphorylé inactif) et la phosphatase PP1 qui contrôle également l'activité de Snf1 en réponse au glucose.

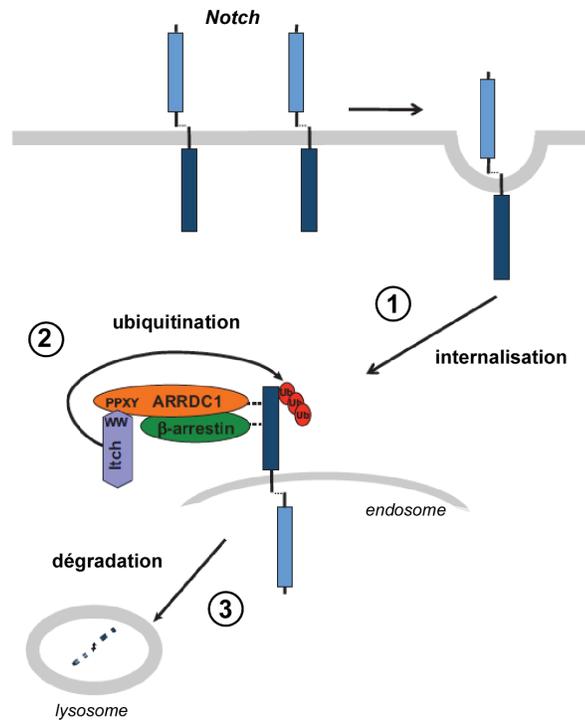
Dans un tout autre contexte, la protéine Art4/Rod1 subit également une phospho-régulation par la calcineurine et sa déphosphorylation calcineurine-dépendante est nécessaire pour la régulation négative du RCPG Ste2 (Alvaro et al., 2014). Les protéines Art1 et Bul1/2 impliquées respectivement



dans la régulation des transporteurs Can1 et Gap1 sont elles aussi régulées par phosphorylation suite à des changements nutritionnels du milieu (MacGurn et al., 2011; Merhi and André, 2012). Leur phosphorylation est médiée par la kinase Nrp1, elle-même régulée de façon négative par la voie TORC1 (*Target of Rapamycin 1*). L'activation de TORC1, un senseur de l'état nutritionnel de la cellule, conduit à l'inactivation de Nrp1, la déphosphorylation subséquente de Art1 et Bul1/2 et l'internalisation arrestine-dépendante des transporteurs cibles. Les travaux de Merhi et André ont établi que cette voie de régulation implique aussi des protéines de type 14.3.3, au moins dans le cas des protéines Bul1/2 et que la protéine Sit4, une phosphatase de type PP2A assure leur déphosphorylation (Merhi and André, 2012). Dans le cas de Art6/Aly1, c'est la calcineurine qui déphosphoryle la protéine et permet l'internalisation du transporteur d'acide aspartique/acide glutamique Dip5 (O'Donnell et al., 2013).

En dehors du modèle Levure, l'existence de régulation(s) par phosphorylation semble s'appliquer à d'autres arrestines non conventionnelles. La protéine PalF de *A. nidulans* est rapidement phosphorylée de façon PalH-dépendante quand l'organisme est placé dans des conditions de pH alcalin, comme dans le cas de son ubiquitination (Herranz et al., 2005). Chez les Mammifères, dans des conditions de stress énergétique dû à une déplétion du milieu en glucose, la protéine TXNIP est phosphorylée comme Art4/Rod1 par la protéine AMPK sur la sérine S<sup>308</sup> et cette phosphorylation empêche l'internalisation TXNIP-dépendante du récepteur GLUT1 (Wu et al., 2013). A noter que la phosphorylation de TXNIP conduit également à sa dégradation, vraisemblablement en favorisant l'ubiquitination de la protéine et son adressage vers le protéasome. L'analyse de banques de données de spectrométrie de masse a permis à l'équipe d'Alvarez d'identifier plusieurs sites cibles de sérine/thréonine ou tyrosine kinases sur les protéines ARRDC-3 et ARRDC-4 de Mammifères (Shea et al., 2012). Par ailleurs, et bien qu'aucun lien direct n'ait encore été établi avec son rôle physiologique non plus, la protéine ARRD-17/CNP-1 (*Calcineurin-interacting protein-1*) de *C. elegans* est également une cible de la calcineurine et son état de phosphorylation pourrait moduler sa fonction dans la réponse à des stress ou stimuli du milieu extracellulaire connue pour être aussi sous le contrôle de la phosphatase (chimiotactisme lysine-dépendant, ou encore ponte des œufs après jeune) (Jee et al., 2012).

Les données actuelles de la littérature ne permettent pas de proposer un modèle général pour expliquer comment phosphorylation et ubiquitination s'articulent pour moduler l'activité des arrestines non conventionnelles. Aujourd'hui, l'interdépendance entre ces deux processus, bien décrite dans le cas de Art4/Rod ou Bul1/2 par exemple, n'a pas été vraiment établie pour des arrestines non conventionnelles en dehors du modèle Levure. Les travaux futurs menés sur ces arrestines devraient permettre de préciser l'existence et les conditions de dialogue entre ces deux types de régulation et son impact sur l'activation des arrestines.



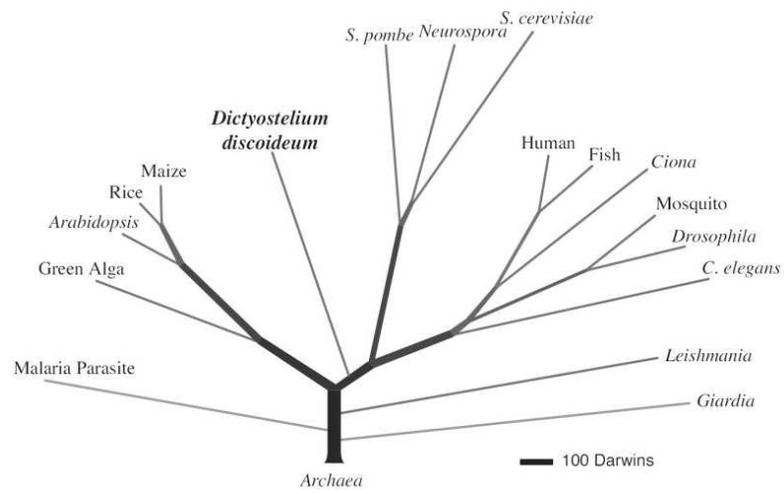
**Figure 22 : Régulation du récepteur Notch par les  $\beta$ -arrestines et ARRDC-1** (modifiée depuis Pucas et al., 2014).

Après internalisation constitutive (1), le récepteur Notch inactif est reconnu par l'hétéro-dimère  $\beta$ -arrestine (1 ou 2)/ARRDC-1 qui permet à Itch, en interaction avec ARRDC-1 d'être recruté au niveau du récepteur, conduisant à l'ubiquitination (2) et à la dégradation (3) du récepteur.

### 3.3 Régulation du fonctionnement des arrestines par hétéro-oligomérisation ?

Précédemment, nous avons vu dans le paragraphe II.3.2 que les arrestines conventionnelles sont capables de former des homo- et des hétéro-oligomères et que cette oligomérisation module l'activité des protéines. La caractérisation fonctionnelle des arrestines non conventionnelles a révélé la possibilité d'une coopération fonctionnelle des différents membres de la famille arrestine par la formation d'hétéro-oligomères entre arrestines non conventionnelles et  $\beta$ -arrestines.

Shea *et al.* ont mis en évidence que ARRDC-3 et ARRDC-4, dans des conditions de surexpression, sont capables de former des complexes avec les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 de façon ligand-indépendante et qu'elles co-localisent sur des vésicules avec les  $\beta$ -arrestines suite à l'activation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique ou du récepteur à la vasopressine (Shea et al., 2012). L'existence d'hétéro-oligomères entre arrestines non conventionnelles et  $\beta$ -arrestines a été confirmée dans le contexte du récepteur Notch (Puca et al., 2013). Chez les Mammifères, la  $\beta$ -arrestine 1 est nécessaire à l'ubiquitination Itch-dépendante de Notch mais ne lie pas l'ubiquitine ligase. En revanche, ARRDC-1, est capable d'interagir avec Itch, de même que la protéine ARRDC-3. Les travaux de Puca *et al.* (2013) viennent d'établir que ARRDC-1 est également capable, dans les mêmes conditions, d'interagir directement avec la  $\beta$ -arrestine 1, via son domaine arrestine. La  $\beta$ -arrestine pourrait permettre le recrutement, au niveau du récepteur internalisé, de ARRDC-1 associée à l'ubiquitine ligase Itch, permettant ainsi l'ubiquitination de Notch et sa dégradation ultérieure dans la voie endo-lysosomale (Figure 22) (Puca et al., 2013). Puisque les  $\beta$ -arrestines ne sont pas nécessaires pour l'internalisation de Notch dans la voie endocytaire, les auteurs proposent plutôt que cet hétéro-complexe fonctionne au niveau de la voie endocytaire. Jusque là, les études à grande échelle visant à déterminer le répertoire des partenaires des  $\beta$ -arrestines ou à établir la composition des complexes solubles oligomériques présents dans le cytosol de cellules humaines n'avaient pas mis en évidence l'existence de complexes stables entre  $\beta$ -arrestines et arrestines non conventionnelles (Havugimana et al., 2012; Xiao et al., 2007). Un résultat plutôt en faveur d'une association non-constitutive, qui pourrait suggérer la mise en jeu de signaux spécifiques, possiblement associés aux récepteurs cibles. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés dans d'autres systèmes, ils ouvrent des perspectives intéressantes quant aux possibilités de reconnaissance des cargos cibles et aux conséquences sur leur trafic intracellulaire, par l'implication de différentes combinaisons d'arrestines.



**Figure 23. Arbre phylogénétique des Eucaryotes.** (Extrait de Eichinger et al., 2005).  
 Les espèces correspondant à Malaria Parasite, Green Alga, Rice, Maize, Fish et Mosquito sont respectivement *Plasmodium falciparum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Fugu rubripes*, et *Anopheles gambiae*.

## PARTIE 2 : L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

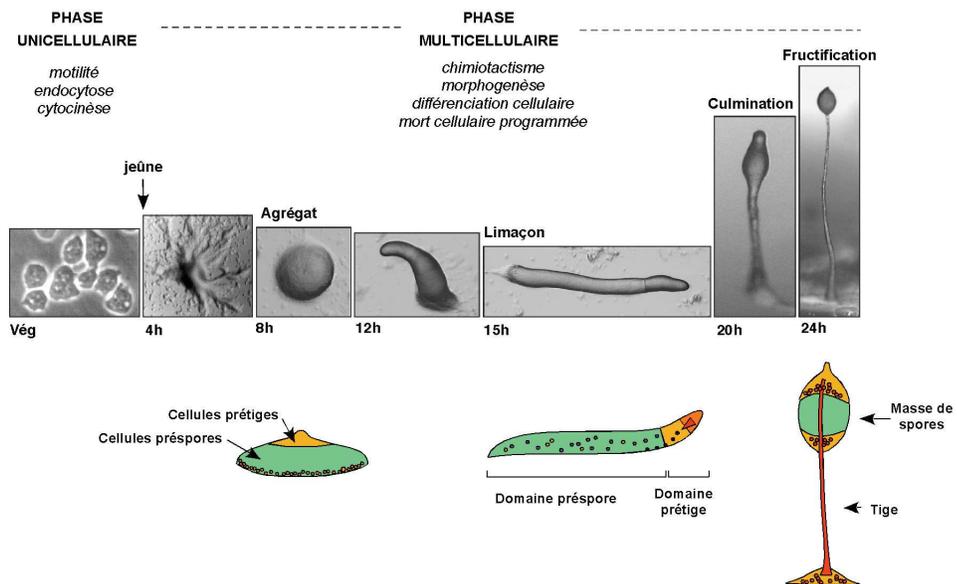
### I. GÉNÉRALITÉS

*Dictyostelium discoideum* est un organisme eucaryote non pathogène appartenant au groupe des Amibozoaires dans lequel on retrouve également les autres membres des Dictyostélides, proches parents de *D. discoideum* (*D. purpureum*, *Polysphondylium pallidum*...) ou encore l'amibe pathogène *Entamoeba histolytica*. Des analyses phylogénétiques s'appuyant sur des données de protéomique indiquent que ce groupe aurait divergé du tronc commun menant aux animaux après la séparation du royaume des plantes mais avant celle des champignons (Figure 23) (Eichinger et al., 2005).

#### 1. Cycle de vie de l'organisme

*Dictyostelium discoideum* doit son nom d'amibe sociale à sa forme amiboïde et son cycle de vie très particulier qui associe une phase végétative unicellulaire et une phase multicellulaire, déclenchée par la carence nutritive, qui conduit à l'agrégation des cellules individuelles et permet la survie d'une partie de la population aux conditions de carence (Figure 24). En effet, en présence de nutriments, l'organisme se présente sous un état unicellulaire où il se multiplie activement (temps de doublement de 2 à 12 h en fonction des nutriments) et est animé d'une motilité exploratoire particulièrement intense qui s'appuie sur l'émission de pseudopodes. Les cellules présentent alors une activité endocytaire très développée de type phagocytaire (et macropinocytaire pour les souches axéniques utilisées en laboratoire) qui place l'organisme au même rang que les phagocytes professionnels, comme les macrophages ou les neutrophiles.

L'absence de nutriments amène l'organisme à s'engager dans un programme de développement dont l'étape première est l'agrégation des cellules en jeûne (Aubry and Firtel, 1999). Les cellules migrent de façon coordonnée en réponse à des pulses d'AMPc sécrété par ces mêmes cellules et qui joue un rôle de chimio-attractant par liaison à des récepteurs membranaires de type RCPG (plus particulièrement le récepteur à l'AMPc, cAR1). L'activation du récepteur cAR1 conduit à l'activation des cascades de signalisation nécessaires à la migration chimiotactique, au relais du signal chimiotactique et également à l'induction de l'expression des protéines impliquées dans cette phase du développement (cAR1, l'adénylyl cyclase ACA, ...). Une fois formé, l'agrégat multicellulaire contenant environ 100 000 cellules va évoluer successivement en limaçon puis en fructification (sorocarpe) par différentes étapes de morphogenèse et de différenciation cellulaire (Figure 24). Dès le stade agrégat, les cellules optent pour un devenir spécifique, pré-tiges (30 % des cellules) ou pré-



**Figure 24. Cycle de développement de l'organisme *Dictyostelium discoideum*.**

En conditions nutritives, *Dictyostelium* est sous une forme unicellulaire. Cet état correspond à une phase de multiplication cellulaire et de motilité exploratoire actives. La situation de jeûne induit l'activation d'un programme de développement multicellulaire avec agrégation chimiotactique des cellules carencées et formation d'une fructification contenant des spores. Ces formes de résistance donneront à nouveau des cellules dans des conditions plus favorables.

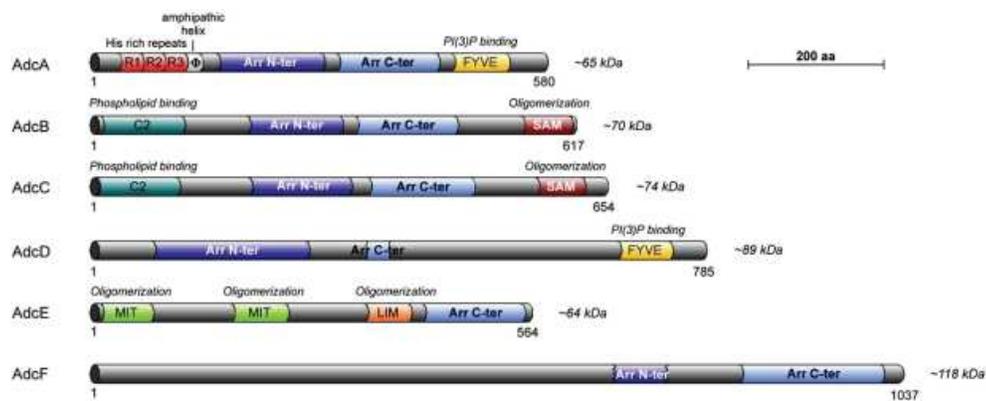
spores (70 %) et achèveront leur différenciation dans la phase terminale du développement soit comme cellules tiges, des cellules mortes qui constituent les structures de soutien dans la fructification (notamment la tige), soit comme cellules spores en dormance qui, par germination, ramèneront l'organisme à son état unicellulaire dans des conditions de l'environnement plus optimales (Figure 24). La différenciation des cellules précurseurs pré-tiges et pré-spores met en jeu une communication intercellulaire complexe entre les différents types cellulaires et des facteurs extracellulaires sécrétés qui agissent comme chimio-attractant et morphogène tels que l'AMPc, qui fonctionne alors à des concentrations supérieures à celles mises en jeu pendant l'agrégation, la cétone chlorée DIF (*Differentiation inducing factor*) ou encore le peptide SDF2 (Aubry and Firtel, 1999).

## 2. Les atouts et intérêts du modèle

Différentes étapes du cycle de vie de l'amibe *Dictyostelium* présentent un intérêt évident en recherche fondamentale du fait des processus biologiques impliqués, et accessibles à l'étude chez cet organisme modèle, d'autant que le séquençage et l'annotation de son génome ont confirmé la conservation phylogénétique avec les organismes supérieurs d'un nombre conséquent d'acteurs protéiques et de cascades de signalisation : en phase végétative, la motilité, l'endocytose et la cytokinèse notamment, en phase développementale, le chimiotactisme, la morphogénèse ou encore la mort cellulaire non-apoptotique qui concerne les cellules tiges de la fructification (Figure 24). *Dictyostelium* est également un modèle validé pour la dissection de la relation hôte-pathogène avec des pathogènes au centre des préoccupations actuelles en santé humaine comme *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium spp* (Bozzaro and Eichinger, 2011; Cosson and Soldati, 2008; Steinert, 2011).

Divers outils sont applicables à l'organisme *Dictyostelium*, notamment des techniques de génétique moléculaire comme l'inactivation génique, la surexpression ou encore le remplacement génique. Dans la plupart des cas, l'haploïdie du génome facilite et simplifie l'étude des mutations. L'approche de mutagenèse par la technique REMI (*Restriction Enzyme Mediated Integration*) est un outil particulièrement efficace pour générer des collections de mutants par l'insertion semi-aléatoire d'une cassette de résistance à un antibiotique dans le génome amibien. La connaissance du génome (34 mégabases, 6 chromosomes) codant pour environ 12 500 protéines autorise maintenant la mise en œuvre d'approches de biologie à grande échelle de type transcriptomique et protéomique.

Enfin, la simplicité de ses conditions de culture permet également l'obtention rapide d'une quantité importante de matériel biologique pour des approches de biochimie. En revanche, le génome très A/T-riche de *Dictyostelium* peut apparaître comme une limitation qui impose parfois de revoir l'usage des codons pour permettre l'expression dans l'amibe d'homologues (systèmes d'expression hétérologues) ou de rapporteurs utilisés chez d'autres espèces au génome plus riche en G/C.



**Figure 25 : Représentation schématique des arrestines non conventionnelles de l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*** (extrait de Aubry et al., 2009).

Les protéines présentent plusieurs domaines fonctionnels, en plus du cœur arrestine, identifiables par les logiciels de recherche de motifs protéiques SMART et PFAM, susceptibles d'assurer des interactions avec des partenaires protéiques (SAM, LIM, MIT) et lipidiques (C2, FYVE).

## II. LE RÉPERTOIRE ARRESTINE DE *Dictyostelium*

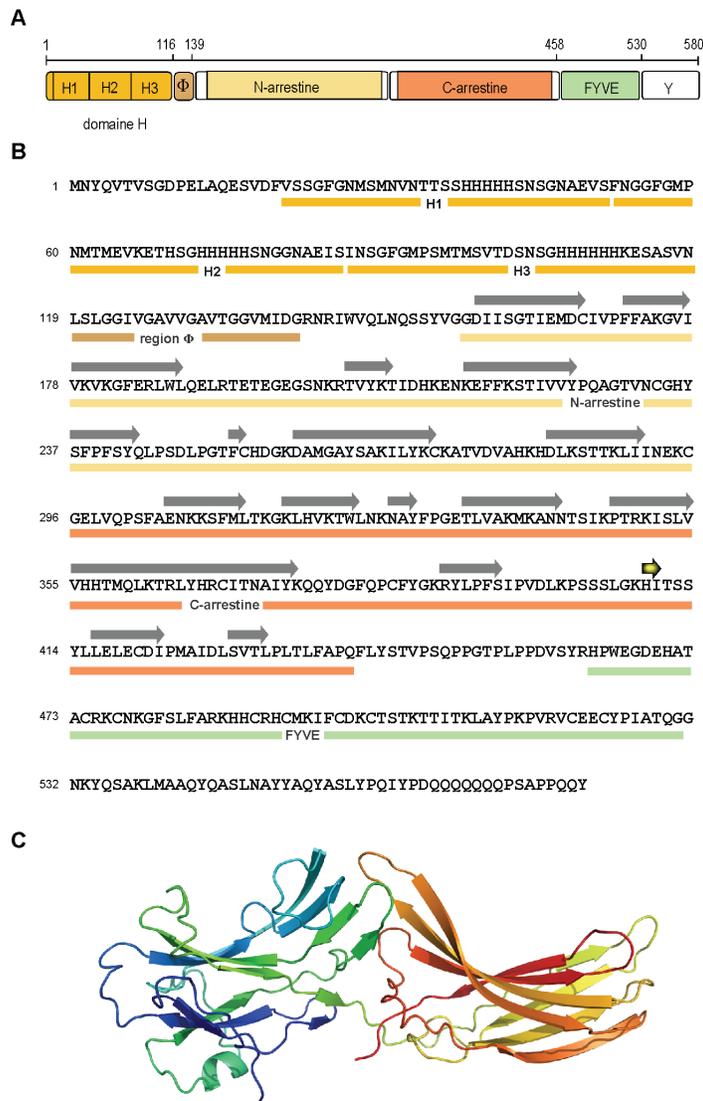
### 1. Identification des membres du clan arrestine de *Dictyostelium*

La connaissance du génome complet de *Dictyostelium* a permis à l'équipe de rechercher des homologues amibiens des arrestines. Six gènes codant pour des arrestines non conventionnelles ont été identifiés et nommés AdcA à F pour *Arrestin-Domain Containing proteins* (Figure 25) et n'ont fait l'objet d'aucune étude, à l'exception de l'arrestine AdcA, au laboratoire (Aubry et al., 2009). En plus des domaines arrestine-N et -C, ces protéines Adcs se caractérisent par l'existence de domaines supplémentaires en amont ou/et en aval du cœur arrestine :

- Les protéines AdcA et D possèdent chacune un domaine FYVE (*Fab1, YOTB, Vac1, EEAI domain*), validé pour AdcA comme domaine de liaison au PI<sub>3</sub>P (Guetta et al., 2010). Malgré la présence de ce domaine en commun, les deux protéines diffèrent par leur longueur (580 a.a. pour AdcA vs 785 a.a. pour AdcD), leur extrémité N-terminale qui présente un motif poly-histidine tri-répété chez AdcA absent de AdcD et leur profil d'expression. En effet, AdcA est majoritairement exprimée en phase végétative alors que l'expression de AdcD est plus spécifique de la phase multicellulaire (Guetta et al., 2010).

- A la différence de AdcA et D, les protéines AdcB et C présentent un fort degré d'identité (~40%) et une organisation structurale globale très similaire avec un domaine de type C2 en N-terminal prédit pour lier les phospholipides de façon calcium-dépendante et un domaine SAM (*Sterile alpha-motif*) en C-terminal, classiquement impliqué dans des interactions protéine/protéine. Toutefois, le profil d'expression de ces deux protéines est différent (<http://dictybase.org>) suggérant que, malgré une architecture très proche, elles pourraient fonctionner de façon non redondante dans des phases du cycle développemental distinctes. La protéine AdcB possède un site canonique PPxY susceptibles de lier des motifs WW, qui est remplacé par la séquence TPxY dans la protéine AdcC.

- En ce qui concerne la protéine AdcE, alors que la présence du domaine arrestine-C semble bien établie, l'existence du domaine arrestine-N reste à confirmer. Cette protéine contient par ailleurs plusieurs domaines d'interaction protéique de type LIM (*Lin-11, Isl-1 and Mec-3 domain*) et MIT (*microtubule interacting and trafficking domain*). Le domaine MIT, présent notamment dans les protéines Vps4 ou Snx15, est un petit module capable d'interagir avec les domaines MIM (*MIT-interacting motif*) portés par des protéines partenaires, qui semble fonctionner également comme domaine d'interaction avec les phosphoinositides de façon calcium-dépendante (Iwaya et al., 2013). Les travaux menés au laboratoire indiquent que cette protéine, sous une forme fusionnée à la GFP, est massivement présente à la membrane plasmique (Aubry et Klein, non publié). Une possible régulation par le calcium dans ce ciblage n'a pas été établie.



**Figure 26 : Séquence et organisation multi-modulaire de la protéine AdcA.**  
**A.** L'organisation multi-modulaire d'AdcA est schématisée et la longueur des domaines est indiquée (en a.a.). **B.** Séquence protéique d'AdcA. La prédiction d'une organisation en feuillet est indiquée par des flèches. **C.** Structure tridimensionnelle du domaine arrestine d'AdcA, obtenu à partir de la structure de l'arrestine visuelle de bœuf (2WTR) à l'aide du logiciel Phyre et visualisée avec PyMOL.

- Enfin, la protéine AdcF se distingue des 5 autres par la présence d'une longue extension en amont du cœur arrestine, qui ne s'apparente à aucun domaine connu ni chez *Dictyostelium* ni chez d'autres organismes.

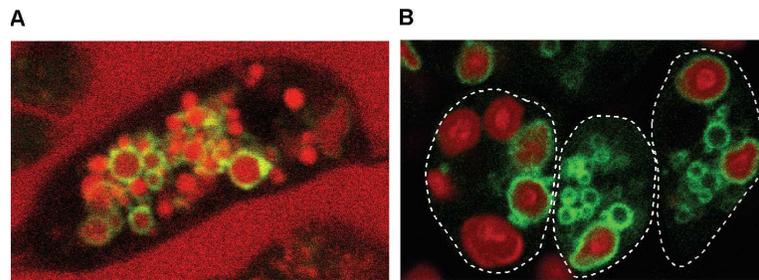
Des homologues des Adcs de *D. discoideum* présentant notamment des domaines FYVE ou C2 ont pu être identifiés chez d'autres membres des Amoebozoaires comme *D. purpureum*, *Polysphondilium pallidum* ou encore *Entamoeba histolytica*. La présence de ces différents domaines les distingue des arrestines décrites jusque-là. Ces membres atypiques pourraient avoir des rôles et des modes de fonctionnement spécifiques ajoutant encore une diversité de fonctions des membres du clan arrestine. En revanche, du fait de la position des Amoebozoaires dans l'évolution, elles pourraient également assurer des fonctions ancestrales en partie communes avec les arrestines conventionnelles et non conventionnelles.

## 2. La protéine AdcA de *Dictyostelium*

L'arrestine non conventionnelle AdcA présente une organisation où son domaine arrestine, modélisable à partir de la structure de l'arrestine visuelle de bœuf (2WTR), occupe une position centrale et est encadré en N-terminal par un domaine tripliqué riche en résidus histidines organisés en *cluster* (domaine H : H1-H2-H3), suivi d'une région hydrophobe riche en glycine ( $\Phi$ ) et en C-terminal par un domaine en doigt de zinc de type FYVE suivi d'une queue C-terminale riche en résidus tyrosine (Figure 26) (Guetta et al., 2010).

Les travaux de D. Guetta dans l'équipe ont permis d'établir que la protéine AdcA est associée de façon semi-constitutive à la voie endocytaire via le domaine FYVE et sa liaison au PI<sub>3</sub>P enrichie sur les endosomes/phagosomes (Figure 27). La délétion du domaine FYVE ou l'introduction d'une mutation altérant la liaison au PI<sub>3</sub>P (R<sup>491</sup>A) conduit à une localisation cytosolique de la protéine (Guetta et al., 2010). Le domaine H quant à lui est capable d'oligomériser en réponse à des métaux et pourrait contribuer à la formation d'oligomères de la protéine *in vivo* en réponse à des signaux spécifiques.

L'invalidation génique de *adcA* et la caractérisation phénotypique du mutant *adcA* nul n'ont pas permis jusque là de déterminer le rôle physiologique de la protéine. Le mutant invalidé pour *adcA* présente un temps de doublement, une activité endocytaire (macropinocytaire et phagocytaire) ainsi qu'un développement multicellulaire comparables à la souche parentale. Toutefois, la localisation endocytaire de la protéine et l'identification de la petite protéine G ArfA - un acteur clé du trafic vésiculaire chez les Mammifères, partenaire des  $\beta$ -arrestines - comme partenaire de AdcA suggère, par analogie avec les autres membres du clan arrestine, un rôle dans la régulation du trafic de cargos membranaires (Guetta et al., 2010).



**Figure 27 : AdcA est localisée sur les compartiments endocytaires.**

La protéine AdcA<sub>GFP</sub> (vert) est présente sur les compartiments macropinosomaires marqués à l'aide du marqueur TRITC-dextran (A) et sur les compartiments phagocytaires identifiables par la présence de levures marquées (rouge) (B).

Chez l'amibe, la membrane plasmique présente une large diversité de protéines de surface impliquées dans la signalisation comme des récepteurs de la famille des RCPGs, des protéines impliquées dans l'adhésion comme les protéines Sib ou des transporteurs divers (Cha et al., 2010; Cornillon et al., 2008; Eichinger et al., 2005; Prabhu et al., 2007; Riyahi et al., 2011). Pour l'essentiel d'entre eux, les mécanismes régulant leur internalisation éventuelle dans la voie endocyttaire et leur devenir n'ont pas été étudiés. Certains pourraient faire l'objet d'une régulation par des membres amibiens du clan arrestine, dont AdcA.

### PARTIE 3 : OBJECTIF DU TRAVAIL DE THÈSE

L'objectif de mon travail de thèse a été la poursuite de la caractérisation fonctionnelle de la protéine AdcA. Les résultats de thèse de Dorian Guetta ont permis un début de caractérisation de ce membre amibien du clan arrestine. Devant l'absence de défaut phénotypique évident pour la souche nulle et exploitable à ce stade pour la suite de la caractérisation, deux orientations ont été privilégiées afin de définir le champs d'action d'AdcA :

- La première s'est appuyée sur l'observation préliminaire au cours du travail de thèse de Dorian Guetta de la présence de formes modifiées de la protéine dans des conditions expérimentales particulières. Étant donné le rôle essentiel des modifications post-traductionnelles dans la régulation des arrestines, tant pour les membres conventionnels que non conventionnels de cette famille de protéines, cet aspect a fait l'objet d'une étude détaillée. Cette partie de mon travail m'a amené à mettre en évidence qu'AdcA est un élément de réponse à divers stress (dont le stress hyper-osmotique) qui fait l'objet d'une régulation par phosphorylation. Les résultats obtenus sont présentés dans la première partie de ce document. Une partie d'entre eux a été publiée dans *Cell Communication and Signaling* (Habourdin et al., 2013) (Annexe 1).

- La deuxième partie de mon travail s'est focalisée sur la caractérisation de nouveaux partenaires de AdcA. Plusieurs recherches de partenaires d'AdcA ont été menées au laboratoire qui n'ont pas permis d'identifier de cibles membranaires de la protéine. En revanche, un partenaire putatif, la protéine FrmC, a été identifié par *pull-down* de façon reproductible. Cette protéine inconnue nous a semblé être un candidat intéressant, au vu des résultats de la partie 1, du fait de la présence de modules susceptibles de lier des partenaires membranaires et l'actine, une autre cible du stress hyper-osmotique. Aucun travail spécifique de FrmC n'ayant été publié jusque là dans la littérature, il a été nécessaire de mettre en place les outils nécessaires à cette étude et d'entamer une caractérisation fonctionnelle de la protéine FrmC avant d'explorer son interaction avec AdcA. Ce travail fait l'objet de la deuxième partie de mon manuscrit et d'une publication en cours de rédaction.



# RÉSULTATS ET DISCUSSION

---



## **PARTIE 1 : ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE ADcA EN CONDITION DE STRESS**

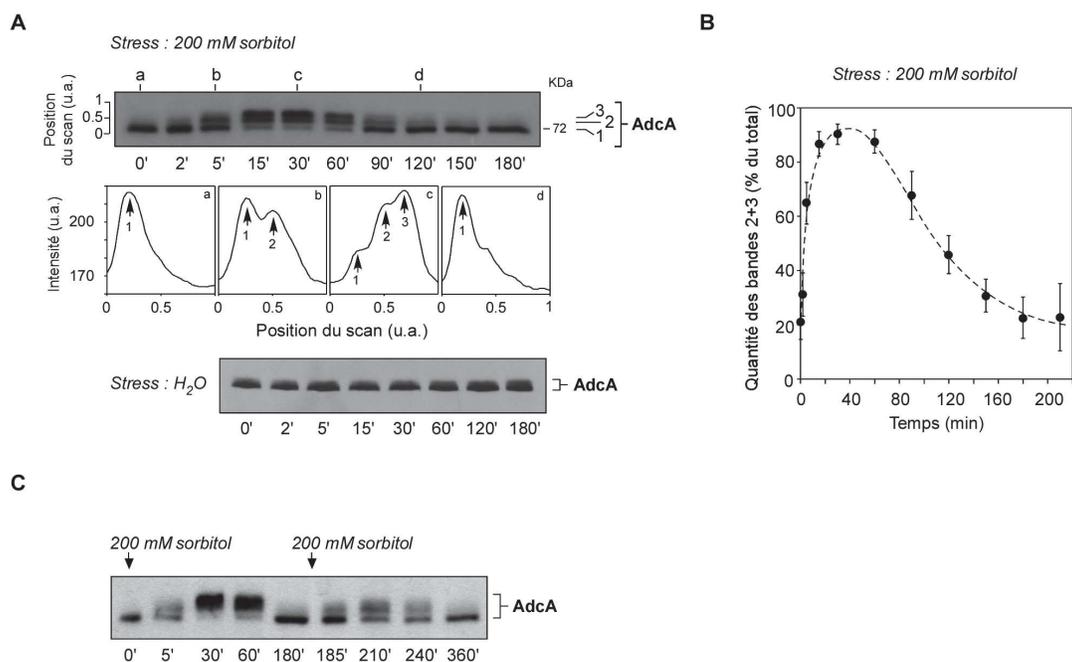
### **I. ADcA EST UN ÉLÉMENT DE RÉPONSE AU STRESS CHEZ *DICTYOSTELIUM***

Les travaux antérieurs de Dorian Guetta dans l'équipe ont montré qu'AdcA présente un profil de migration électrophorétique variable selon les conditions expérimentales (centrifugation des cellules et changement de milieu) suggérant l'existence de modifications post-traductionnelles, susceptibles de réguler la fonction de la protéine. Les conditions exactes responsables des changements occasionnés sur le profil de migration d'AdcA n'avaient pas été déterminées mais leur identification devait pouvoir nous donner des pistes quant au champ d'action de cette protéine adaptatrice et possiblement sur son rôle physiologique.

#### **1. Optimisation du protocole expérimental pour l'étude de la réponse d'AdcA en condition de stress**

Comme nous le verrons par la suite, mes travaux ont permis de déterminer qu'AdcA est un élément de réponse au stress chez *Dictyostelium* (voir ci-après). L'étude détaillée du comportement d'AdcA a donc nécessité dans un premier temps d'établir un protocole de stress des cellules permettant au mieux de minimiser les stress liés à l'expérience elle-même.

De façon systématique, les cellules de *Dictyostelium* maintenues en phase exponentielle de croissance sont centrifugées et reprises dans du milieu de culture neuf. La centrifugation et la resuspension des cellules étant génératrices de stress divers (anaérobie transitoire, froid, stress mécanique), les cellules sont laissées pendant 1 h 30 à « récupérer » sous agitation à 21°C (température optimale de croissance de l'organisme) avant d'être soumises aux conditions de stress à tester, par addition de l'agent stressant directement dans la suspension cellulaire. Des échantillons de suspension cellulaire sont alors prélevés au cours du temps et les cellules centrifugées 15 sec et lysées immédiatement en tampon Laemmli avant analyse par Western blot du comportement électrophorétique de la protéine AdcA endogène. Dans ces conditions, dans la souche parentale KAx-3, et en l'absence de stress supplémentaire, AdcA endogène migre sous la forme d'une bande unique à



**Figure 28 : AdcA répond au stress hyper-osmotique.**

**A. Changement de mobilité électrophorétique d'AdcA suite à un stress hyper-osmotique.** Des cellules parentales KAx-3 sont soumises à un stress hyper-osmotique de 200 mM sorbitol (panel du haut) ou à un stress hypo-osmotique par dilution du milieu par 4 volumes d'eau (panel du bas). La mobilité électrophorétique d'AdcA est suivie, entre 0 et 180 min post-choc, par Western blot sur des extraits protéiques totaux, en utilisant l'anticorps COB-25 dirigé contre AdcA. Les graphiques (panel du milieu) représentent l'intensité des pixels des bandes le long des lignes a, b, c et d du scan du film en fonction de la position du scan (indiqué par l'échelle arbitraire allant de 0 à 1). **B. Quantification de la proportion d'AdcA modifiée en condition de stress hyper-osmotique.** A partir de l'expérience précédente, la cinétique de modification d'AdcA a été représentée graphiquement. La courbe représente l'intensité du signal des bandes 2 et 3 d'AdcA analysée à partir du scan du film du Western blot à l'aide du logiciel ImageJ et exprimée en % de l'intensité de l'ensemble des bandes d'AdcA (1+2+3), en fonction du temps. La courbe correspond à une moyenne de 4 expériences indépendantes et la déviation standard est indiquée. **C. AdcA répond à 2 chocs hyper-osmotiques successifs.** Les cellules sont soumises à un choc hyper-osmotique de 200 mM sorbitol. Après 180 min de stress, un deuxième choc de 200 mM sorbitol est réalisé (400 mM sorbitol final) et la cinétique de modification d'AdcA est suivie au cours des 2 chocs par Western blot en utilisant l'anticorps anti-AdcA COB-25.

72 kDa (= *bande 1*, figure 28.A, t=0). Très occasionnellement, une petite fraction d'AdcA apparaît sous la forme d'une bande de migration électrophorétique plus lente (= *bande 2*).

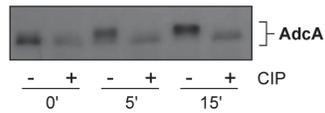
## 2. Caractérisation de la réponse d'AdcA au stress hyper-osmotique

### 2.1. AdcA est modifiée de façon transitoire en situation de choc hypertonique

Les conditions d'observation des modifications de migration électrophorétique d'AdcA réalisée par Dorian Guetta pouvant être liées à une variation d'osmolarité du milieu extracellulaire, nous avons testé dans un premier temps l'impact de chocs osmotiques, surtout que *Dictyostelium* est régulièrement confronté à des variations d'osmolarité dans son habitat naturel. L'addition dans le milieu de culture de sorbitol a été utilisée pour générer une situation de choc hyper-osmotique et de 4 volumes d'eau pour générer un choc hypo-osmotique. Au niveau cellulaire, des mécanismes distincts sont mis en jeu pour lutter contre des situations d'hyper- et d'hypotonicité. *Dictyostelium* possède notamment une vacuole contractile particulièrement efficace en condition hypotonique qui lui permet d'éviter l'éclatement cellulaire par pompage de l'eau vers le milieu extracellulaire (Du et al., 2008; Heuser et al., 1993). Nous reviendrons par la suite de façon plus détaillée sur les mécanismes impliqués dans la réponse au choc hyper-osmotique.

Alors que le choc hypo-osmotique ne modifie pas le profil électrophorétique d'AdcA, une augmentation de l'osmolarité du milieu par ajout de 200 mM sorbitol aboutit à l'apparition successive de la *bande 2* puis d'une troisième bande plus haute (*bande 3*) dans les premières minutes qui suivent l'application du stress (Figure 28.A). Cette réponse est massive, avec plus de 90% d'AdcA sous une forme modifiée (*bandes 2+3*) dans les 30 minutes post-choc et transitoire (Figure 28.A et B). En effet, passé un pic, entre 30 et 60 min, les *bandes 3 et 2* disparaissent progressivement avec une accumulation d'AdcA sous la forme *bande 1* initiale. L'addition d'un supplément de sorbitol (+ 200 mM sorb.) dans le milieu de culture 180 min après le premier choc conduit à une nouvelle réponse d'AdcA, moins forte mais comparable d'un point de vue cinétique (Figure 28.C). Ces résultats indiquent que, malgré le premier choc hyper-osmotique, la cellule est capable de détecter un nouveau stress (+ 200 mOsm) et de réactiver des voies de réponse, conduisant notamment à un nouveau cycle de modification d'AdcA.

Des tests similaires menées sur des souches sur-exprimant la protéine AdcA étendue en C-terminal soit par un épitope myc<sub>2</sub> soit par la GFP et en N-terminal par la RFP, sous le contrôle du promoteur *pAct15*, donnent des résultats identiques (non montré et paragraphe IV.3.1). La présence d'étiquettes de longueurs variables n'affecte donc pas la réponse de la protéine et malgré un niveau d'expression supérieur au niveau endogène, la quasi-totalité de la protéine exprimée est modifiée. Les



**Figure 29 : AdcA répond au stress hyper-osmotique par phosphorylation.**

Des échantillons d'extraits protéiques totaux de cellules KAx-3 soumises ou non (t0') à un stress de 200 mM sorbitol pendant 5 ou 15 min sont traités à la CIP (+). Des échantillons n'ayant pas reçu d'enzyme sont utilisés en contrôle (-). La perte de la modification électrophorétique d'AdcA est observée par Western blot en utilisant l'anticorps anti-AdcA COB-25.

protéines étiquetées et surexprimées ont donc un comportement comparable à celui de la protéine endogène.

Pour des raisons techniques, comme l'observation en microscopie par exemple, les expériences ont parfois été réalisées sur cellules adhérentes plutôt que sur des cellules en suspension. Dans ce cas, les cellules sont déposées sur lame ou boîte de Pétri et laissées à récupérer dans le milieu neuf pendant 1 h 30 avant application du stress. Nous avons vérifié l'existence d'une réponse similaire d'AdcA dans ces conditions. Afin de minimiser les manipulations susceptibles de générer des stress - décollement et resuspension des cellules par exemple - les cellules ont donc été lysées dans la boîte directement par l'addition de tampon Laemmli. Suite à un stress de 200 mM sorbitol, AdcA est modifiée de façon comparable à ce qui est observé sur les cellules en suspension avec apparition successive des *bandes* 2 et 3 (non montré).

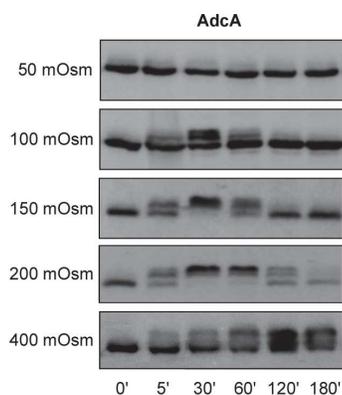
Enfin, au cours de ce travail de thèse, nous avons été amenés à tester la réponse d'AdcA dans différentes souches de *Dictyostelium* utilisées comme souches de référence par la communauté *Dictyostelium* (souches « parentales » KAx-3, Ax-2 ou JH10). Un profil similaire a été obtenu dans ces différents contextes génétiques pour la réponse d'AdcA avec cependant une cinétique un peu accélérée dans la souche AX-2 (voir paragraphe III.4.1).

## 2.2. AdcA est modifiée par phosphorylation

Afin d'identifier la nature des modifications responsables de ce changement de mobilité électrophorétique, les échantillons ont été traités avec une phosphatase alcaline (CIP, *Calf intestine phosphatase*) pour tester la possibilité d'une phosphorylation de la protéine. Comme illustré figure 29, ce traitement conduit à la perte des *bandes* 2 et 3 d'AdcA, indiquant que ces formes correspondent à des états phosphorylés de la protéine. Des résultats similaires ont été obtenus avec la  $\lambda$ -phosphatase (non montré).

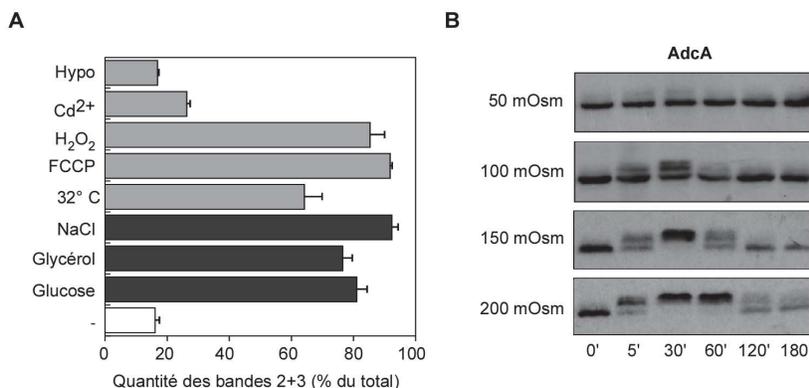
Divers acides aminés sont susceptibles d'être phosphorylés : la sérine (liaison de type O-P), la thréonine (O-P) et la tyrosine (O-P) pour les plus communs, mais également l'acide aspartique (liaison de type acyl-P), l'acide glutamique (acyl-P), l'histidine (liaison de type N-P), la lysine (N-P) ou encore l'arginine (N-P). Toutefois, plusieurs observations nous amènent à penser que la protéine est modifiée sur des résidus sérine(s) ou thréonine(s) :

- le protocole de déphosphorylation utilisé met en œuvre une étape de précipitation en acide trichloracétique (TCA). En l'absence de CIP mais malgré la précipitation en TCA, le profil *bandes* 2+3 est maintenu (Figure 29). Or, seules les liaisons de type O-phosphate (phospho-sérine, -thréonine et -tyrosine) sont stables en milieu acide (Duclos et al., 1991).



**Figure 30 : La réponse d'AdcA au stress hyper-osmotique est dose-dépendante.**

Des cellules parentales KAX-3 sont soumises à un choc hyper-osmotique variable allant de 50 à 400 mM sorbitol. La cinétique de phosphorylation d'AdcA dans ces différentes conditions est suivie au cours du temps par Western blot en utilisant l'anticorps anti-AdcA COB-25.



**Figure 31 : AdcA répond à des stress variés.**

**A.** Des extraits protéiques totaux sont préparés à partir de cellules parentales soumises pendant 30 min à différents chocs hyper-osmotiques de 200 mOsm (100 mM NaCl, 200 mM glycérol, 200 mM glucose), à un choc hypo-osmotique (milieu dilué 5 fois), à des métaux lourds (50  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>), à un choc oxydant (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), à un agent découplant (10  $\mu$ M FCCP) ou à un choc thermique (32°C). Un contrôle sans stress est réalisé. La phosphorylation d'AdcA est analysée par Western blot avec un anticorps anti-AdcA COB-25 et l'intensité des bandes résultantes quantifiée avec le logiciel ImageJ. La proportion des bandes 2 et 3 d'AdcA par rapport à l'ensemble des bandes (1+2+3) est représentée. La courbe représente une moyenne de 3 expériences indépendantes (8 pour le contrôle sans stress)  $\pm$  erreur standard. **B.** Des cellules KAX-3 sont soumises à un stress hyper-osmotique de 50, 100, 150 et 200 mOsm par ajout de NaCl. La phosphorylation d'AdcA est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25.

- par ailleurs, l'utilisation en Western blot de divers anticorps anti-phospho-tyrosine (PY20, 4G10) sur la protéine AdcA immunoprécipitée après 30 min de choc sorbitol (donc majoritairement en *bandes 2+3*) ne donne aucun signal (non montré).

AdcA est une protéine riche en résidus sérines et thréonines (~15%) et son analyse par des logiciels de prédiction de sites de phosphorylation comme ELM (<http://elm.eu.org/>) ou encore Scansite3 (<http://scansite3.mit.edu/>) n'a pas permis d'extraire une liste de sites candidats avec un degré de confiance suffisant pour envisager à ce stade des approches de mutation. Le paragraphe IV.2 présente les travaux qui ont été réalisés afin d'identifier les sites phosphorylés d'AdcA en réponse au stress.

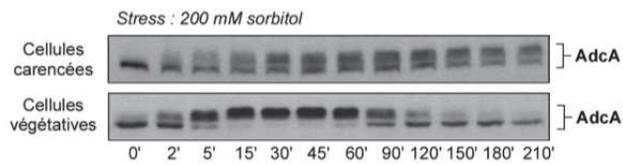
### 2.3. La réponse d'AdcA est dose-dépendante

Afin d'affiner la caractérisation de la réponse d'AdcA, des concentrations variables de sorbitol (50 à 400 mM) ont été testées. La figure 30 nous indique clairement que, à l'exception du choc de 400 mOsm, plus le stress appliqué est fort, plus la réponse d'AdcA est rapide et totale et plus la phosphorylation persiste dans le temps. Toutefois, il faut noter que pour des chocs importants (400 mOsm), la cellule semble répondre différemment : la phosphorylation d'AdcA est partielle avec le maintien d'une fraction conséquente de la protéine sous la forme *bande 1* et ce profil mixte *bandes 1+2+3* est maintenu même 3 h après l'application du choc.

### 3. AdcA répond à différents types de stress

Afin de tester la possibilité qu'AdcA réponde au stress de façon systématique, les cellules ont été soumises à des stress de natures diverses et la phosphorylation d'AdcA a été suivie après 30 min de choc. Après quantification des *bandes 1, 2 et 3* sur Image J, la réponse d'AdcA a été exprimée en % de protéine totale sous la forme *bandes 2+3*. Ainsi, nous avons pu confirmer qu'AdcA répond au stress hyper-osmotique et ceci indépendamment du générateur de stress, par l'utilisation d'autres osmolytes comme le NaCl, le glucose ou encore le glycérol (Figure 31.A, histogrammes noirs). La dose-dépendance de la réponse d'AdcA est à nouveau illustrée pour le NaCl et reflète complètement celle observée en sorbitol (Figures 31.B et 30).

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que la protéine répond également par phosphorylation (sensibilité à la CIP) à un choc thermique (passage de 21°C à 32°C), à un stress oxydant (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou encore un stress généré par l'utilisation d'un agent découplant menant à une chute d'ATP (10 µM FCCP) (Figure 31.A, histogramme gris). Par contre, la réponse d'AdcA n'est pas



**Figure 32 : AdcA est phosphorylée suite à un stress hyper-osmotique en conditions de carence.**

Après 4 h de carence en tampon phosphate, des cellules parentales KAx-3 sont soumises à un choc de 200 mM sorbitol. La phosphorylation d'AdcA est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25. La même expérience sur cellules végétatives est réalisée en contrôle.

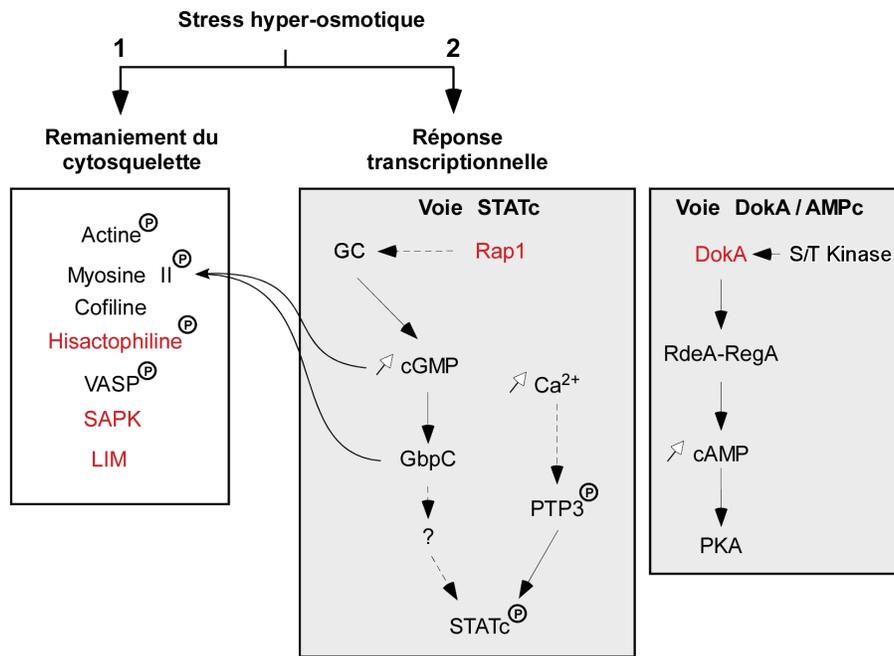
induite par l'addition de métaux lourds ( $\text{Cd}^{2+}$ ) à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , pourtant décrite chez *Dictyostelium* pour ses effets sur la biologie de l'organisme (Klein et Satre, données non publiées).

Au cours de la mise au point de nos tests de stress, nous avons pu constater une réponse partielle d'AdcA suite à la centrifugation à froid et la remise en suspension des cellules, qui pourrait être attribuée à différents stimuli comme l'hypoxie, ou encore un stress mécanique. Cette observation nous a amené à instaurer une période de récupération systématique avant application du stress. Le décollement des cellules adhérentes sur substrat solide en revanche n'est pas activateur de la phosphorylation de AdcA.

La protéine AdcA répond donc à un large éventail de stress, ce qui implique soit une régulation complexe de la protéine à travers des acteurs de signalisation différents en fonction des situations rencontrées, soit un (des) acteur(s) commun(s) dans la réponse à ces différents stress conduisant à la phosphorylation d'AdcA.

## II. CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE CELLULAIRE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE EN CONDITIONS VÉGÉTATIVES

Les résultats précédents ayant mis en évidence que la protéine AdcA répond par phosphorylation à de nombreux stress cellulaires, la suite de mes travaux a cherché à déterminer la cascade de signalisation responsable de cette phosphorylation. Chez *Dictyostelium*, seule la réponse au stress hyper-osmotique a fait l'objet d'un nombre conséquent d'études qui ont conduit à l'identification d'acteurs et de voies de signalisation impliquées dans cette osmo-réponse. L'hyper-osmolarité a donc été choisie comme modèle de stress dans la suite de mon travail. Il faut noter toutefois que l'essentiel des études menées sur la réponse au stress hyper-osmotique chez *Dictyostelium* a été réalisé sur des cellules carencées, à savoir préalablement placées en conditions de jeûne. Or, les travaux de Dorian Guetta ont montré que la protéine AdcA est majoritairement exprimée en phase végétative unicellulaire et que son expression décline avec la mise en place du programme de développement multicellulaire déclenché par la carence, suggérant un rôle d'AdcA plutôt dans la phase végétative. Nous avons cependant analysé la réponse d'AdcA après 4 h de carence et malgré un niveau d'expression plus faible, la protéine est encore présente à un niveau détectable et reste sensible à l'hyper-osmolarité (Figure 32). Néanmoins, la cinétique de phosphorylation est différente de celle observée en conditions végétatives. En effet, la réponse d'AdcA est moins rapide et totale, avec une persistance des *bandes 1* et *2*, comparable à celle observée pour un choc de 400 mM sorbitol en conditions végétatives (Figure 30 et 32). De même, AdcA reste sous ses 3 formes même après 3 h de choc.



**Figure 33 : Voies de signalisation activées en stress hyper-osmotique en condition de carence : données bibliographiques.**

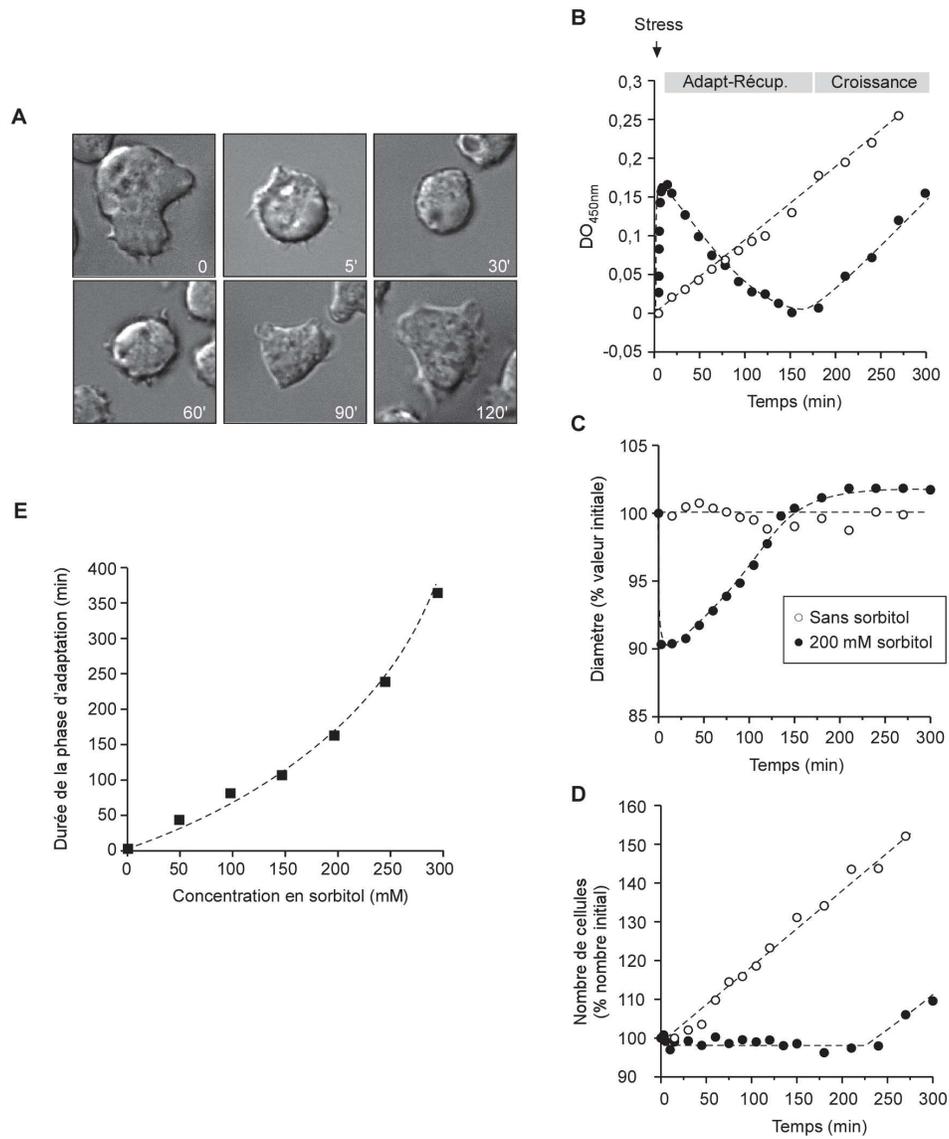
Suite à un stress hyper-osmotique, la cellule subit d'importantes modifications morphologiques engendrées par un remaniement du cytosquelette (1) et active différentes voies de signalisation (2) (voir texte). Les flèches représentent une activation de la protéine en amont sur la protéine en aval. Les flèches noires correspondent aux données de la littérature en condition de stress hyper-osmotique et les flèches grises indiquent une activation dans un autre contexte cellulaire. Les flèches en pointillées représentent une activation proposée. Les protéines en rouge correspondent aux protéines dont l'inactivation génique provoque une diminution de la viabilité des cellules en stress hyper-osmotique. Le signe P est placé à côté des protéines régulées par phosphorylation.

La carence nutritive conduit à des modifications du métabolisme cellulaire avec l'induction de gènes nécessaires à la phase d'agrégation des cellules et leur différenciation (Aubry and Firtel, 1999). Par ailleurs, des gènes sont réprimés et des fonctions cellulaires inhibées comme la macropinocytose (Smith et al., 2010a). Afin d'éviter une situation complexe où le stress nutritif se surajouterait au stress osmotique, nous avons fait le choix de poursuivre l'étude sur des cellules en phase végétative où la réponse d'AdcA est massive et réversible. Ceci nous a amené à revoir la réponse des cellules au stress hyper-osmotique dans ces conditions de croissance, assez peu étudiée, à la lumière des données publiées sur cellules carencées.

### 1. Données bibliographiques

A l'exception des travaux de transcriptomique menés par l'équipe d'Eichinger (Na et al., 2007), les recherches visant à disséquer la réponse des cellules de *Dictyostelium* à l'hypertonie ont été menées sur des cellules placées en milieu non nutritif sur une durée plus ou longue avant application du stress. Malgré des conditions expérimentales différentes (milieu de carence, temps de carence allant de 1 à 4 h, gamme de concentration de sorbitol allant de 50 à 400 mM), les travaux s'accordent sur les observations suivantes : l'application d'un stress hyper-osmotique conduit à un arrondissement rapide des cellules avec une diminution plus ou moins grande du volume cellulaire en fonction de la concentration en osmolyte utilisée (Oyama and Kubota, 1997; Zischka et al., 1999). Ces changements morphologiques s'accompagnent d'un remaniement massif du cytosquelette d'acto-myosine qui s'organise alors pour former une coque sous-corticale de protection contre la pression osmotique (Insall, 1996; Kuwayama et al., 1996).

Aussi, différentes voies de signalisation ont été décrites pour être activées en condition de stress hyper-osmotique, qui aboutissent à une chute du pH cytosolique et la production de messagers secondaires comme le GMPc (**G**uanosine **m**onophosphate **c**yclique) et l'AMPc (**A**dénosine **m**onophosphate **c**yclique), nécessaires au remaniement du cytosquelette et/ou à la mise en place d'une réponse transcriptionnelle d'adaptation au stress (Figure 33) (Kuwayama and Van Haastert, 1998; Ott et al., 2000; Oyama, 1996). Deux voies de régulation transcriptionnelle ont été décrites en détail : la voie STATc (*Signal transducer and activator of transcription c*) et la voie PKA (*Protein kinase A*). L'activation de la PKA met en jeu un système à deux composants impliquant la protéine histidine kinase DokA et la phosphodiesterase RegA, régulant directement la concentration intracellulaire d'AMPc (Oehme and Schuster, 2001; Ott et al., 2000; Schuster et al., 1996; Thomason et al., 1999). Le facteur de transcription STATc quant à lui est activé par phosphorylation via une double régulation : l'activation de sa kinase de nature inconnue à travers l'augmentation de GMPc et dépendante de la sérine/thréonine kinase GbpC (*Guanine binding protein C*) et l'inhibition par phosphorylation de sa phosphatase PTP3 (*Protein-tyrosine phosphatase 3*) via une voie calcium-



**Figure 34 : Changements morphologiques cellulaires engendrés par un stress hyper-osmotique.**

Des cellules KAX-3 sont soumises à un stress hyper-osmotique de 200 mM sorbitol puis suivies au cours du temps par (A) vidéo-microscopie à contraste interférentiel (changement du milieu après étalement des cellules), (B) par spectrophotométrie à 450 nm ou (C, D) par comptage/mesure du diamètre sur un compteur de cellules. L'évolution au cours du temps du diamètre des cellules est illustré en C et celle du nombre de cellules en D. En E, la durée de la phase de récupération des cellules soumises à un choc hyper-osmotique allant de 50 à 400 mM sorbitol est extraite d'expériences de suivi de la DO des suspensions cellulaires par spectrophotométrie à 450 nm. Chaque graphique (B, C, D et E) illustre une expérience représentative.

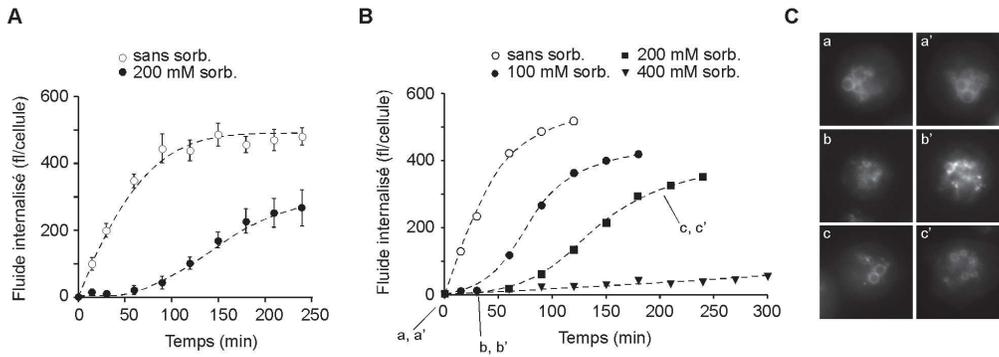
dépendante (Araki et al., 2003, 2008, 2010; Gamper et al., 1999). La phosphorylation de STATc permet la dimérisation de la protéine et sa translocation dans le noyau. Les travaux de Na *et al.* réalisés sur cellules végétatives ont permis une étude détaillée de l'osmo-réponse au niveau transcriptionnel, démontrant la modification de l'expression d'environ 800 gènes dans les 2 h qui suivent l'application d'un stress de 200 mM sorbitol (Na et al., 2007). Environ 20% de ces gènes sont sous le contrôle de STATc. Les principaux acteurs impliqués dans cette réponse au stress hyper-osmotique chez *Dictyostelium* en condition de jeûne sont récapitulés figure 33.

## 2. Effet du stress hyper-osmotique sur les cellules végétatives

### 2.1. L'hyper-osmolarité affecte la morphologie des cellules

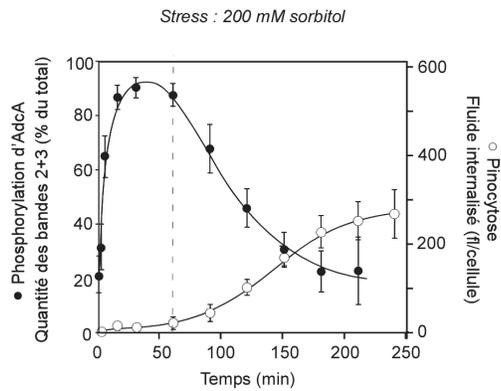
L'impact du stress hyper-osmotique sur les cellules végétatives a été évalué dans un premier temps par microscopie à contraste interférentiel (DIC). En milieu nutritif et sur un substrat solide, les cellules de *Dictyostelium* sont naturellement adhérentes et mobiles. L'extension de protrusions à l'avant de la cellule coordonnée à la rétraction de la zone postérieure permet son déplacement et la formation de coupes macropinocytiques permet une endocytose soutenue de type macropinocytair. L'addition de 200 mM sorbitol dans le milieu de culture conduit à une réaction très rapide des cellules. Dans les premières minutes, les cellules s'arrondissent et s'immobilisent (Figure 34.A). Cette situation est maintenue pendant au moins 60 min avec l'apparition occasionnelle de petites extensions. Progressivement, et malgré le maintien du sorbitol dans le milieu de culture, les cellules récupèrent leur aspect initial avec la formation de protrusions plus importantes et de vésicules endocytaires et le retour à un état étalé (Figure 34.A, 120 min).

Ces changements morphologiques ont pu également être suivis par spectrophotométrie ( $DO_{450nm}$ ), la densité optique mesurée étant fonction du nombre et de la taille des cellules. La figure 34.B illustre l'évolution de la  $DO_{450nm}$  de la suspension cellulaire après addition de 200 mM sorbitol dans le milieu. L'analyse en parallèle de la suspension cellulaire sur un compteur de cellules Coulter-Beckman nous a permis de suivre la croissance des cellules et l'évolution de leur diamètre (Figure 34.C et D). Trois phases peuvent être identifiées à partir de l'évolution de la  $DO_{450nm}$ . Immédiatement après l'application du stress, la  $DO_{450nm}$  augmente brusquement de façon concomitante avec la diminution du volume cellulaire (environ 30% du volume initial). La  $DO_{450nm}$  diminue ensuite progressivement et régulièrement sur les 160 min suivantes. Pendant cette phase, le volume cellulaire augmente également pour rejoindre une valeur proche de la valeur de départ. Cette période a été appelée **phase d'adaptation/récupération**. La  $DO_{450nm}$  augmente ensuite régulièrement, sans doute lié en partie à la reprise de la croissance cellulaire (Figure 34.B et D).



**Figure 35 : Macropinocytose en conditions de stress hyper-osmotique.**

**A. Le stress hyper-osmotique conduit à l'arrêt de l'activité endocyttaire.** Des cellules parentales KAX-3 sont soumises ou non à un stress hyper-osmotique généré par l'ajout de sorbitol 10x (200 mM final). Simultanément, 1 mg/ml de FITC-dextran est ajouté à la suspension cellulaire et l'internalisation de phase fluide est quantifiée par spectrofluorimétrie ( $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}/\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ ) sur des échantillons cellulaires prélevés au cours du temps. Le graphique représente la quantité moyenne de fluide internalisé par cellule ( $n = 5$  sans sorbitol,  $n = 3$  pour 200 mM sorbitol). **B. La reprise de l'activité endocyttaire en conditions de stress hyper-osmotique est dose-dépendante.** La même expérience que précédemment est réalisée avec différentes concentrations de sorbitol allant de 0 à 400 mM. Les courbes représentent une expérience représentative.



**Figure 36 : Corrélation entre la phosphorylation d'AdcA et la phase de latence de l'activité endocyttaire en condition de stress hyper-osmotique.**

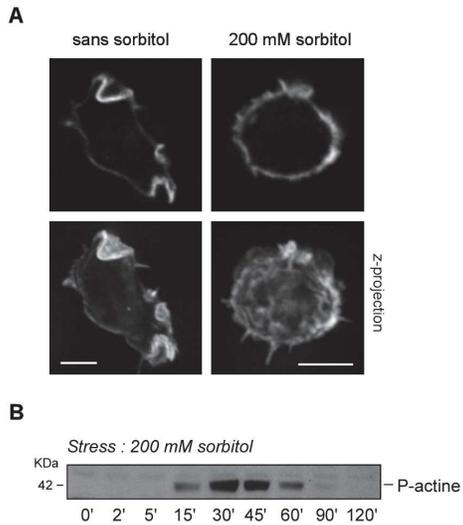
Ce graphique correspond à la superposition des courbes de cinétique de phosphorylation d'AdcA (Figure 28.B) et de l'activité macropinocyttaire (Figure 35.A), suite à un stress de 200 mM sorbitol.

La récupération des cellules dans des conditions de stress hyper-osmotique n'a pas été décrite jusque là sans doute du fait des conditions expérimentales utilisées : état de jeûne, cinétiques courtes et variation d'osmolarité peut-être trop forte. En effet, les travaux de Zischka *et al.* ont décrit que des cellules carencées 1 h et soumises à un stress de 400 mM sorbitol sont incapables de restaurer leur volume cellulaire initial au moins dans les 2 h qui suivent le choc (Zischka *et al.*, 1999). Dans nos conditions, l'utilisation d'une gamme de concentration de sorbitol, allant de 50 à 400 mM, montre clairement que le temps de récupération augmente proportionnellement avec la concentration et confirme qu'un choc important (300 mM sorbitol) ne permet pas une récupération des cellules même après 6 h post-addition (Figure 34.E).

## 2.2. L'hyper-osmolarité conduit à un arrêt de l'activité endocyttaire

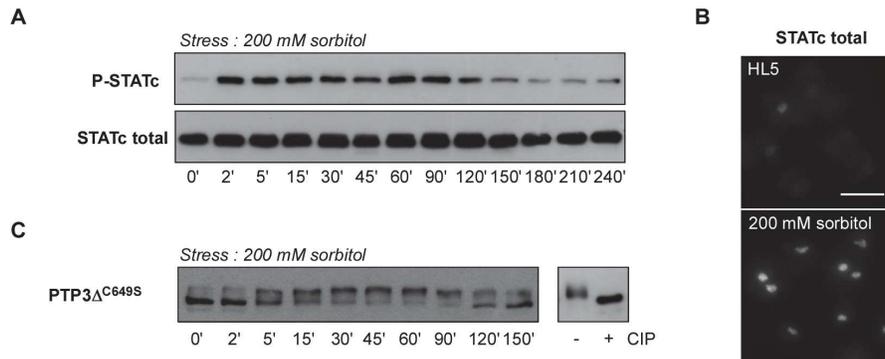
Les travaux du groupe en collaboration avec l'équipe de Schuster ont montré qu'un choc de 400 mM sorbitol appliqué à des cellules carencées conduit également à un arrêt du trafic vésiculaire et de l'activité endocyttaire (avec fragmentation des compartiments), qui a été attribué à une diminution du pH intra-cytosolique passant de 7,5 à 6,8 (Pintsch *et al.*, 2001). L'impact du stress hyper-osmotique sur la dynamique endocyttaire des cellules végétatives a été mesuré par leur capacité à internaliser le marqueur de phase-fluide, FITC-dextran. Comme observé sur les cellules carencées, l'addition de sorbitol dans le milieu (200 mM final) conduit à un arrêt quasi immédiat des mouvements vésiculaires intra-cytoplasmiques (non montré) et de l'internalisation du milieu de culture par macropinocytose (Figure 35.A). Après une phase de latence comprise entre 60 et 90 min, les cellules reprennent leur activité endocyttaire, un résultat en accord avec la formation de coupes macropinocytiques visibles en microscopie et la reprise ultérieure de la croissance cellulaire mentionnée plus haut. Toutefois, il faut noter que la vitesse d'internalisation est moins rapide qu'en absence de stress ( $2,29 \pm 0,19$  fl/cellule/min contre  $5,59 \pm 0,28$  sans stress,  $n = 3$ ). Par ailleurs, la phase de latence avant la reprise d'activité endocyttaire est plus courte que la phase d'adaptation mesurée par le suivi de  $DO_{450nm}$ . Ces observations pourraient indiquer que malgré cette reprise, les cellules ne récupèrent pas complètement leur état initial ou de façon asynchrone. L'utilisation de concentrations variables de sorbitol indique que le temps de latence avant retour de l'activité endocyttaire est proportionnel à la force du choc (figure 35.B). En accord avec les observations précédentes, dans le cas d'un choc à 400 mM sorbitol, les cellules ne récupèrent pas leur activité endocyttaire même après 300 min.

La comparaison des cinétiques d'endocytose et de phosphorylation d'AdcA indique qu'AdcA est sous sa forme phosphorylée (*bande 2+3*) sur la durée de la phase de latence et que sa déphosphorylation coïncide avec la reprise de l'endocytose (Figure 36).



**Figure 37 : Impact du stress hyper-osmotique sur l'organisation de l'actine.**

**A. L'actine-F est relocalisée en conditions d'hypertonie.** Des cellules KAX-3 sont laissées à adhérer 1h en milieu de culture et stressées ou non 5 min avec du sorbitol (200 mM). L'actine-F est visualisée à l'aide d'un marquage à la phalloïdine-Alexa 594 après fixation des cellules en 4 % PFA, 0,1 % Triton X-100. Une section optique ainsi que la superposition de l'ensemble des sections optiques réalisées (z-projection) sont montrées après déconvolution des images à l'aide du logiciel Axiovision. Échelle = 5  $\mu$ m. **B. L'actine est phosphorylée transitoirement suite à un stress de 200 mM sorbitol.** Des cellules KAX-3 sont soumises à un stress hyper-osmotique de 200 mM sorbitol. La cinétique de phosphorylation de l'actine est suivie par Western blot, à partir d'échantillons protéiques totaux, à l'aide d'un anticorps anti-phospho-tyrosine (PY20).



**Figure 38 : STATc est activée par un stress hyper-osmotique en conditions végétatives.**

**A. STATc est phosphorylée en réponse à un choc de 200 mM sorbitol.** Des cellules parentales KAX-3 sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol et la phosphorylation de STATc est analysée par blot à l'aide d'un anticorps spécifique anti-phospho-STATc (CP22). La quantité de STATc totale est contrôlée à l'aide d'un anticorps anti-STATc total (7H3). **B. STATc transloque dans le noyau suite au stress hyper-osmotique.** Après étalement, des cellules KAX-3 sont stressées par une solution de 200 mM sorbitol. La localisation de STATc est suivie par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-STATc total (7H3). Échelle = 10  $\mu$ m. **C. PTP3, la phosphatase de STATc, est phosphorylée suite à un stress de 200 mM sorbitol.** Des cellules KAX-3 exprimant la forme tronquée  $myc$ PTP3 $\Delta$ C649S sont soumises à un stress hyper-osmotique de 200 mM sorbitol et la mobilité électrophorétique de  $myc$ PTP3 $\Delta$ C649S est suivie au cours du temps par blot à l'aide d'un anticorps anti-myc (panel de gauche). L'échantillon protéique prélevé après 30 min de stress est traité (+) ou non (-) avec de la CIP (panel de droite).

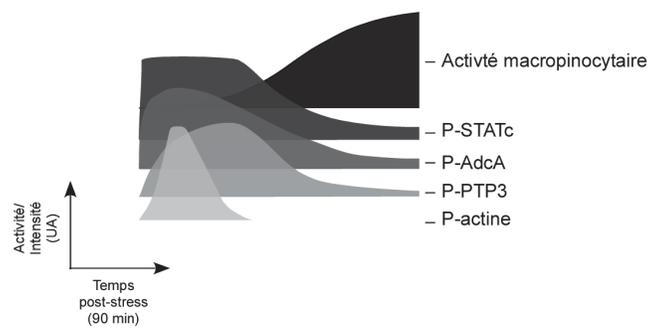
Par ailleurs, les travaux de l'équipe ont montré qu'en conditions nutritives optimales (sans stress), AdcA est massivement présente sur la voie endocyttaire où elle se localise sur le pourtour des compartiments phagocytaires et macropinocytaires précoces (Guetta et al., 2010). Aux vues des données précédentes sur l'effet du stress hyper-osmotique sur l'activité endocyttaire et des travaux de Pintsch *et al.* démontrant une fragmentation de la voie endocyttaire dans des conditions de stress similaires, nous avons donc cherché à savoir si la phosphorylation d'AdcA affecte sa localisation subcellulaire (Pintsch et al., 2001). Des expériences d'immunofluorescence utilisant l'anticorps anti-GFP sur des cellules *adcA*<sup>-</sup> surexprimant AdcA<sub>GFP</sub> indiquent que la protéine est retrouvée sur des vésicules de très petite taille après l'application d'un stress de 200 mM sorbitol (Figure 35.C). Progressivement et de façon concomitante avec l'adaptation des cellules au stress, AdcA retrouve une distribution plus « classique » sur des macropinosomes. Malgré un marquage d'AdcA différent en condition d'hyperosmolarité, qui semble refléter les données sur la fragmentation de l'ensemble de la voie endocyttaire, la protéine reste associée à des vésicules. Toutefois, il est possible que ces vésicules ne soient pas de type endocytaires et il serait intéressant de vérifier leurs natures.

### 2.3. L'hyper-osmolarité conduit à la restructuration du réseau d'actine

L'addition de sorbitol dans le milieu extracellulaire conduit à un arrondissement rapide des cellules (Figure 34). Dans ces mêmes conditions, le marquage de l'actine filamenteuse (actine-F) à l'aide de phalloïdine-Alexa 568 indique une relocalisation de cette actine-F dans la zone corticale de la cellule, où elle forme un réseau dense et plutôt homogène (Figure 37.A). Par ailleurs, en réponse au stress, l'actine est également phosphorylée de façon transitoire sur tyrosine, avec un pic de phosphorylation autour de 30 min, donc décalée dans le temps par rapport à la restructuration initiale du cytosquelette d'actine (Figure 37.B). Cette phosphorylation de l'actine est retrouvée en situation de carence (Howard et al., 1993; Jungbluth et al., 1995; Zischka et al., 1999). Les travaux de Liu et al. ont établi que cette phosphorylation portée par le résidu Y<sup>53</sup> n'affecte qu'une petite fraction de l'actine et conduit à une réduction conséquente de sa vitesse de polymérisation (Liu et al., 2006).

### 2.4. L'hyper-osmolarité conduit à l'activation du facteur de transcription STATc

Les groupes de J. Williams et de L. Eichinger ont montré que le stress hyper-osmotique conduit à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription STATc dans des cellules carencées mais également dans des cellules végétatives (parent Ax-2) (Araki et al., 2003; Na et al., 2007). Nous avons confirmé ce résultat grâce à l'utilisation d'anticorps anti-phospho-Tyr<sup>922</sup> (CP22) spécifiques de la forme phosphorylée de STATc et mis en évidence que cette réponse est transitoire, comme pour AdcA (Figure 38.A). En effet, pour un choc de 200 mM sorbitol, STATc est phosphorylée dans les premières minutes post-choc et est maintenue sous cette forme phosphorylée sur une période d'environ 120 min



**Figure 39 : Réponse cellulaire en conditions de stress hyper-osmotique.** Représentation schématique des réponses des cibles/acteurs de la réponse au stress hyper-osmotique sur cellules végétatives ainsi que l'évolution de l'activité endocytaire après un stress de 200 mM sorbitol obtenues au cours de ce travail (Figures 32, 39 et 43). Unités arbitraires.

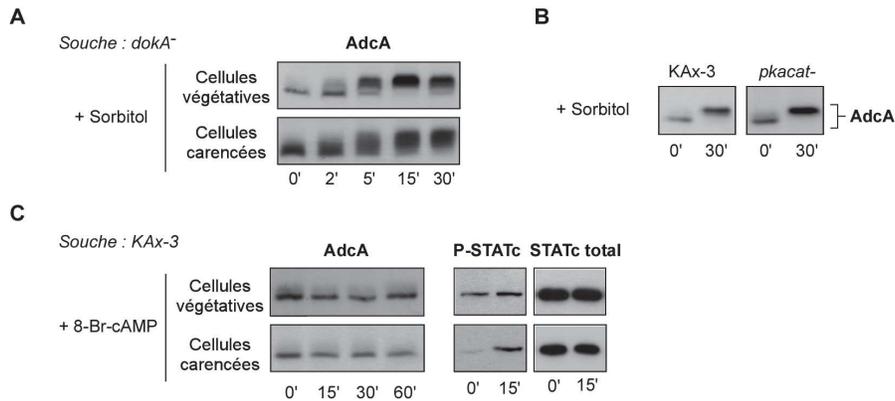
avant d'être déphosphorylée. Contrairement à AdcA, dont le pic de phosphorylation est détecté aux alentours de 30 min après le choc, la phosphorylation de STATc est déjà à son maximum entre 2-5 min post-choc. La phosphorylation de STATc conduit à sa translocation dans le noyau (Figure 38.B). Contrairement aux résultats publiés sur cellules carencées, un léger marquage nucléaire STATc-positif est systématiquement retrouvé dans les cellules végétatives non stressées, en accord avec la détection en Western blot d'une fraction de STATc sous une forme phosphorylée, suggérant un niveau basal d'activation de STATc dans les cellules végétatives, que l'on ne retrouve pas dans les cellules carencées.

Comme en cellules carencées, l'activation de STATc s'accompagne d'une inhibition, par phosphorylation, de sa phosphatase PTP3. Dans ces expériences, la construction  $_{myc}PTP3\Delta^{C649S}$  a été utilisée comme rapporteur du comportement de la protéine PTP3 entière (Gamper et al., 1996). L'application d'un stress de 200 mM sorbitol sur les cellules KAx-3 surexprimant  $_{myc}PTP3\Delta^{C649S}$  conduit à un changement de mobilité électrophorétique de la protéine qui correspond à un état phosphorylé de celle-ci (Figure 38.C). Cette cinétique de phosphorylation est très comparable à celle observée pour AdcA.

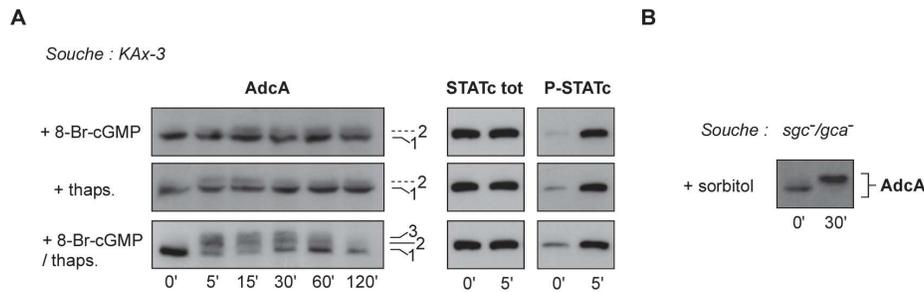
Les travaux sur cellules carencées confrontées à un stress hyper-osmotique de différentes équipes ont mis en évidence des changements majeurs dans la morphologie cellulaire qui se traduisent au niveau moléculaire par la phosphorylation de cibles diverses dont certaines sont des acteurs essentiels de la réponse au stress. Le suivi de certaines de ces cibles dans un contexte végétatif a permis de confirmer leur réponse dans ces conditions et d'établir que, comme pour la protéine AdcA, cette réponse est transitoire et le retour à un état non phosphorylé accompagne l'adaptation des cellules aux conditions de stress (Figure 39).

### III. RECHERCHE DES SIGNAUX ET VOIES DE SIGNALISATION CONTRÔLANT LA RÉPONSE D'ADCA

Les voies de signalisation qui sous-tendent la réponse macroscopique des cellules carencées au stress hyper-osmotique ont été étudiées de façon plus ou moins détaillée avec l'identification de différents acteurs protéiques (Figure 33). Même si leur rôle dans la réponse des cellules végétatives n'a pas été établi, les similarités dans le comportement cellulaire et dans la réponse de certains effecteurs intracellulaires, comme STATc, suggèrent l'implication d'au moins une partie d'entre eux. Leur contribution dans la réponse d'AdcA a donc été testée par l'utilisation de différents agents chimiques et/ou mutants pouvant mimer ou interférer avec des étapes de ces cascades de signalisation.



**Figure 40 : La phosphorylation d'AdcA n'est pas dépendante de la voie DokA/AMPC.**  
**A. La phosphorylation d'AdcA n'est pas sous le contrôle de l'histidine kinase DokA.** Des cellules *dokA*<sup>-</sup> carencées ou non pendant 4 h en tampon phosphate sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol. La phosphorylation d'AdcA est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25. **B. Une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC ne permet pas d'induire la phosphorylation d'AdcA.** Des cellules parentales KAx-3 sont traitées avec 20 mM de 8-Br-AMPC et la phosphorylation d'AdcA est contrôlée comme précédemment. La phosphorylation de STATc est vérifiée par Western blot en contrôle utilisant les anticorps anti-phospho-STATc (CP22) et anti-STATc total (7H3). **C. La suppression de l'activité catalytique de PKA n'affecte pas la phosphorylation d'AdcA.** La phosphorylation d'AdcA est suivie par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25, après 30 min de stress hyper-osmotique à 200 mM sorbitol dans la souche KAx-3 dépourvue de la sous-unité catalytique de PKA (*pkacat*<sup>-</sup>) et dans la souche parentale (KAx-3) utilisée en contrôle.



**Figure 41 : La réponse d'AdcA n'est pas strictement dépendante d'une voie GMPc- ou calcium-dépendante.**  
**A. La phosphorylation d'AdcA est induite par l'augmentation simultanée de GMPc et de Ca<sup>2+</sup>.** Des cellules parentales sont traitées avec 20 mM de 8-Br-GMPc et/ou 100 μM de thapsigargine. La phosphorylation d'AdcA et de STATc est suivie par Western blot à différents temps de cinétique, avec les anticorps anti-AdcA COB-25 et anti-phospho-STATc CP22, respectivement. La quantité totale de STATc est vérifiée à l'aide d'anticorps anti-STATc total (7H3). **B. La phosphorylation d'AdcA n'est pas affectée dans le double mutant *sgc*<sup>-</sup>/*gca*<sup>-</sup>.** Des cellules délétées pour les 2 guanylates cyclases de *Dictyostelium* (*sgc*<sup>-</sup>/*gca*<sup>-</sup>) sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol et la phosphorylation d'AdcA est contrôlée par Western blot en utilisant l'anticorps anti-AdcA COB-25.

## 1. La phosphorylation d'AdcA implique de nouvelles cascades de signalisation

### 1.1. La réponse d'AdcA n'est pas dépendante de la voie DokA-AMPC

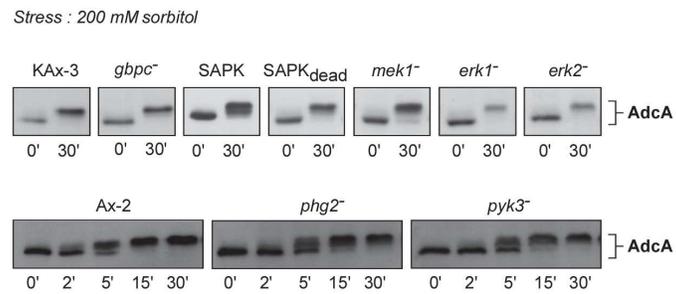
Pour tester l'implication de la voie DokA-AMPC, la phosphorylation d'AdcA a été suivie dans deux conditions expérimentales différentes : (1) suite à l'addition de sorbitol sur des cellules *dokA* nulles ou (2) suite à l'addition de l'analogue perméant de l'AMPC, le 8-Br-AMPC, en vue de mimer un pic d'AMPC, qui est la conséquence de l'activation de la voie DokA. Comme illustré figure 40.A, AdcA est toujours phosphorylée dans le mutant *dokA* nul. L'utilisation d'un mutant nul pour la sous-unité catalytique de PKA (*pkacar*), en aval de cette voie, donne des résultats similaires (Figure 40.B). En accord avec ces observations, l'addition de 8-Br-AMPC ne permet pas d'induire sa phosphorylation (Figure 40.C).

DokA étant très peu exprimée en phase végétative, les mêmes expériences ont donc été réalisées sur cellules carencées (4 h de jeûne) afin de se replacer dans les conditions qui ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie DokA dans la réponse au stress et où DokA est connue pour être active (Oehme and Schuster, 2001; Ott et al., 2000; Schuster et al., 1996; Thomason et al., 1999). Dans ces conditions de jeûne, AdcA répond de façon similaire dans une souche *dokA* nulle et dans la souche parentale (Figure 40.A). Le traitement au 8-Br-AMPC ne permet pas non plus sa phosphorylation (Figure 40.B). Dans ces expériences, l'activation de STATc a été utilisée comme contrôle positif. En effet, les travaux de l'équipe de J. Williams ont montré qu'une augmentation d'AMPC cytosolique, sur cellules carencées, est capable d'induire la phosphorylation partielle de ce facteur de transcription (Figure 40.B, (Araki et al., 2003). On peut toutefois noter que le 8-Br-AMPC est très peu efficace pour induire la phosphorylation de STATc sur cellules végétatives.

L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure que la voie DokA-AMPC ne semble pas être en amont de la phosphorylation d'AdcA et exclut la protéine PKA comme responsable de cette modification.

### 1.2. AdcA est partiellement phosphorylée par une augmentation concomitante de GMPc et de calcium

Chez *Dictyostelium*, la synthèse de GMPc est sous le contrôle de deux guanylates cyclases, une forme cytosolique sGC (soluble Guanylate Cyclase) et une forme membranaire GCA (Guanylate Cyclase A). L'utilisation du double mutant nul *sgc/gca* a permis de tester la contribution d'une voie GMPc-dépendante dans la réponse de AdcA. Parallèlement, le 8-Br-GMPc et la thapsigargine ont été utilisés pour mimer respectivement un pic de GMPc et une augmentation de la concentration cytosolique de calcium. Comme observé sur cellules carencées par le groupe de J. Williams, l'addition de 8-Br-GMPc ou l'augmentation de calcium conduit une activation de STATc dans nos conditions



**Figure 42 : Réponse d'AdcA dans différents contextes mutants pour des protéines kinases.** Des cellules délétées pour les kinases GbpC (*gbpC*<sup>-</sup>), MEK1 (*mek1*<sup>-</sup>), Erk1 (*erk1*<sup>-</sup>), Erk2 (*erk2*<sup>-</sup>), Phg2 (*phg2*<sup>-</sup>), Pyk3 (*pyk3*<sup>-</sup>) ou exprimant la SAPK (SAPK) ou la SAPK inactive (SAPK<sub>dead</sub>) sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol. La phosphorylation d'AdcA est vérifiée à différents temps de cinétique par Western blot avec l'anticorps anti-AdcA COB-25. La même expérience est réalisée sur les cellules parentales correspondantes (KAx-3 ou Ax-2).

végétatives, comparable à celle observée en choc sorbitol (Figures 41.A et 38). Par contre, elles ne permettent pas une phosphorylation efficace d'AdcA (seule la *bande 2* est visible), indiquant qu'aucune de ces deux voies (calcium et GMPc) n'est suffisante pour induire la réponse de la protéine (Figure 41.A). En revanche, l'ajout simultané de thapsigargine et de 8-Br-GMPc permet l'apparition de la *bande 3* d'AdcA. La réponse d'AdcA est partielle comparée au niveau de phosphorylation obtenu suite à l'ajout de sorbitol et il est possible que l'addition simultanée et les doses utilisées ne miment pas complètement les conditions de stress hyper-osmotique. Toutefois, dans un contexte attendu pour ne pas générer de pic de GMPc (mutant *sgc/gca*), l'addition de sorbitol conduit à la phosphorylation complète d'AdcA (Figure 41.B).

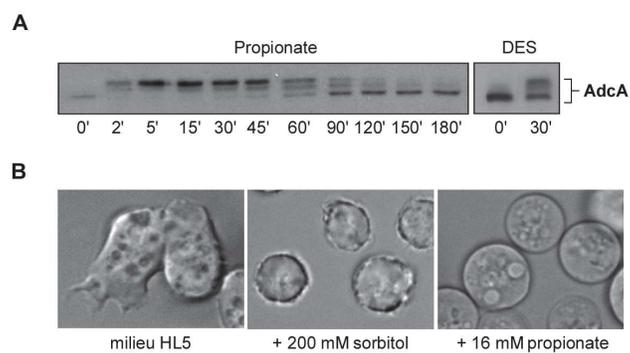
Malgré l'apparition d'une forme phosphorylée d'AdcA par des pics simultanés de GMPc et de calcium, ces résultats suggèrent l'existence de voie(s) de signalisation supplémentaire(s), à déterminer, et laisse envisager une situation complexe où la réponse d'AdcA pourrait résulter de l'activation concomitante de ces voies parallèlement aux voies calcium- et GMPc-dépendantes.

### 1.3. La phosphorylation d'AdcA n'est pas sous le contrôle des protéines *Erk1*, *Erk2*, *MEK1*, *SAPK*, *GbpC*, *Pyk3* ou *Phg2*

Au delà des cascades de signalisation mentionnées précédemment, plusieurs protéines kinases ont été décrites pour être activées ou modifiées en réponse au stress hyper-osmotique chez *Dictyostelium* comme la SAPK (*stress-activated protein kinase*), KrsA (*kinase responsive to stress A*), PKA (*protein kinase A*) ou encore la MAP kinase kinase MEK1 (Ma et al., 1997; Muramoto et al., 2007; Sun et al., 2003). Des souches mutantes pour certaines de ces protéines ont été utilisées pour tester leur contribution dans la réponse d'AdcA.

Nous avons précédemment exclu un rôle de la protéine kinase PKA, activée par la voie DokA-AMPC. En accord avec les résultats précédents, la phosphorylation d'AdcA n'est pas non plus affectée dans une souche dépourvue de GbpC (*gbp*), activée par la voie cGMP (Figure 42). Aussi, la surexpression de la SAPK et surtout celle d'une forme mutée dans le domaine catalytique (SAPK<sub>dead</sub>) conduisant à une version dominante-négative de la protéine ne modifient pas le profil, ni la cinétique de phosphorylation d'AdcA. Ces résultats nous indiquent donc que ni GbpC ni la SAPK ne sont essentielles pour permettre la réponse d'AdcA.

Chez la levure, la réponse au stress hyper-osmotique implique la voie de la MAPK HOG (*hyperosmotic glycerol*) qui permet de réguler la production d'osmolytes ainsi que l'expression de nombreux gènes de réponse au stress et permet de rétablir l'homéostasie du pH (Hohmann et al., 2007;



**Figure 43 : Une diminution du pH intracytosolique permet la phosphorylation d'AdcA. A. AdcA est phosphorylée suite à un traitement des cellules à l'acide propionique et au DES.** Des cellules KAx-3 sont traitées avec 16 mM de propionate ou 20  $\mu$ M de DES. A différents temps de cinétique, des échantillons protéiques sont préparées et analysées par Western blot avec un anticorps anti-AdcA COB-25. **B. La diminution du pH intracellulaire conduit à l'arrondissement des cellules.** Après étalement, des cellules parentales KAx-3 sont traitées ou non avec 16 mM de propionate et analysées par microscopie à contraste interférentiel au grossissement 63x. Des cellules traitées en sorbitol (200 mM) sont montrées à la même échelle pour comparaison.

Saito and Posas, 2012). Chez les mammifères, la voie des MAPK p38, homologue de HOG, est également activée en réponse au stress hyper-osmotique et permet notamment avec la participation de la voie des MAPK Jak (*Janus kinase*) d'activer le facteur de transcription STAT1 (Bode et al., 1999; Gatsios et al., 1998; Han et al., 1994). Chez l'amibe *Dictyostelium*, les acteurs des cascades des MAPKs ne sont pas connus dans leur intégralité. Jusque là, malgré la sensibilité de MEK1 à l'hyper-osmolarité, la participation de MAPKs comme acteur de la réponse au stress, suggérée par l'équipe d'Eichinger, n'a pas été établie mais pourrait également faire partie de la réponse au stress hyper-osmotique chez *Dictyostelium* (Na et al., 2007). La phosphorylation d'AdcA a donc été testée dans des mutants délétés pour *mek1* mais aussi pour l'une ou l'autre des deux MAPKs présentes chez l'amibe, *erk1* et *erk2*. Comme illustré figure 42, la phosphorylation d'AdcA n'est pas affectée dans une souche *mek1*, ni dans les souches *erk1* ou *erk2*. La souche double nulle *erk1/erk2* n'a pas pu être testée. Toutefois, dans l'hypothèse d'une redondance de fonction (qui n'est pas vraiment attendue du fait des rôles bien distincts attribués à chacune des protéines), il serait intéressant de contrôler le maintien de la phosphorylation d'AdcA en l'absence totale de MAPKs.

Enfin, des discussions informelles lors du meeting International *Dictyostelium* de 2012 à Madrid avec l'équipe de L. Eichinger nous ont amenées à tester l'implication éventuelle de 2 autres kinases dans cette réponse au stress d'AdcA, la sérine-thréonine kinase Phg2 et la tyrosine kinase Pyk3. Comme illustré figure 42, l'invalidation de *phg2* ou de *pyk3* n'affecte pas la phosphorylation d'AdcA, éliminant un rôle essentiel de ces protéines dans la réponse d'AdcA (Figure 42).

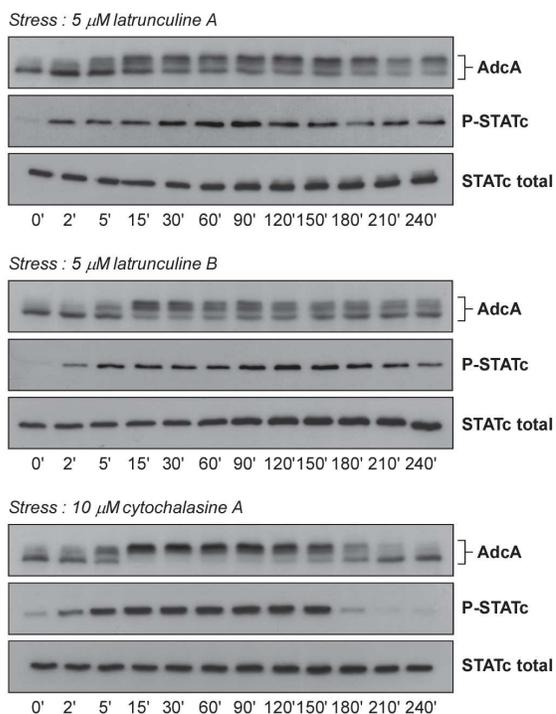
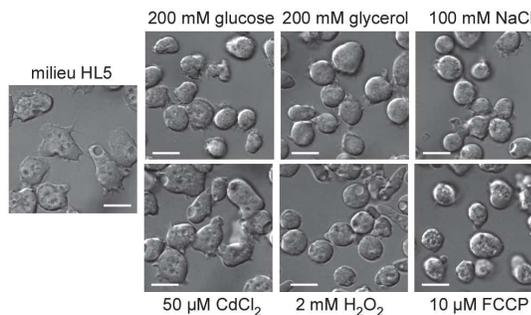
## 2. Une chute du pH cytosolique conduit à une phosphorylation rapide et massive d'AdcA

Dans l'objectif de poursuivre la caractérisation de la signalisation menant à la phosphorylation d'AdcA, nous nous sommes intéressés au rôle éventuel d'une variation du pH cytosolique. En effet, les travaux de Pintsch *et al.* ont mis en évidence que l'application d'un stress hyper-osmotique (300 - 400 mM sorbitol) sur des cellules carencées conduit à une chute du pH cytosolique (Pintsch et al., 2001). En cellules végétatives, nos tentatives de mesure du pH cytosolique à l'aide de la sonde fluorescence BCECF n'ont pas donné de résultats satisfaisants, possiblement du fait de l'auto-fluorescence des milieux de culture dans la gamme de longueurs d'onde utilisée pour suivre la fluorescence de la sonde. Des essais utilisant d'autres sondes de pH, comme la pHluorine, devraient permettre de tester l'existence d'une telle acidification du cytosol en conditions végétatives.

Afin de mimer une baisse de pH et de tester son impact sur AdcA, des cellules végétatives ont été traitées avec un acide faible, l'acide propionique (16 mM, pH 6,2) dont l'accumulation dans le cytosol conduit à son acidification. La figure 43.A nous indique que ce traitement conduit à la phosphorylation très efficace d'AdcA, avec la présence majoritaire de l'espèce *bande 3* d'AdcA dans les premières minutes post-traitement. L'acidification du cytosol par l'addition dans le milieu de diéthylstilbestrol

**Figure 44 : Les stress conduisant à la phosphorylation d'AdcA entraînent également un arrondissement cellulaire.**

Après étalement, des cellules parentales KAx-3 sont traitées ou non avec différents agents stressants dilués dans du milieu de culture HL5 : 200 mM glucose, 200 mM glycérol, 100 NaCl, 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  et 10  $\mu\text{M}$  FCCP. La morphologie cellulaire est observée par microscopie à contraste interférentiel au grossissement 63x, après 30 min de stress. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 45 : La dépolymérisation du cytosquelette d'actine conduit à la phosphorylation d'AdcA et de STATc.**

Des cellules parentales KAx-3 sont traitées avec 5  $\mu\text{M}$  de latrunculine A ou B ou 10  $\mu\text{M}$  de cytochalasine A et la phosphorylation d'AdcA et de STATc est suivie au cours du temps par Western blot avec les anticorps anti-AdcA COB-25 et anti-phospho-STATc CP22, respectivement. L'anticorps anti-STATc 7H3 est utilisé pour suivre la protéine STATc totale.

(DES), un inhibiteur de la H<sup>+</sup>-ATPase de la membrane plasmique confirme, malgré une efficacité moins importante, que la phosphorylation d'AdcA peut être induite par une chute du pH intracellulaire. De façon intéressante, nous avons pu observer que l'acide propionique conduit également à l'activation du facteur de transcription STATc (non montré). La variation du pH cytosolique pourrait donc être un événement très précoce de la réponse au stress, en cellules végétatives comme en cellules carencées, conduisant à l'activation des voies de signalisation contrôlant la phosphorylation de STATc et d'AdcA.

Chez *Dictyostelium*, les cibles exactes, senseurs de la variation du pH cytosolique ne sont pas connues. Toutefois, il est attendu que l'acidification du cytosol modifie la fonction d'un nombre important de protéines et active des voies de signalisation visant à restaurer l'homéostasie de pH. Chez les Mammifères, l'activité de diverses protéines de transport notamment de l'échangeur sodium-proton Nhe1 est régulée par le pH cytosolique (Robertson et al., 1997; Wakabayashi et al., 1997). C'est le cas également de protéines impliquées dans la dynamique des filaments d'actine comme la cofiline, la villine ou encore la taline (Damaghi et al., 2013; Frantz et al., 2008; Meng and McKnight, 2008; Schönichen et al., 2013; Srivastava et al., 2008). De façon intéressante, l'acide propionique conduit à un arrondissement rapide des cellules, comme en situation de stress hyper-osmotique, mais qui par contre, ne s'associe pas à une diminution apparente du volume cellulaire (Figure 43.B). Ces changements morphologiques pourraient être liés à un effet de l'acide propionique sur le fonctionnement de protéines du cytosquelette d'actine, comme décrits chez les Mammifères.

### 3. AdcA répond à un remaniement du réseau d'actine

En plus de l'acide propionique, l'ensemble des stress menant à la phosphorylation d'AdcA (oxydant, hyperthermique, chute d'ATP) conduisent à un arrondissement des cellules dans les premières minutes qui suivent l'application du stress (Figure 44). Cette observation nous a amenés à tester l'impact d'une déstabilisation forcée du cytosquelette d'actine sur la réponse d'AdcA.

Les cellules ont été traitées avec des agents dépolymérisants du cytosquelette d'actine, la cytochalasine A qui empêche la polymérisation de l'actine en se fixant sur l'extrémité (+) du filament d'actine et les latrunculines A et B qui séquestrent l'actine monomérique (Himes et al., 1976; Morton et al., 2000; Spector et al., 1983). Comme illustré sur la figure 45, la dépolymérisation du réseau d'actine par ces deux familles de drogues conduit à une phosphorylation d'AdcA, comparable à celle observée en stress hyper-osmotique. Cependant, les 2 traitements (10 µM cytochalasine vs 5 µM latrunculine) n'induisent pas une réponse similaire : la cytochalasine permet une phosphorylation totale et réversible d'AdcA, alors que les latrunculines A et B ne permettent qu'une phosphorylation partielle de la protéine sans retour à la situation d'origine. La cinétique de phosphorylation obtenue en



latrunculine est très similaire à celle obtenue en 400 mM sorbitol, une situation où les cellules sont très affectées, ce qui nous a amené à tester une gamme de concentration de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . L'utilisation de doses variables de latrunculine B ne modifie pas de façon notable la cinétique de phosphorylation d'AdcA. Par ailleurs, les cellules restent arrondies tant que la drogue est maintenue dans le milieu (non montré).

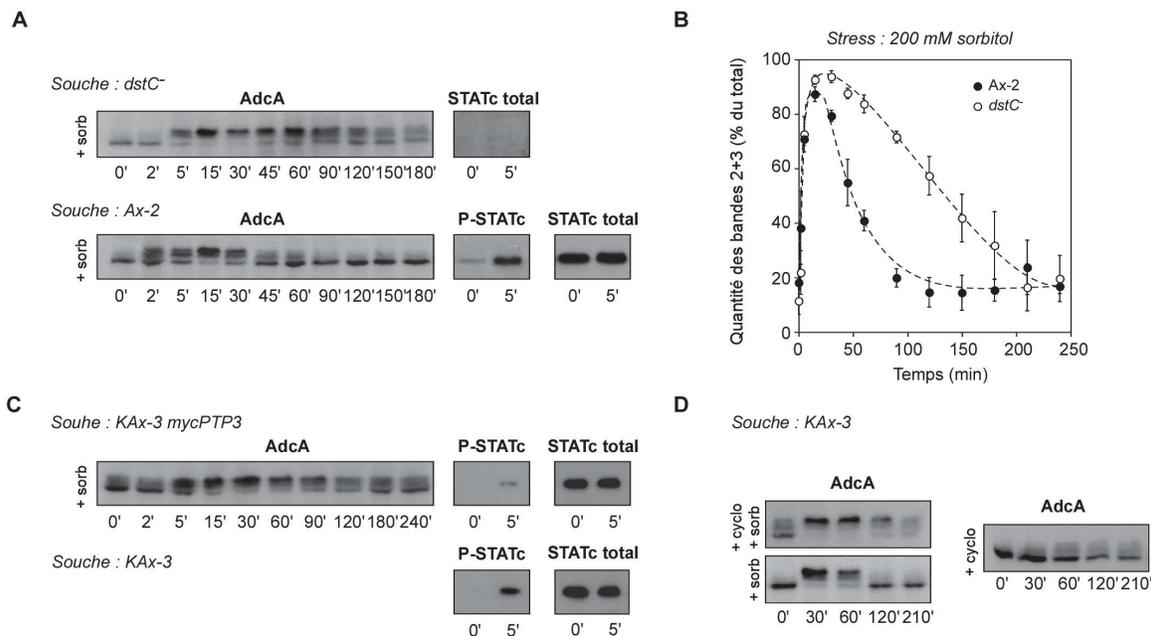
Dans le cas du traitement à la cytochalasine A, la forme *bande 3* d'AdcA est maintenue sur une durée plus longue que dans le cas d'un stress hyper-osmotique (Figures 45 et 28). Toutefois, cette réponse est transitoire et ceci, malgré la présence de cytochalasine dans le milieu. En accord avec ces observations, un traitement à la cytochalasine A conduit à un arrondissement des cellules qui transitoire. En effet, les cellules retrouvent progressivement un phénotype adhérent et motile, ce qui n'est pas observé pour les latrunculines. De même, alors que la cytochalasine A conduit à une inhibition totale et immédiate de la macropinocytose, une incubation prolongée s'accompagne d'une reprise de l'activité endocyttaire, confirmant le rétablissement d'un cytosquelette fonctionnel (non montré). *Dictyostelium* possède de nombreux transporteurs de type MDR (*multi drug resistance*). La prise en charge de la cytochalasine A (et non des latrunculines) par l'un d'entre eux pourrait expliquer l'effet transitoire de la drogue sur l'organisation du réseau d'actine. Aussi, des travaux anciens de Spector *et al.* ont montré le même phénomène, avec réversibilité des effets du même type de drogues, expliqué par une altération de la molécule par le milieu de culture utilisé, qui pourrait également être notre cas (Spector *et al.*, 1989).

La dépolymérisation de l'actine par l'une ou l'autre des drogues conduit également à la phosphorylation de STATc (Figure 45). Ces résultats ont été confirmés au cours de ma thèse par l'équipe de J. Williams (Araki and Williams, 2012). A nouveau, la déphosphorylation du facteur de transcription qui s'opère normalement dans les 120 min post-stress en situation de choc hyper-osmotique est quasi absente en latrunculine et décalée en cytochalasine A comme observée pour AdcA.

Ces résultats indiquent donc qu'une déstabilisation du réseau d'actine est suffisante pour déclencher la phosphorylation d'AdcA et de STATc et que la récupération d'un réseau fonctionnel s'accompagne de la déphosphorylation de ces deux protéines.

#### **4. La déphosphorylation d'AdcA implique le facteur de transcription STATc**

Les expériences précédentes ont permis d'établir que le facteur de transcription STATc est activé de façon systématique dans des conditions menant à la phosphorylation d'AdcA (acide propionique, cytochalasine, stress divers). Cette observation nous a donc amenés à tester la possibilité d'un rôle de cette protéine dans la réponse d'AdcA.



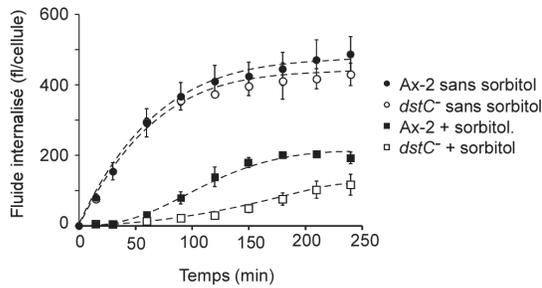
**Figure 46 : La déphosphorylation d'AdcA est partiellement dépendante du facteur de transcription STATc.**

**A. La réponse d'AdcA est affectée en l'absence de STATc.** Des cellules délétées du gène codant pour STATc (*dstC*) sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol. La cinétique de phosphorylation d'AdcA est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25. La même expérience est réalisée dans la souche parentale Ax-2 en contrôle. L'absence de STATc et son activation est vérifiée par Western blot à l'aide des anticorps anti-STATc total 7H3 et anti-phospho-STATc CP22. **B. Quantification de la réponse d'AdcA dans les souches Ax-2 et *dstC*<sup>-</sup>.** A partir de l'expérience précédente, la cinétique de phosphorylation/déphosphorylation d'AdcA a été représentée graphiquement. Les courbes représentent l'intensité du signal des bandes 2 et 3 d'AdcA analysée à partir du scan du film du Western blot à l'aide du logiciel ImageJ et exprimée en % de l'intensité de l'ensemble des bandes d'AdcA (1+2+3), en fonction du temps. Les courbes représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et la déviation standard est indiquée. **C. La réponse d'AdcA est modifiée dans une souche mutante pour PTP3.** Des cellules KAx-3 transformées avec la construction *myc*PTP3Δ<sup>C649S</sup> sont soumises à un choc de 200 mM sorbitol. La réponse d'AdcA est suivie par Western blot avec l'anticorps anti-AdcA COB-25. L'activation de STATc dans cette souche et dans la souche parentale contrôle (KAx-3) est analysée par Western blot à l'aide des anticorps anti-phospho-STATc CP22 et anti-STATc total 7H3. **D. La déphosphorylation d'AdcA est dépendante d'une néo-synthèse protéique.** Quinze minutes avant l'application d'un stress à 200 mM sorbitol, des cellules parentales KAx-3 sont traitées ou non avec 2 mM de cycloheximide. La cinétique de phosphorylation d'AdcA est suivie comme précédemment. Des cellules n'ayant reçue que la cycloheximide (2 mM) sont montrées en contrôle.

#### 4.1. L'invalidation de STATc affecte la déphosphorylation d'AdcA

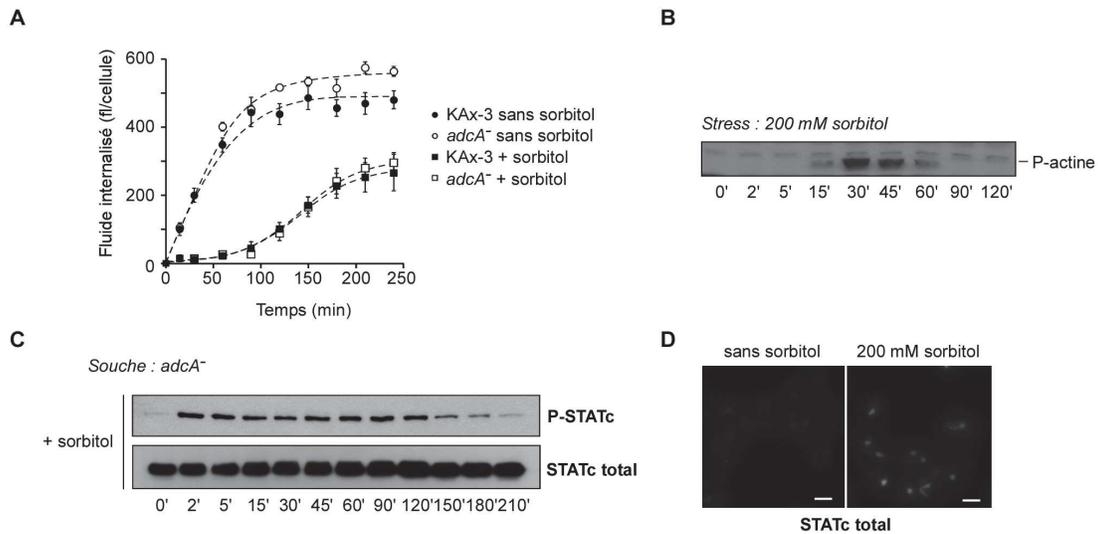
La phosphorylation d'AdcA a été suivie dans une souche dépourvue de STATc (*dstC*) en condition de choc de 200 mM sorbitol. Ce mutant ayant été construit dans la souche parentale Ax-2, les expériences ont été faites en utilisant ce parent comme contrôle. Dans ce contexte génétique, la réponse bi-phasique d'AdcA est retrouvée avec toutefois une cinétique de phosphorylation/déphosphorylation plus rapide que celle observée dans la souche KAx-3 (Figures 28 et 46.A et B). Dans le mutant *dstC* par contre, alors que la cinétique de phosphorylation d'AdcA est similaire à celle obtenue dans la souche Ax-2, sa cinétique de déphosphorylation est différente avec le maintien de la forme phosphorylée *bande 3* pendant au moins 120 min après l'application du stress. Des expériences utilisant la souche KAx-3 surexprimant PTP3, et présentant donc une réduction de la phosphorylation de STATc, conduisent à des résultats similaires, avec une déphosphorylation moins efficace d'AdcA (Figure 46.C). Ces résultats indiquent donc un rôle de STATc dans l'étape de déphosphorylation d'AdcA qui passe vraisemblablement par son activité transcriptionnelle étant donné l'effet de la surexpression de PTP3. Afin de consolider cette hypothèse, la réponse d'AdcA face à un choc sorbitol a été suivie en présence ou en l'absence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. L'addition de cycloheximide 15 min avant l'application du stress hyper-osmotique conduit à un délai dans la phase de déphosphorylation d'AdcA, en accord avec une hypothèse où la déphosphorylation de la protéine nécessiterait la néo-synthèse d'un effecteur spécifique (Figure 46.D). Cependant, il faut noter que la cycloheximide seule conduit au bout d'un certain temps à une phosphorylation d'AdcA, ce qui pourrait indiquer une mise en situation de stress pour les cellules du fait de la présence prolongée de l'inhibiteur. A ce stade, nous ne pouvons pas exclure que, dans cette situation, la persistance de l'état phosphorylé d'AdcA soit provoquée par le cumul de stress subi par la cellule. Toutefois, nous privilégions actuellement la piste d'un rôle du facteur de transcription STATc via la synthèse d'un régulateur de la réponse d'AdcA, du fait des résultats précédents.

De façon surprenante, dans une situation où STATc est constitutivement activé du fait de la surexpression d'un mutant dominant-négatif de PTP3, PTP3 $\Delta^{C649S}$ , la cinétique de phosphorylation d'AdcA n'est pas affectée alors qu'une déphosphorylation plus rapide ou un niveau de phosphorylation moindre de la protéine serait attendu du fait de la présence du régulateur permettant sa déphosphorylation au moment de l'application du stress (non montré). Ces observations, associées à l'effet partiel de la mutation *dstC*, suggèrent un mécanisme complexe de contrôle de l'activité du couple kinase/phosphatase qui gouverne l'état de phosphorylation d'AdcA, où STATc se positionnerait comme un acteur de la régulation, plutôt au niveau de la phosphatase d'AdcA.



**Figure 47 : La récupération de l'activité endocytaire en condition de stress hyper-osmotique est retardée en l'absence de STATc.**

Des cellules parentales Ax-2 et délétées du gène codant pour STATc (*dstC*<sup>-</sup>) sont soumises ou non à un stress de 200 mM sorbitol. Le FITC-dextran (1mg/ml) est ajouté simultanément et l'activité endocytaire des cellules est quantifiée par spectrofluorimètre ( $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}/\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ ). Les courbes représentent la quantité moyenne ( $\pm$  déviation standard) de fluide internalisé par cellule ( $n = 3$ ).



**Figure 48 : Analyse phénotypique du mutant *adcA*<sup>-</sup> en conditions de stress hyper-osmotique.**

**A. L'activité endocytaire n'est pas affectée dans une souche *adcA*<sup>-</sup>.** Des cellules parentales KAx-3 et délétées pour *adcA* (*adcA*<sup>-</sup>) sont soumises ou non à un stress de 200 mM sorbitol. L'activité endocytaire est quantifiée par mesure du FITC-dextran internalisé par spectrofluorométrie. La quantité moyenne de fluide internalisé par cellule est représentée sur les courbes ( $n = 3$ ) et la déviation standard est indiquée. **B. La cinétique de phosphorylation de l'actine est inchangée en l'absence d'AdcA.** Après stress des cellules *adcA*<sup>-</sup> avec une solution de 200 mM sorbitol, la phosphorylation de l'actine est suivie au cours d temps par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-phospho-tyrosine (PY20). **C-D. STATc est activée dans une souche *adcA*<sup>-</sup>.** Des cellules *adcA*<sup>-</sup> sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol. La phosphorylation de STATc est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-phospho-STATc CP22 (C). La quantité totale de STATc est contrôlée avec l'anticorps anti-STATc total 7H3. En D, la localisation de STATc est observée par immunofluorescence utilisant un anticorps anti-STATc total (grossissement 63x), dans des cellules délétées pour *adcA* après l'application ou non d'un stress hyper-osmotique à 200 mM sorbitol. Barre d'échelle = 5 $\mu$ m.

#### 4.2. L'invalidation de STATc retarde la récupération cellulaire

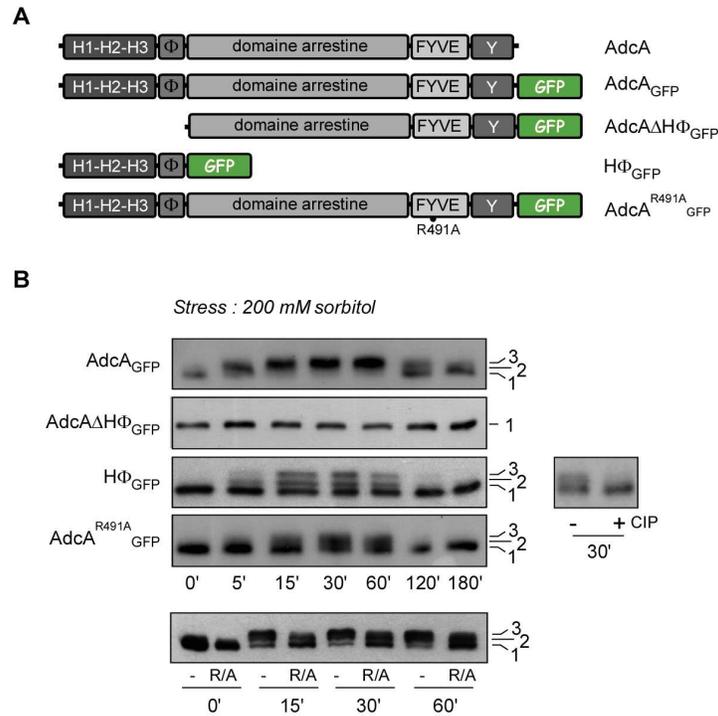
Nous avons vu précédemment que la cinétique de phosphorylation d'AdcA est corrélée avec la cinétique de récupération des cellules (Figure 36). Le maintien de la phosphorylation d'AdcA dans le contexte *dstC* nul nous a amené à tester l'impact de l'invalidation de ce facteur de transcription sur la récupération cellulaire. Comme illustré figure 47, les cellules *dstC* soumises à un choc de 200 mM sorbitol récupèrent plus lentement que les cellules parentales (Ax2). En effet, un volume internalisé supérieur à 30 fl/cellule n'est mesurée qu'à partir de 120 min environ dans les cellules mutantes contre 60 min pour les cellules parentales ( $29,2 \pm 5,7$  fl/cellule à  $t=120'$  pour *dstC* et  $31,2 \pm 6,5$  à  $t=60'$  pour Ax2). Jusque là, les travaux du groupe de J. Williams, pionnier dans l'étude des protéines STAT chez *Dictyostelium*, n'avait pas réussi à visualiser une sensibilité au stress accrue chez le mutant *dstC* nul, pourtant attendue du fait du nombre important de gènes régulés par STATc (Araki et al., 2003). Nos essais établissent que l'invalidation de *dstC* ralentit la vitesse de récupération cellulaire. Ce défaut pourrait ne pas affecter de façon détectable la capacité de repousse des cellules sur un tapis bactérien après un choc sorbitol de 2 h, conditions utilisées par l'équipe de J. Williams.

#### IV. QUEL RÔLE POUR ADCA DANS LA RÉPONSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE ?

Les travaux menés dans le paragraphe précédent ont montré que le cycle de phosphorylation-déphosphorylation d'AdcA s'étend sur la durée de la phase d'adaptation des cellules et que l'allongement de la durée de ce cycle, notamment du fait de l'invalidation de STATc qui ralentit l'étape de déphosphorylation, s'accompagne d'un délai dans la reprise d'activité endocytaire. Aux vues de ces observations, nous avons donc testé la possibilité d'un rôle d'AdcA dans l'adaptation des cellules face au stress hyper-osmotique.

##### 1. L'invalidation d'AdcA n'affecte pas la résistance au stress hyper-osmotique

Des expériences de survie ont tout d'abord été réalisées avec des cellules dépourvues d'AdcA (*adcA*<sup>-</sup>). Après un choc hyper-osmotique de 200 mOsm, les cellules ont été soit analysées sur un compteur de cellules afin de suivre le nombre de cellules au cours du temps, soit étalées sur un tapis bactérien pour estimer la mortalité induite éventuellement par stress. Dans les deux cas, les cellules *adcA*<sup>-</sup> ne présentent pas de défaut particulier par rapport à la souche parentale suggérant que la protéine n'est pas essentielle pour la protection des cellules contre le choc hyper-osmotique (non montré).



**Figure 49 : AdcA est phosphorylée sur son domaine N-terminal.**

**A. Schéma des constructions des différentes formes d'AdcA utilisées.** Les différentes constructions d'AdcA fusionnées à la GFP utilisées sont représentées : AdcA<sub>GFP</sub> (a.a. 1 à 580), AdcA-ΔHΦ<sub>GFP</sub> (a.a. 140 à 580), AdcA-HΦ<sub>GFP</sub> (a.a. 1 à 156) et AdcA<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub> (a.a. 1 à 580). **B. Mobilité électrophorétique des différents domaines d'AdcA en conditions de stress hyper-osmotique.** Des cellules KAx-3 transformées avec les différentes constructions sont soumises à un stress hyper-osmotique de 200 mM sorbitol. La mobilité électrophorétique de ces constructions est suivie au cours du temps par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Afin de mieux visualiser la migration électrophorétique de la construction AdcA<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub>, des échantillons protéiques de cellules stressées exprimant AdcA<sub>GFP</sub> non mutée (-) et mutée (R/A) sont déposés côte à côte sur un gel à 6% polyacrylamide (film du bas). Un échantillon protéique de cellules KAx-3 exprimant AdcA-HΦ<sub>GFP</sub> et stressées 30 min est traité (+) ou non (-) à la CIP. La perte de la modification de la mobilité électrophorétique est vérifiée par Western blot avec un anticorps anti-GFP.

Pour déceler un rôle d'AdcA qui serait plus subtil, l'activité endocytaire a été suivie au cours du temps, comme rapporteur de l'état des cellules. En l'absence de stress, les cellules *adcA* présentent une activité macropinocytaire comparable à celle des cellules parentales en milieu de culture, avec une vitesse d'internalisation et un volume internalisé maximal similaires (figure 48.A). L'absence d'AdcA n'affecte pas non plus la récupération cellulaire suite à l'application de 200 mM sorbitol puisque les deux souches présentent une reprise d'activité endocytaire à des temps similaires. En accord avec ce résultat, le suivi de la réponse cellulaire par spectrophotométrie ne montre pas d'anomalie particulière chez le mutant nul (non montré). Par ailleurs, ni la cinétique de phosphorylation de l'actine, ni la phosphorylation et la translocation nucléaire de STATc ne sont affectées dans une souche *adcA* (Figure 48.B, C et D).

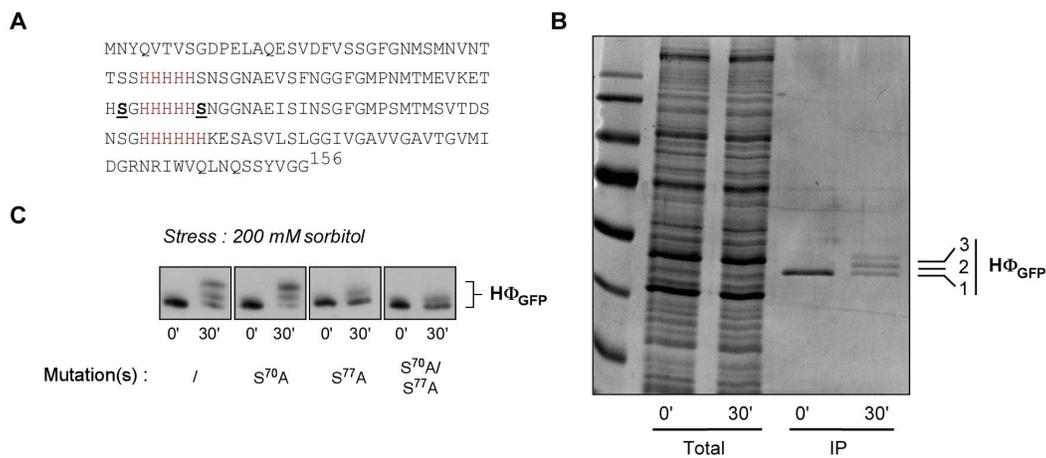
L'absence d'AdcA ne semble donc pas avoir d'impact majeur sur la résistance des cellules face au stress. L'hypothèse la plus immédiate est de proposer qu'AdcA ne joue pas un rôle essentiel dans cette résistance. Néanmoins, AdcA est modifiée en réponse au stress de façon massive et il est possible que l'une des deux formes d'AdcA (phosphorylée ou non-phosphorylée) soit néanmoins nécessaire pour une réponse optimale des cellules.

Pour pouvoir tester cette hypothèse, par l'expression de mutants de phosphorylation d'AdcA, nous avons entrepris d'identifier les sites de phosphorylation de la protéine. Une stratégie d'analyse de la protéine par spectrométrie de masse a été privilégiée.

## 2. Recherche des sites de phosphorylation d'AdcA

### 2.1. AdcA est phosphorylée sur son domaine N-terminal

Pour simplifier l'analyse par spectrométrie de masse, nous avons cherché à délimiter le(s) domaine(s) de la protéine modifié(s) par phosphorylation. Des formes tronquées d'AdcA fusionnées avec la GFP ont été utilisées et testées pour leur capacité à répondre au choc hyper-osmotique : le domaine N-terminal de la protéine (AdcA-H $\phi$ <sub>GFP</sub>) et le domaine complémentaire correspondant à AdcA délétée du domaine H $\phi$  (AdcA- $\Delta$ H $\phi$ <sub>GFP</sub>) (Figure 49.A). La protéine entière AdcA<sub>GFP</sub> a été utilisée comme contrôle. Les cellules KAx-3 exprimant ces constructions ont été traitées par l'addition de 200 mM sorbitol et la phosphorylation des protéines tronquées a été suivie par Western blot. Comme illustré figure 49, l'ajout de sorbitol conduit à une modification du profil de migration électrophorétique de AdcA-H $\phi$ <sub>GFP</sub> (passage de *bande 1* à *bandes 1+2+3*) qui rappelle celui d'AdcA ou AdcA<sub>GFP</sub> alors que la protéine AdcA- $\Delta$ H $\phi$ <sub>GFP</sub> n'est pas affectée. Ces modifications correspondent à des états phosphorylés du domaine puisqu'elles sont perdues lorsque les échantillons sont traités à la CIP. Les résultats indiquent donc que le domaine H $\phi$  contient au moins une partie des sites phosphorylés



**Figure 50 : AdcA est phosphorylée sur plusieurs sérines.**

**A. Séquence protéique du domaine N-terminal d'AdcA.** La séquence protéique du domaine H $\Phi_{GFP}$  d'AdcA (a.a. 1 à 156) est présentée. Les *clusters* d'histidines sont indiquées en rouge et les sérines phosphorylées identifiées en gras souligné (S<sup>70</sup> et S<sup>77</sup>). **B. Migration sur gel de H $\Phi_{GFP}$  en condition de stress hyper-osmotique.** Des cellules parentales exprimant la GFP seule ou AdcA-H $\Phi_{GFP}$  sont soumises à un stress hyper-osmotique. Après 30 min de choc, les protéines GFP et AdcA-H $\Phi_{GFP}$  ont été purifiées à l'aide du kit GFP-Trap et analysées par coloration au bleu de Coomassie. **C. Les mutations S<sup>70</sup>A et S<sup>77</sup>A conduisent à une perte de la modification de mobilité électrophorétique de H $\Phi_{GFP}$ .** Des cellules KAx-3 exprimant H $\Phi_{GFP}$  (/) H $\Phi_{GFP}^{S70A}$  (S<sup>70</sup>A), H $\Phi_{GFP}^{S77A}$  (S<sup>77</sup>A) et H $\Phi_{GFP}^{S70A/S77A}$  (S<sup>70</sup>A/S<sup>77</sup>A) sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol pendant 30 min. La mobilité électrophorétique des différentes constructions est suivie par Western blot avec un anticorps anti-GFP avant (0') et après (30') l'application du stress.

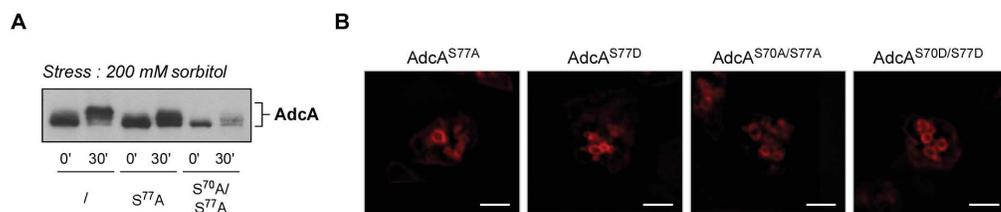
portés par AdcA en situation de stress. Ceci n'exclut pas la possibilité de sites supplémentaires sur le reste de la protéine dont la phosphorylation ne s'accompagnerait pas de différence de mobilité électrophorétique.

Les travaux de Dorian Guetta ont montré qu'AdcA est capable d'oligomériser à travers le domaine H $\phi$ . Pour exclure une contribution éventuelle de la protéine endogène dans la phosphorylation du domaine H $\phi$ , les mêmes expériences ont été réalisées dans le contexte *adcA* nul (non montré). Des résultats identiques ont été obtenus indiquant que le domaine H $\phi$  d'AdcA porte non seulement les sites de phosphorylation stress-dépendants mais également les sites de recrutement de la kinase et de la phosphatase contrôlant l'état de phosphorylation de ces sites.

De façon notable, le domaine H $\phi$  n'est pas phosphorylé de façon aussi efficace que la protéine entière avec le maintien d'une forme *bande 1* sur toute la durée de la réponse. Alors que la protéine AdcA se localise sur les compartiments endocytaires grâce à son domaine FYVE de liaison au PI(3)P, le domaine H $\phi$  est exclusivement cytosolique (Guetta et al., 2010). Nous avons donc cherché à savoir si cette différence de localisation subcellulaire pouvait expliquer la différence d'efficacité de phosphorylation. Afin de répondre à cette question, la construction AdcA<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub>, permettant l'expression d'une protéine entière mais ayant perdu sa localisation endocytairienne du fait de la mutation de l'arginine R<sup>491</sup> essentielle à l'interaction avec le PI(3)P, a été utilisée. Comme le domaine H $\phi$ <sub>GFP</sub>, AdcA<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub> est retrouvée dans le cytosol (Guetta et al., 2010). En condition de choc hyper-osmotique, la protéine est également phosphorylée avec une modification visible de mobilité électrophorétique indiquant que la présence de la protéine sur la voie endocytairienne n'est pas essentielle à sa phosphorylation (Figure 49.B). Cependant, et comme observé pour le domaine H $\phi$ , une fraction de la protéine semble échapper à la phosphorylation, suggérant que la localisation endocytairienne pourrait en revanche faciliter le processus de phosphorylation.

## 2.2. Recherche des sites de phosphorylation par spectrométrie de masse

Nous avons vu précédemment qu'AdcA serait préférentiellement phosphorylée sur des résidus sérines et/ou thréonines. Le domaine H $\phi$  présente 8 thréonines et 23 sérines (Figure 50.A). Afin d'identifier les sites phosphorylés en réponse au stress, les cellules *adcA* nulles surexprimant H $\phi$ <sub>GFP</sub> ont été soumises à un choc hyper-osmotique de 200 mM sorbitol et la protéine a été immunoprécipitée grâce au kit GFP-Trap<sup>®</sup> de ChromoTek avant ou 30 min après application du stress (Figure 50.B). Les différentes formes de H $\phi$  ont été séparées sur gel de polyacrylamide et soumises à une digestion à la chymotrypsine et les peptides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse MS/MS. La chymotrypsine a été préférée à la trypsine du fait du nombre très réduit de résidus K et R dans le domaine H $\phi$  qui n'aurait pas permis de générer des fragments peptidiques dans une gamme de masses



**Figure 51 : Localisation subcellulaire des mutants d'*adcA*.**

**A. Migration électrophorétique des mutants  $AdcA^{S77A}$  et  $AdcA^{S70A/S77A}$  d'*AdcA*.** Des cellules KAX-3 exprimant les différentes formes mutées d'*AdcA* ( $AdcA^{S77A}$  et  $AdcA^{S70A/S77A}$ ) sont traitées avec 200 mM sorbitol pendant 30 min. La mobilité électrophorétique de ces différentes constructions est analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-*AdcA* COB-25. **B. Localisation des mutants  $AdcA^{S77A}$ ,  $AdcA^{S70D/S77D}$ ,  $AdcA^{S77D}$  et  $AdcA^{S70A/S77A}$ .** La localisation des formes mutées d'*AdcA* est observée par microscopie au grossissement 63x, après fixation et marquage des cellules avec l'anticorps anti-*AdcA* COB-25. Les images correspondent à une section optique après déconvolution. Échelle = 5  $\mu$ m.

Souches	Phase d'adapt./récup. (min)	Diminution du diamètre (%)
<i>adcA</i> OE <i>AdcA</i>	155,3 $\pm$ 16,4	10,1 $\pm$ 1,3
<i>adcA</i> OE <i>AdcA</i> <sup>S70A/S77A</sup>	161 $\pm$ 32,7	10,4 $\pm$ 1,4
<i>adcA</i> OE <i>AdcA</i> <sup>S70D/S77D</sup>	174,7 $\pm$ 35,3	9,9 $\pm$ 0,2

**Tableau 3 : Analyse phénotypique des mutants d'*adcA*.**

L'évolution de la  $DO_{450nm}$  de la suspension et du diamètre cellulaire de cellules *adcA* surexprimant *AdcA* (OE *AdcA*),  $AdcA^{S70A/S77A}$  (OE  $AdcA^{S70A/S77A}$ ) ou  $AdcA^{S70D/S77D}$  (OE  $AdcA^{S70D/S77D}$ ) soumises à un stress de 200 mM sorbitol est suivie au cours du temps. Les données représentant la durée de la phase de récupération (min) et la variation du diamètre des cellules (en % du diamètre initial) sont une moyenne de 3 expériences indépendantes et la déviation standard est indiquée.

compatible avec l'analyse. A l'exception de la région <sup>106</sup>HHHHHKESASVNL, la totalité de la protéine a été couverte par l'analyse et deux sérines ont été identifiées comme possiblement phosphorylées, les sérines S<sup>70</sup> et S<sup>77</sup>. Il est tout à fait possible néanmoins que d'autres résidus de la protéine soient également modifiés mais n'aient pas pu être identifiés au cours de nos analyses.

Afin de valider ce résultat, les sérines S<sup>70</sup> et S<sup>77</sup> ont été mutées en alanine dans le domaine H $\phi$  et l'impact des mutations sur le profil de migration électrophorétique des protéines mutées a été suivi en conditions de stress. La double mutation S<sup>70</sup>A/S<sup>77</sup>A conduit à une modification de la migration du domaine H $\phi$ <sub>GFP</sub> en réponse à 200 mM sorbitol avec absence totale de l'espèce *bande 3*, impliquant au moins l'un de ces résidus dans la réponse de la protéine (Figure 50.C). L'élaboration de mutants simples H $\phi$ <sup>S70A</sup><sub>GFP</sub> et H $\phi$ <sup>S77A</sup><sub>GFP</sub> a permis d'exclure une contribution de la sérine S<sup>70</sup> dans le retard de migration puisque le profil de H $\phi$ <sup>S70A</sup><sub>GFP</sub> est inchangé et de proposer que l'apparition de l'espèce *bande 3* de H $\phi$ <sub>GFP</sub> et vraisemblablement de AdcA résulte d'une phosphorylation de la protéine sur la sérine S<sup>77</sup>. Dans tous les cas, la forme *bande 2* est maintenue, suggérant l'existence *a minima* d'un autre acide aminé phosphorylé qui n'a pas été mis en évidence par la spectrométrie de masse.

### 3. Étude préliminaire de l'effet de mutants de phosphorylation d'AdcA

Afin d'étudier le rôle possible de la phosphorylation d'AdcA dans la réponse au stress, des formes mutantes de la protéine entières ont été générées et introduites dans la souche *adcA* nulle ou dans la souche parentale KAx-3. L'introduction d'une alanine à la place de la sérine S<sup>77</sup> a été utilisée pour obtenir une forme non-phosphorylable d'AdcA et l'introduction d'un acide aspartique pour mimer une forme constitutivement phosphorylée. La sérine S<sup>70</sup>, ayant été identifiée comme phosphorylée en spectrométrie de masse, a également été l'objet de mutations dans la mesure où sa phosphorylation pourrait ne pas engendrer de modification de migration mais pour autant être nécessaire dans le fonctionnement d'AdcA. Sur cette base, 4 mutants ont été générés : AdcA<sup>S77A</sup>, AdcA<sup>S70A/S77A</sup>, AdcA<sup>S77D</sup> et AdcA<sup>S70D/S77D</sup>. Conformément aux résultats obtenus sur le domaine H $\phi$  isolé, la mutation S<sup>77</sup>A empêche l'apparition de la forme *bande 3* d'AdcA (simple et double mutants) (Figure 51.A).

Des expériences préliminaires ont ensuite été menées pour permettre une première évaluation de l'effet de ces mutations sur le comportement cellulaire. La réponse au stress de la souche surexprimant les mutants de phosphorylation d'AdcA, AdcA<sup>S70A/S77A</sup>, AdcA<sup>S70D/S77D</sup> a été suivie par mesure de la DO<sub>450nm</sub>, suite à l'application d'un choc hyper-osmotique de 200 mOsm. L'introduction des mutations S<sup>70</sup>A/S<sup>77</sup>A ou S<sup>70</sup>D/S<sup>77</sup>D ne modifie pas la réponse immédiate d'arrondissement des cellules ni la cinétique de récupération (Tableau 3). Par ailleurs, quelle que soit la forme de la protéine (AdcA<sup>S77A</sup>,



AdcA<sup>S70A/S77A</sup>, AdcA<sup>S77D</sup>, AdcA<sup>S70D/S77D</sup>), AdcA reste associée à la voie endocytaire indiquant que la modification des résidus S<sup>70</sup> et S<sup>77</sup> n'altère pas le ciblage endocytaire de la protéine (Figure 51.B).

En dépit de ces premiers résultats, une étude phénotypique plus poussée des cellules surexprimant des formes mutées d'AdcA est nécessaire pour conclure de façon plus définitive sur le rôle ou l'absence de rôle de la phosphorylation d'AdcA sur ces résidus dans la réponse au stress.

## V. DISCUSSION

L'amibe *Dictyostelium* possède un répertoire de 6 arrestines non conventionnelles (AdcA-F) dont le rôle fonctionnel n'a pas encore été caractérisé. Pourtant, l'étude de ces protéines chez un organisme ayant divergé précocement dans l'évolution pourrait permettre de définir un cœur de fonctions et de régulations ancestrales partagé par les différents membres de la famille arrestine, des organismes unicellulaires aux organismes plus complexes, chez lesquels le panel d'arrestines s'est complexifié, et les spécificités éventuellement apportées par les domaines supplémentaires.

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai pu établir que la protéine amibienne AdcA répond par phosphorylation à des stress de natures diverses, comme des stress hyper-osmotique, thermique ou oxydant. Chez d'autres organismes comme la levure *S. cerevisiae* ou le champignon filamenteux *A. nidulans*, des modifications du milieu environnant font partie des signaux activateurs des arrestines (Gomez-Raja and Davis, 2012; Herrador et al., 2010; Herranz et al., 2005; Hervás-Aguilar et al., 2007). Dans son habitat naturel à savoir les sols en décomposition des forêts tempérés, l'amibe *Dictyostelium* est confrontée en permanence à des modifications de l'environnement et sa survie est donc très dépendante de sa capacité de réponse et d'adaptation à ces changements extracellulaires.

Afin de comprendre le rôle de la phosphorylation d'AdcA et d'étudier plus précisément cette réponse, le choc hyper-osmotique a été choisi comme générateur de stress du fait d'une littérature disponible sur ce sujet chez cet organisme. Cependant, la majorité des études ont été réalisées sur des cellules carencées, donc engagées dans les premières étapes du programme de développement multicellulaire. Ces conditions n'étant pas compatibles avec l'expression temporelle d'AdcA, ce travail a nécessité au préalable la caractérisation de la réponse des cellules végétatives, non carencées.



## 1. Adaptation des cellules végétatives au stress hyper-osmotique

Ce travail de caractérisation sur cellules végétatives a permis d'établir que, face à un choc hyper-osmotique modéré, les cellules mettent en place une réponse permettant leur adaptation aux conditions de stress.

De façon générale, un stress hyper-osmotique conduit à une perte importante d'eau en raison de la différence d'osmolarité entre le milieu intracellulaire et le milieu extérieur, provoquant une forte augmentation de l'osmolarité intracellulaire. Chez *Dictyostelium*, cette perte d'eau s'accompagne d'un arrondissement des cellules et d'un remaniement massif du cytosquelette d'acto-myosine qui se relocalise dans la région corticale, permettant de lutter contre cette pression osmotique et un écrasement excessif de la cellule. Divers travaux ont montré que certaines protéines comme l'hisactophiline, la cofiline, l' $\alpha$ -actinine, les protéines LIM C et D, la SAPK ou encore VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) se relocalisent dans la région sous-corticale de la cellule en réponse au stress hyper-osmotique (Aizawa et al., 1999; Khurana et al., 2002; Pintsch et al., 2002; Rivero et al., 1996; Sun et al., 2003). Des mutants nuls pour l'hisactophiline, la SAPK ou LIM C et LIM D présentent une sensibilité accrue au stress hyper-osmotique, révélant l'importance de ce renforcement sous-cortical (Khurana et al., 2002; Pintsch et al., 2002; Sun et al., 2003).

Cependant, après une période d'inactivité apparente à l'échelle macroscopique, nous avons pu montrer que les cellules récupèrent progressivement une morphologie normale, étalée et adhérente sur substrat solide, et restaurent leur capacité de motilité et d'endocytose. La reprise de la croissance cellulaire témoigne du rétablissement de conditions autorisant les fonctions vitales de la cellule. Cette réponse au stress s'accompagne également d'une activation d'acteurs clé comme le facteur de transcription STATc et la récupération des cellules corrèle avec le retour de son activité à un niveau basal (Figure 39). Les travaux de Na *et al.* sur cellules végétatives ont établi que le stress hyper-osmotique conduit à la régulation de plus de 800 gènes, dont 20 % sont sous le contrôle de STATc (Na et al., 2007). Certains gènes impliqués dans des fonctions cellulaires non essentielles pour la réponse au stress telles que l'endocytose, le chimiotactisme, la cytokinèse ou encore certaines machineries métaboliques comme la respiration vont être réprimés. Parallèlement, des gènes codant pour des transporteurs membranaires ou des protéines liées à la polymérisation/dépolymérisation de l'actine, le catabolisme de macromolécules ou la réponse au stress oxydant sont activés (Na et al., 2007). L'activation de voies métaboliques conduisant à l'accumulation d'osmolytes comme l'urée, le tréhalose ou certains acides aminés (glycine, la proline ou encore le glutamate) pourrait contribuer au rétablissement du volume cellulaire par recapture d'eau. La plupart des gènes régulés suite au choc hyper-osmotique présentent un pic d'induction ou de répression de leur expression entre 15 et 90 min post-choc. Sur cette même période, la protéine AdcA subit également une phosphorylation massive et



transitoire, indiquant une corrélation entre l'état de phosphorylation d'AdcA et l'état physiologique des cellules. En cellules carencées, la réponse d'AdcA est partielle et perdue. Dans ces mêmes conditions, STATc est maintenue activée, suggérant l'absence de certains régulateurs ou/et un état métabolique moins favorable à la récupération cellulaire.

Les mécanismes mis en jeu dans l'adaptation des cellules végétatives au stress hyper-osmotique n'ont pas été étudiés dans le détail. En cellules carencées, la réponse au stress hyper-osmotique met en jeu des cascades de signalisation multiples, GMPc-, AMPc- ou encore Ca<sup>2+</sup>-dépendante, qui sont interconnectées conduisant au remaniement du cytosquelette d'actine et à la mise en place de la réponse transcriptionnelle via notamment l'activation de STATc. La réponse de STATc et de sa phosphatase PTP3 obtenue en phase végétative suggère *a minima* l'existence des voies GMPc- et Ca<sup>2+</sup>-dépendantes.

## 2. Du signal extracellulaire à la phosphorylation d'AdcA : quels acteurs dans la cascade de signalisation ?

Un effort important a été accompli durant ce travail afin de déterminer la ou les voies de signalisation en amont de la phosphorylation d'AdcA. Les voies GMPc-, AMPc- ou encore Ca<sup>2+</sup>-dépendantes ont été testées et nos résultats ont permis d'écarter une contribution unique de l'une de ces voies permettant la phosphorylation d'AdcA. Bien que le calcium et le GMPc semblent réguler la réponse de la protéine, ils ne suffisent pas à induire une réponse totale suggérant la participation d'une voie de régulation supplémentaire qui pourrait être spécifique de la phase végétative, étant donnée une réponse d'AdcA beaucoup plus efficace dans cette phase qu'en cellules carencées.

L'identification de la kinase responsable de la phosphorylation d'AdcA pourrait ouvrir de nouvelles pistes pour poursuivre la caractérisation de ces voies de signalisation. Nos travaux ont déjà permis d'exclure un rôle direct ou indirect de plusieurs candidats déjà connus comme cible ou acteur de la réponse au stress hyper-osmotique dont la protéine kinase PKA, la MAPKK MEK1 ou encore la kinase de type ROCO, GbpC, impliquée dans l'activation de STATc. Le génome de *Dictyostelium* code pour ~ 250 protéines de type kinases dont 155 sont attendues pour être des S/T kinases (Goldberg et al., 2006), et nous ne disposons pas des outils nécessaires pour envisager leur étude systématique. L'identification d'une partie des résidus phosphorylés en revanche nous amène à proposer de nouveaux candidats. En effet, la sérine S<sup>77</sup>, identifiée par spectrométrie de masse, est située dans le peptide <sup>67</sup>ETHSGHHHHHSNGGNAEI. Cette séquence ne correspond à aucun site consensus de phosphorylation par des kinases connues à l'exception peut-être des kinases de la famille NDR/LATS (*Nuclear Dbf-related/large tumor suppressor*). En effet, les kinases LATS1/2 sont des sérine-thréonine kinases du groupe des kinases AGC qui phosphorylent de façon préférentielle des motifs de



type Hx[RK]xx[ST] avec une histidine en position -5 du résidu S/T. Les acides aminés chargés en amont du résidu phosphorylé viennent s'insérer dans une poche chargée négativement dans le site catalytique de la kinase. Sous une forme protonée, en condition acide, les histidines du site HHHHHS pourraient mimer une situation proche de celle générée avec le motif canonique. De façon intéressante, les travaux de Pintsch *et al.* ont mis en évidence une diminution du pH en réponse au stress hyper-osmotique, au moins sur cellules carencées et nos travaux ont montré que l'acidification du cytosol induit la phosphorylation d'AdcA, confortant cette piste de recherche (Pintsch *et al.*, 2001).

Le génome de *Dictyostelium* code pour 4 protéines de la famille NDR/LATS (Goldberg *et al.*, 2006). Les mutants invalidés pour 3 d'entre elles sont disponibles dans la communauté *Dictyostelium* et pourront être testés pour leur rôle éventuel dans la phosphorylation d'AdcA. De plus les travaux récents de Müller-Taubenberger *et al.* ont montré que certaines de ces NDR/LATS sont capables d'interagir avec des GTPase de la famille des Ras, impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, notamment pour la motilité cellulaire et le chimiotactisme (Kortholt *et al.*, 2013; Müller-Taubenberger *et al.*, 2014; Sasaki *et al.*, 2007). La protéine AdcA est multi-phosphorylée en réponse à une grande diversité de stress. Nous ne savons pas à ce stade si une ou un ensemble de kinases assurent cette phosphorylation indépendamment du signal de stress initial. Les voies de signalisation déclenchées par les différents stress pourraient rapidement converger vers un intermédiaire commun régulant la phosphorylation d'AdcA. L'ensemble des stress identifiés comme inducteurs de la phosphorylation d'AdcA conduisent à un remaniement évident du réseau d'actine avec une perte d'adhésion et un arrondissement des cellules, positionnant le cytosquelette d'actine comme un élément de convergence possible d'autant que la déstabilisation du cytosquelette par des agents dépolymérisants suffit également à activer la phosphorylation de la protéine. Les travaux menés sur *Dictyostelium* en situation de carence ont permis d'établir que l'application d'un stress hyper-osmotique conduit à l'activation de la guanylate cyclase sGC via une voie Rap1-dépendante (Kang *et al.*, 2002). Rap1 et l'augmentation du cGMP cytosolique affectent directement l'organisation du réseau d'actine en modulant la polymérisation des filaments d'actine et l'activité de la myosine II (Kang *et al.*, 2002; Kuwayama *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'acidification du cytosol déclenchée par le choc ou par l'addition d'un acide faible dans le milieu extracellulaire est également attendue pour moduler l'assemblage des filaments d'actine en régulant certaines protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette (Jenkins *et al.*, 2014; Lagarrigue *et al.*, 2003; Suzuki and Namiki, 2007). De même, des études chez la levure ont montré que la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), induite par un stress oxydant, conduit également à la restructuration du cytosquelette d'actine (Pujol-Carrion *et al.*, 2013). Ces données nous amène à proposer un rôle du cytosquelette d'actine (ou de protéines associées), qui serait impliqué précocement dans la réponse au stress hyper-osmotique et aux autres stress inducteurs de la réponse d'AdcA, dans l'activation de la (des) voie(s) responsable(s) de la phosphorylation d'AdcA et qui pourrait faire intervenir des kinases de type NDR/LATS.



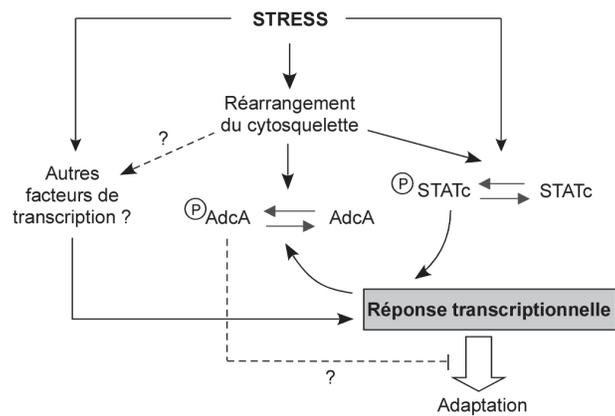
### 3. La déphosphorylation d'AdcA : quel rôle pour le facteur de transcription STATc ?

L'état de phosphorylation d'une protéine résulte souvent d'un équilibre régulé entre l'activité de la kinase contrôlant sa phosphorylation et celle de la phosphatase responsable de sa déphosphorylation. Nous avons pu mettre en évidence que l'absence de STATc conduit à une récupération cellulaire plus lente et à une phosphorylation prolongée d'AdcA. L'effet de la mutation *dstC* nulle sur la phosphorylation d'AdcA pourrait résulter d'un rôle direct de STATc dans l'expression génique de la phosphatase d'AdcA. Le décalage entre la déphosphorylation d'AdcA et le pic d'activation de STATc (> 30 min) pourrait tout à fait accommoder la néo-synthèse de gènes sous la dépendance de STATc (Na et al., 2007). Parmi les gènes induits par l'hyper-osmolarité et sous le contrôle de STATc, un seul, codant pour une protéine phosphatase portant l'identifiant DDB\_G0274153, a pu être identifiée (Na et al., 2007). Cette protéine, jusque-là non caractérisée mais exprimée en phase végétative, appartiendrait à la famille des sérine/thréonine phosphatase de type PP2C, une propriété compatible avec le type de phosphorylation attendue pour AdcA. Le stress conduirait à l'activation de cascades de signalisation permettant la phosphorylation rapide de STATc et de AdcA. Suite à son activation, STATc pourrait transloquer dans le noyau et réguler ses gènes cibles, dont la phosphatase en question, permettant une récupération cellulaire optimale et parallèlement la déphosphorylation d'AdcA (Figure 52). Toutefois, plusieurs observations suggèrent une régulation plus complexe qui pourrait impliquer des voies parallèles et complémentaires pour contrôler l'état de phosphorylation d'AdcA : (1) la protéine est phosphorylée sur plusieurs sites, ce qui pourraient mettre en jeu des kinases et des phosphatases multiples, (2) malgré un délai, l'inactivation de STATc autorise la déphosphorylation de AdcA et enfin (3), l'activation constitutive de STATc par l'expression d'un mutant de sa phosphatase PTP3 n'a pas d'effet détectable sur la réponse d'AdcA alors qu'une réduction, du niveau ou de la durée de la phosphorylation, pourrait être attendue. En facilitant le retour à des conditions d'équilibre, STATc pourrait restaurer les conditions nécessaires à l'activation de la phosphatase ou l'inhibition de la kinase et agir ainsi de façon plus indirecte.

### 4. Quel(s) rôle(s) pour la protéine AdcA ?

Les travaux de caractérisation fonctionnelle de plusieurs membres du clan arrestine menés chez *S. cerevisiae* et les Mammifères convergent vers un rôle conservé de ces protéines adaptatrices dans la régulation de cargos membranaires et de leur trafic intracellulaire. La localisation majoritairement endocytaire de la protéine AdcA ainsi que l'identification de la protéine ArfA comme partenaire suggère un rôle similaire possible pour AdcA en connexion avec le trafic vésiculaire.

La caractérisation phénotypique du mutant invalidé pour *adcA* ne permet pas aujourd'hui de préciser les fonctions biologiques régulées par la protéine, le mutant ne présentant pas de défauts



**Figure 52 : Modèle de la réponse au stress hyper-osmotique chez *Dictyostelium*.**

Suite à un stress hyper-osmotique, les cellules subissent des changements morphologiques majeurs à travers la restructuration du cytosquelette et mettent en place une réponse transcriptionnelle spécifique pour s'adapter au stress. Dans cette réponse, le facteur de transcription STATc est activé et permet la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire. Dans ces cascades de signalisation, AdcA serait phosphorylée par des protéines en association avec le cytosquelette d'actine et déphosphorylée à travers l'activité transcriptionnelle de STATc. Cette déphosphorylation pourrait permettre à la cellule d'optimiser sa réponse face au stress et son adaptation.

majeurs dans des conditions de culture utilisées en laboratoire. Ceci n'est pas nécessairement inattendu si par analogie avec les arrestines de Levure par exemple, les arrestines de *Dictyostelium* devraient réguler un panel limité de cargos en réponse à des conditions extrêmes ou des stimuli très spécifiques. La caractérisation d'AdcA comme cible du stress hyper-osmotique nous a amené à tester un rôle éventuel dans l'osmo-réponse. Les résultats actuels obtenus sur le mutant *adcA* nul ne valident pas cette hypothèse, mais nous ne pouvons pas exclure une redondance des voies de signalisation régulant la résistance au stress, suggérée par la relative indifférence des cellules à l'invalidation de STATc, malgré le large répertoire de protéines sous son contrôle transcriptionnel.

Chez la Levure et les Mammifères, la forme phosphorylée des arrestines correspond généralement à une forme inactive de la protéine. Ainsi, les protéines Rod 1 ou encore Bull/2, qui régulent respectivement le transporteur de lactate Jen1 en présence de glucose dans le milieu extracellulaire ou le transporteur d'acides aminés Gap1 en milieu riche en azote, sont séquestrées sous leur forme phosphorylée en complexe avec la protéine 14.3.3 et leur déphosphorylation correspond à leur passage à un état actif (Becuwe et al., 2012; Merhi and André, 2012). De même, les  $\beta$ -arrestines de Mammifères sont maintenues dans le cytosol dans un état phosphorylé et leur recrutement sur leurs cibles membranaires requiert leur déphosphorylation préalable. Dans le cas d'AdcA, la phosphorylation de la protéine pourrait aussi permettre son inactivation. Dans ces conditions, l'application de stress s'apparenterait à une invalidation conditionnelle d'AdcA, une hypothèse cohérente avec l'absence d'effet de la mutation *adcA* nulle sur la réponse cellulaire au stress hyper-osmotique. L'identification des résidus phosphorylés et l'étude phénotypique du mutant *adcA* nul complémenté avec des mutants de AdcA mimant soit une forme non phosphorylable soit une forme constitutivement phosphorylée devraient permettre de préciser le rôle d'AdcA. Nos travaux ont permis d'identifier deux sérines phosphorylées dans la région N-terminale de la protéine. Des résultats préliminaires indiquent que leur mutation en alanines ou en acides aspartiques n'affecte pas la réponse macroscopique des cellules face au stress hyper-osmotique. Toutefois, le maintien d'un profil de mobilité électrophorétique mixte, sensible à un traitement phosphatase malgré la mutation de ces 2 sérines en alanines suggère l'existence d'autres résidus phosphorylés, dont la modification pourrait être essentielle dans la régulation de la fonction de la protéine.

Par analogie avec les autres membres du clan arrestine, AdcA pourrait réguler le devenir de cargos membranaires au niveau de la voie endocytaire, par exemple des transporteurs ou canaux ioniques susceptibles d'être impliqués dans la réponse au stress osmotique. En situation de stress, la phosphorylation massive d'AdcA permettrait de limiter son activité et de privilégier une réorientation des cargos cibles au niveau de voie endocytaire (dégradation vs recyclage), plus favorable à la résistance/adaptation des cellules au stress (Figure 52). Chez l'homme, dans le cas de TXNIP, la phosphorylation de la protéine conduit à sa dégradation. Ceci ne semble pas être le cas pour AdcA au



moins sur la durée de nos expériences, d'autant que la protéine est maintenue même en présence de cycloheximide. L'inhibition d'AdcA serait levée par déphosphorylation, avec le rétablissement des conditions normales.

A ce stade, on ne peut pas exclure toutefois la possibilité que la phosphorylation d'AdcA permette plutôt son activation. Dans le cas de l'arrestine PalF d'*A. nidulans*, la stimulation du récepteur PalH par une alcalinisation du pH extracellulaire conduit à la phosphorylation/activation de l'arrestine et au déclenchement d'une réponse transcriptionnelle via le facteur de transcription PacC permettant à la cellule une adaptation à ces conditions de pH alcalin (Herranz et al., 2005). PalF permet le recrutement et l'activation de PacC à proximité du récepteur activé par la formation d'un complexe multi-protéique incluant des protéines de la machinerie ESCRT (Galindo et al., 2012). De façon intéressante, la protéine AdcA possède également dans son extrémité C-terminale deux sites putatifs d'interaction avec des composants de la machinerie ESCRT, l'un avec la protéine Alix (site YPxL), l'autre avec la protéine Tsg101 (site PSAP). A l'exception du complexe ESCRT-0, l'amibe *Dictyostelium* possède tous les homologues des constituants des complexes ESCRT I, II et III ainsi que les protéines additionnelles comme Alix ou l'ATPase Vps4 (Mattei et al., 2005). Il serait intéressant de savoir si dans des conditions de stress, la protéine AdcA contribue au recrutement de sous-unités de la machinerie dans son voisinage. AdcA pourrait de façon similaire contribuer à l'activation d'une réponse transcriptionnelle, facilitant la récupération cellulaire.

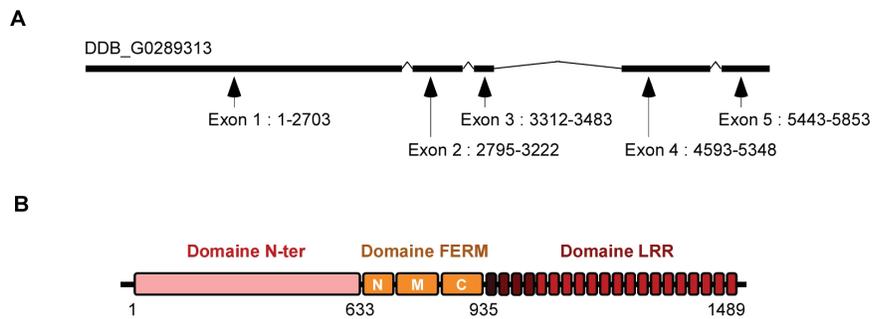
## 5. AdcA, un membre atypique du clan arrestine

Un deuxième niveau de régulation post-traductionnelle vient souvent s'ajouter à la phosphorégulation des arrestines par l'addition transitoire d'une étiquette ubiquitine. Chez les arrestines non conventionnelles, cette ubiquitination est assurée par le recrutement d'ubiquitine ligases de la famille Nedd4 directement sur des motifs PPxY présents sur les arrestines elles-mêmes. La protéine AdcA ne possède pas de motifs PPxY et l'existence de formes ubiquitinées de la protéine n'a pas été mise en évidence ni en conditions végétatives, ni en situation de stress. Un crible double-hybride mené au laboratoire avec AdcA comme appât a toutefois permis d'identifier parmi les interactants, l'ubiquitine ainsi qu'une ubiquitine protéase putative, laissant ouverte la possibilité d'une régulation par ubiquitination ou d'un rôle dans un processus ubiquitine-dépendant (Guetta, 2010).

La protéine AdcA présente un certain nombre de domaines qui ne sont pas partagées avec les autres membres du clan arrestine mais qui lui confèrent des propriétés que l'on retrouve en revanche chez les autres arrestines. L'acquisition de ses propriétés par d'autres chemins pourrait donc mettre en jeu d'autres mécanismes de régulation, mimant éventuellement les effets d'une ubiquitination, tout en maintenant un mode de fonctionnement similaire.



Ainsi, en aval du domaine arrestine, la protéine possède un domaine FYVE qui la cible sur la voie endocytaire, un site d'action retrouvé pour divers représentants du clan. Par ailleurs, le domaine N-terminal, en amont du cœur arrestine, présente un motif tripliqué possédant chacun un *cluster* de 5 à 6 histidines. Ce domaine est capable d'oligomériser en présence de métaux (Guetta, 2010). Dans des conditions physiologiques, les métaux mais également le pH pourrait moduler la capacité d'oligomérisation de la protéine. En effet, les histidines sont les seuls acides aminés ayant un pKa, permettant d'envisager des modifications de fonctionnement en réponse à une variation du pH cytosolique. C'est le cas notamment pour la protéine amibienne hisactophiline dont la liaison à l'actine est régulé par le pH cytosolique à travers un changement de protonation des histidines de la protéine (Hanakam et al., 1996; Pintsch et al., 2002; Smith et al., 2010b). De façon intéressante, les sérines S<sup>70</sup> et S<sup>77</sup> se localisent de part et d'autres du deuxième *cluster* d'histidines. Leur phosphorylation en réponse au stress pourrait modifier transitoirement l'équilibre des charges locales et permettre un changement de l'état oligomérique de la protéine. Il serait intéressant de tester *in vivo* l'effet des mutants de phosphorylation d'AdcA sur l'oligomérisation de la protéine. Le rôle de ce domaine dans l'oligomérisation d'AdcA n'exclut pas néanmoins la possibilité d'une oligomérisation IP<sub>6</sub>-dépendante qui impliquerait le cœur arrestine. En effet, les résidus chargés positivement impliqués dans la liaison des arrestines canoniques à l'IP<sub>6</sub> chez les Mammifères sont conservés chez la protéine AdcA et le cytosol de *Dictyostelium* contient une concentration importante de ce phosphoinositol, proche du mM, compatible avec cette hypothèse.



**Figure 53 : Représentation schématique des séquences nucléique et protéique de la protéine FrmC.**  
**A. Schéma de la séquence nucléique de FrmC.** Le gène *frmC* est constitué de 5 exons représentées par une ligne noire épaisse et 4 introns en traits fins. La séquence couverte par les exons sur l'ADN génomique est indiquée en bp. **B. Schéma de la séquence protéique de FrmC.** La protéine FrmC présente différents domaines : une longue extension N-terminale (a.a. 1 à 632), un domaine FERM central (a.a. 634 à 934) et une succession de 18 motifs LRR putatifs (a.a. 935 à 1489).

## PARTIE 2 : ÉTUDE FONCTIONNELLE D'UN PARTENAIRE D'ADCA, LA PROTÉINE FRMC

Dans le cadre de l'étude du rôle fonctionnel d'AdcA, le laboratoire a entrepris une recherche de partenaires de la protéine par des approches diverses, incluant des *pull-down* suivis d'analyses par spectrométrie de masse et des cribles double-hybride. Ces travaux ont permis d'identifier une liste de partenaires putatifs, dont la protéine FrmC sur laquelle j'ai focalisée la suite de mon travail de recherche. Au début de ce travail, la protéine FrmC n'avait été mentionnée que dans un seul article de la littérature comme membre de la famille des protéines à domaine FERM chez *Dictyostelium* (Patel et al., 2008). La protéine AdcA étant sensible à un remaniement du cytosquelette d'actine et les domaines FERM étant décrits comme domaines de liaison à l'actine, FrmC nous a paru être un candidat prometteur pour poursuivre la caractérisation fonctionnelle d'AdcA.

### I. ETUDE *IN SILICO* DE LA PROTÉINE FRMC

#### 1. Caractéristiques structurales de la protéine FrmC

Le gène *frmC* (5853 pb) est localisé en position 2625515 sur le chromosome 5. Il contient 4 introns de 91 pb, 89 pb, 108 pb et 94 pb situés juste après les positions 2704, 3131, 3303 et 4059 de l'ADN codant. Ce gène code pour la protéine DDB\_G0289313 de 1489 acides aminés, baptisée FrmC du fait de la présence d'un domaine FERM (*Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin*) au sein de la protéine (Figure 53.A). La masse moléculaire calculée de cette protéine est de 167 kDa et son pI théorique de 5,9. L'étude *in silico* de la séquence protéique de FrmC à l'aide d'outils de recherche de domaines protéiques comme SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) a permis d'identifier, en plus du domaine FERM central, un domaine C-terminal constitué de plusieurs motifs de type LRR (*Leucine rich repeat*). Par ailleurs, un long domaine sans homologie avec des protéines connues vient étendre la protéine en N-terminal (Figure 53.B).

##### 1.1. Le domaine FERM

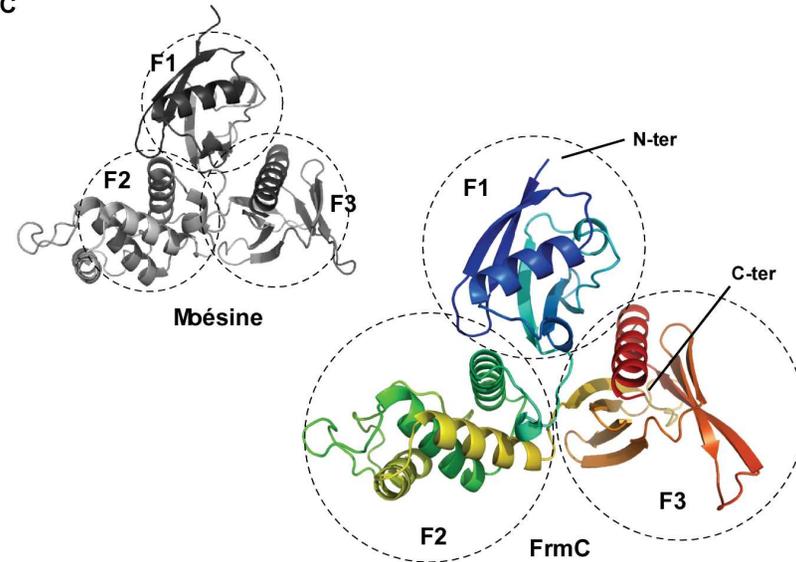
Le domaine FERM est un module protéique d'environ 300 acides aminés souvent présent dans des protéines en interaction avec le cytosquelette d'actine, qui servent de protéines d'échafaudage entre des protéines de la membrane plasmique et le réseau d'actine. Chez les Mammifères, la famille

FrmC	1	--EKILVHISLDPQSHKVICIIEDEFTVKKDIPDFSEKLGIVQTEFFSIA-----
Radixine	1	MPKFINVRMTMDAEN--EPAIOPNTIGKLFDFQVVKTYGLREVWFFGLQ-----
Merline	1	QPKTFIVRIVTMDAEN--EINCEMKWKQKDLFDIVQRTLGLREVWFFGLQ-----
Moesine	1	MPKFTISVRVTMDAEN--EPAIOPNTIGKLFDFQVVKTYGLREVWFFGLQ-----
Taline	1	RKQRPFRIRMDGTIKTIMDDSKVITDMLMTICARIGTNHDEMSHVRELMEEKKEEI
TPP4	1	-----LLIENITQAKVKNKHDCQVLLDVFKKHDIITQDVFGLQ-----
FrmC	48	-----EY--TSDGYDRWLDPNRAWKAGVKNISKLI--FKIKMF-----
Radixine	49	-----YV--DSKGSITWLKINKKVTQODVKKENPLQKFRAKFF-----
Merline	49	-----YT--IKDTVAWLKDKKVLHHDVSKKEEPTFHEIAKFF-----
Moesine	49	-----YQ--DKKGSITWLKINKKVTQODVKKESPLKFRAKFF-----
Taline	61	TGTLRKDKTLRLRDEKKMEKLRQK--HDDDELNWLHDGHTLRECGVEEHETLL--LRKFF
TPP4	41	-----LADSDTDNPRWLDPNKPRKQ--LKRGSFYSLNFRVKFF-----
FrmC	83	KQP--KKISDSKAVHLYVVLQIQSVAVNGTYP--SEAMSYRISALQFYITFCAIDKIKHFIAG
Radixine	86	PEDVSEELIQEITQRLFFLOVKKAILNDDIYCPPEAVLLASAVQAKYGDYNKELHKRPG
Merline	85	PEAEEELVQEIITQHLFFLOVKKQILLDEKIYCPPEASVLLASAVQAKYGDYDPSVHKRG
Moesine	86	PEDVSEELIQEITQRLFFLOVKKGIINDDIYCPPEAVLLASAVQSKYGDVFNKVEHKRAG
Taline	118	YSQNVVSRDVFQNLNLYVQARDIILNGSHVPSFKACEHAGVQCCIQCFGHNKQKHKAG
TPP4	78	VSEPN--KIQEYRYQVFLQKQDILTGRIPCESNTAALLASAVQSELGDYDQSENLSG
FrmC	141	FLDHGSLSEFIPSNFF--FELTDEVIQKRFHLSQIKCSSIEAKIRYLDLANKIPTFG
Radixine	146	YLANQ---RILPQRVLEQHKLTKQWBERIQNWHEHRGMLRDSMMEYLKIAQDLEMYG
Merline	145	EIAAQ---EILPQRVINLYQITPEWBERITAWYAEHRGRARDEAMEYLKIAQDLEMYG
Moesine	146	YLAGQ---KILPQRVLEQHKLTKQWBERIQWHEHRGMLRDAVIEYLKIAQDLEMYG
Taline	178	FIDLK---EILEKEY-----VKQKGRIFQAKKCGQMSIEAKIRYKILARSKITYG
TPP4	137	YLSDY---SFLPQ---PQDTEKELAKLHQQLIGSPAAEFNYINTARTILELYG
FrmC	199	VTSFQVFDGIRESSIVRQKRLCVAEDGELI---SRKDR--AGYDFSKK--EIIISYQVIT
Radixine	203	VNYFPIKKNKGTEL-----WLGVDALGNI--YRHPDILTPKIGFPWS--EIRNISND
Merline	202	VNYFAIINKKGTEL-----LLGVDALGHI--YFENRILTPKISFPWN--EIRNISGD
Moesine	203	VNYFSIKKNKGSEL-----WLGVDALGNI--YFQNDRLTPKIGFPWS--EIRNISND
Taline	229	VSIFLVKQKMKGKN-----KLVPRILG--TKECVMDENKTEVIQEQNLNTNIRWAAASP
TPP4	186	VEEHYARDQSNNEI-----MIGVMSGGLI--KKNRVRIN--TFPWL--KIVRISKRC
FrmC	253	EGIKIQIP---HSSITPNTSETMSFDI--SSYDQSNITIDLMGYKY--EII-----
Radixine	253	KKKVIKPI---D-----KKAPDVEFYAPRLRNKRLLALCMGNHLLMRRRKP
Merline	252	KEETIKPI---D-----KKIDVKKKNSKLRVKNKLLQLCIGNHLLMRRRKPDSLEVQ
Moesine	253	KKKVIKPI---D-----KKAPDVEFYAPRLRNKRLLALCMGNHLLMRRRKP
Taline	283	KSTIDFG---D-----YQD---GIVSVQTEGEGLAQLIAGYIDITL-----
TPP4	233	KQETIQLRKELHE---S--ETLLGEMVNYRACKNWKACVEHITF-----
FrmC	297	-----Q
Radixine	299	-----T
Merline	303	QMKQAAREEKARK
Moesine	299	-----T
Taline	320	-----K
TPP4	275	-----F

B

	FrmC	Taline	TPP4	4.1	Radixine	DAL-1	Merline	Moésine	% IDENTITES
FrmC		16,8	22,4	21,7	15,6	12,8	16,6	13,8	
Taline	28,7		18,1	12,4	16,3	11,5	18,8	18,7	
TPP4	35,5	32,2		45,9	35,2	41,5	24,5	24,8	
4.1	37,1	24,0	67,5		23,7	72,7	26,2	21,2	
Radixine	29,6	31,8	39,4	37,6		23,0	57,4	85,8	
DAL-1	19,9	21,3	60,2	83,9	37,2		21,6	22,9	
Merline	29,6	35,1	38,7	38,1	70,8	31,6		55,9	
Moésine	25,6	34,0	36,6	34,7	94,2	35,1	70,8		
% IDENTITES + HOMOLOGIES									

C



**Figure 54 : Caractéristiques du domaine FERM de FrmC.**

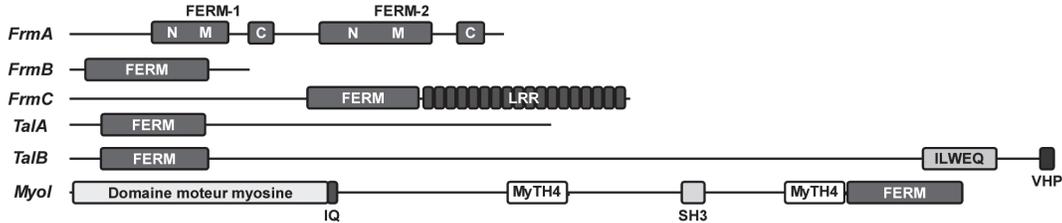
**A.** Les séquences protéiques des domaines FERM de FrmC et des protéines humaines radixine, merline, moésine, taline et TPP4 ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW et colorées dans Boxshade. **B.** Matrice d'identités/homologies entre les différentes protéines Dd-FrmC, Hs-Taline, Hs-radixine, Hs-moésine, Hs-merline, Hs-DAL1, Hs-TTP4, et Hs-4.1. Pour le calcul, les séquences ont été limitées au domaine FERM. **C.** Modèle de la structure du domaine FERM de FrmC obtenue à partir de la structure cristalline de la moésine (1E5W) représentée en gris à l'aide du logiciel Phyre 2 et visualisée avec PyMOL.

des protéines à domaine FERM inclut les protéines fondatrices de la famille, à savoir la protéine bande 4.1 et les protéines ERM (Ezrine, Radixine et Moésine) mais également certaines myosines, la taline, la merline ou encore la FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Au sein de ces protéines, les domaines FERM interviennent comme plateformes d'interaction aussi bien avec des partenaires protéiques qu'avec des phosphoinositides (Ardura et al., 2011; Bompard et al., 2003; Carvalho et al., 2010; Mahon, 2009; Moore et al., 2012; Pestonjamas et al., 1995; Reczek, 1997; Roy et al., 1997; Turunen et al., 1994; Yonemura, 1998).

Les domaines FERM sont généralement constitués de trois sous-domaines: (1) un domaine F1 (aussi appelé FERM-N) dont la structure rappelle celle de l'ubiquitine, (2) un domaine F2 (FERM-M) qui partage des similitudes structurales avec l'ACBP (*acyl-coenzyme A binding protein*) et enfin (3) un domaine F3 (FERM-C) structurellement proche des domaines PH (*pleckstrin homology domain*) ou PTB (*phosphotyrosine binding protein*). Ces trois domaines s'organisent en une structure globulaire compacte en forme de feuille de trèfle. Dans la taline et la kindline, le domaine FERM auquel vient s'ajouter un sous-domaine supplémentaire F0 adopte une conformation différente, linéaire (Campbell, 2010; Elliott et al., 2010; Yates et al., 2012).

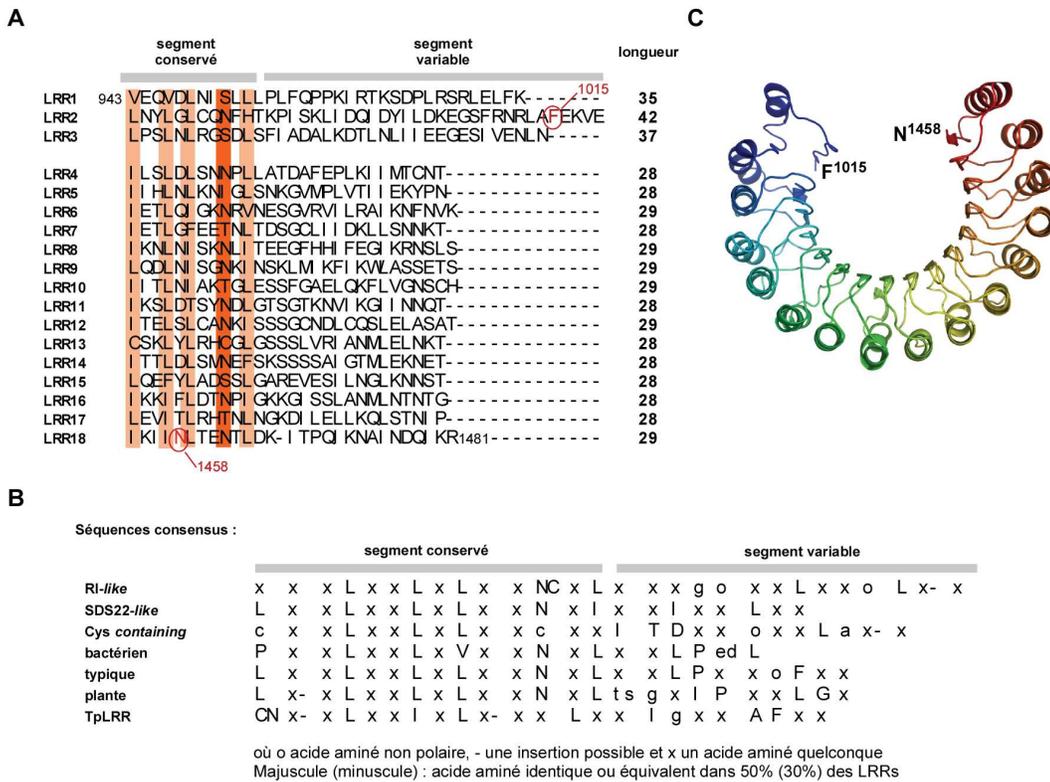
Le domaine FERM de FrmC (a.a. 633 à 934) partage environ 20 à 40 % d'homologies avec les domaines FERM de protéines humaines comme la merline ou la protéine bande 4.1 (Figure 54.A et B). Malgré ce faible niveau d'homologies de séquence (constat similaire entre les protéines humaines elles-mêmes pour différents domaines FERM), il a pu être modélisé à partir de la structure de la moésine (PDB : 1E5W) à l'aide du logiciel Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) (Figure 54.C). Cette modélisation, visualisée avec le logiciel PyMOL, nous indique une conservation globale des différents sous-domaines F1, F2 et F3, laissant anticiper des fonctions similaires pour ce domaine d'échafaudage.

En plus de *frmC*, le génome de *Dictyostelium* contient 5 gènes codant pour des protéines à domaines FERM correspondant aux deux talines A et B (*talA* et *talB*), à la myosine I (*myoI* appelée aussi *myoVII*) et à deux autres protéines appelées FrmA (*frmA*, possédant deux domaines FERM) et FrmB (*frmB*) (Figure 55). La séquence DDB\_G0271184 prédite pour coder un homologue de la myosine G, une autre protéine à domaine FERM, serait en fait un pseudogène. D'après la classification de Frame *et al.*, basée sur les homologies de séquence entre les domaines FERM, les talines de *Dictyostelium* ainsi que FrmA et FrmC sont classées dans le même groupe que les talines des Mammifères qui inclut également les kindlines, alors que la myosine I et FrmB sont retrouvés dans le groupe des myosines. Aucune protéine de *Dictyostelium* n'est présente dans le troisième groupe qui comprend certaines kinases et phosphatases dont la FAK et les protéines ERM (Frame et al., 2010). Les études menées jusque là sur les protéines amibiennes TalA, TalB, MyoI et FrmA indiquent des rôles dans des processus d'adhésion, de phagocytose, de cytocinèse ou encore dans le



**Figure 55 : Représentation schématique des protéines à domaine FERM de *Dictyostelium*.**

Sont représentées les protéines FrmA, FrmB, FrmC, TalA (Talaine A), TalB (Talaine B) et la myosine I (MyoI). Les différents domaines caractéristiques sont indiqués : domaine FERM et ses sous-domaine F1 (N), F2 (M) et F3 (C), les motifs LRR, le motif ILWEQ d'interaction avec l'actine, le domaine VHP (*Villin-type headpiece*) d'interaction avec des protéines du cytosquelette, le domaine moteur de la myosine, le motif IQ de liaison aux motifs « main EF » (*EF hand*), les domaines MyTH4 (*Myosin tail homology 4*), et le domaine SH3 (*Src homology 3*).



**Figure 56 : Domaine LRR de FrmC.**

**A. Alignement des motifs LRR de FrmC.** Les séquences conservées et variables sont indiquées et les résidus caractéristiques des domaines LRR sont surlignés en orange. La taille de chaque motif est indiquée sur la droite (en a.a.). **B. Comparaison des séquences caractéristiques des différentes sous-familles de motif LRR.** Les acides aminés conservés présents dans les segments conservé et variable des différents types de motifs sont indiqués ainsi que le nom de chaque sous-famille (reproduit de Kobe and Kajava, 2001). **C. Modélisation du domaine LRR de FrmC.** Le domaine LRR de FrmC a été modélisé à l'aide du logiciel Phyre 2 à partir de la structure de la ribonucléase humaine (PDB : 1Z7X) et visualisé avec le logiciel PyMOL.

développement multicellulaire (Breshears et al., 2010; Hibi et al., 2004; Niewöhner et al., 1997; Patel and Brunton, 2009; Patel et al., 2008; Tsujioka et al., 2004, 2012; Tuxworth et al., 2001). Chez la taline A, le domaine FERM a été caractérisé comme capable de reconnaître les domaines cytosoliques des protéines d'adhésion Sib A-E (*Similar to beta Integrin*). En effet, ces domaines possèdent un motif NPxY, motif reconnu par le sous-domaine F3 des domaines FERM, essentiel pour l'interaction entre la taline A et la protéine SibA (Cornillon et al., 2006).

### 1.2. Le domaine LRR

Le domaine FERM de FrmC est prolongé en C-terminal par un domaine de 555 acides aminés présentant 18 motifs putatifs de type LRR (Figure 56.A). Les motifs LRR sont des motifs structuraux de 20 à 30 acides aminés caractérisés par un segment N-terminal riche en leucines (LxxLxLxxNxL où x est un acide aminé quelconque et où L et N peuvent être remplacés par I/V/F ou C/T/S respectivement) structuré en brin  $\beta$  avec des boucles et un segment C-terminal organisé en hélice  $\alpha$  dont la plus grande variabilité en terme de séquence, de longueur et de structure a conduit à la classification des LRRs en 7 familles distinctes (Figure 56.B, (Kobe and Kajava, 2001). La plupart des motifs LRR de FrmC appartiennent à la famille des inhibiteurs de la ribonucléase (RI) et ce domaine LRR a d'ailleurs pu être modélisé à partir de la structure de la RI humaine (PDB : 1Z7X) à l'aide du logiciel Phyre 2 (Figure 56.C). Le modèle couvre la séquence protéique depuis F<sup>1015</sup> à N<sup>1458</sup>. D'après ce modèle, ces motifs LRR adopteraient une structure globale en forme de fer à cheval, délimitant deux surfaces d'interaction protéine-protéine potentielle, une surface concave en feuillet  $\beta$  constitué des brins  $\beta$  de chaque motif et une surface convexe d'hélices  $\alpha$  (Figure 56.C).

Les domaines LRR sont retrouvés dans un large éventail de protéines (> 14 000, kinases, ubiquitine ligases, récepteurs de surface ... ) qui couvrent une gamme de fonctions biologiques très large allant de l'immunité au développement neuronal en passant par la polarisation cellulaire, la régulation de l'expression génique, l'apoptose, l'adhésion cellulaire ou encore la dynamique du cytosquelette (Bilder and Perrimon, 2000; Linhoff et al., 2001; Mancuso et al., 2012; Padmanabhan et al., 2009; de Wit et al., 2011). Aussi, uniquement à partir de ces données structurales, aucune fonction pour ce domaine ne peut être prédite à l'exception d'un rôle comme domaine d'interaction protéine/protéine.

### 1.3. Le domaine amino-terminal de FrmC

Contrairement aux 2 autres domaines de FrmC, la région N-terminale de 632 acides aminés en amont du domaine FERM ne présente aucune homologie de séquence avec des domaines décrits. La prédiction de structures secondaires à l'aide des logiciels PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

```

1  MEGVEDDLSKLLLEELSSGVVLNNIQEKLNQSSPKLQSFIDDETGSNAEDVRRVLDAAATDT
61  ESNYGGGANSITNTPNFNSHRGHQHLQLHTELSLDALRPVSENSPLHKSATRPISTSIRL
121 PRLSVCEDDSSSSSSSSDGDSSSSDSSDSSSEQSDDDDVHLHLHLHRHHRKVKEDGDS
181 FESSSESSEQYGSPTLRRQEALKLEKIMQIQEKKLLKREKLEQDELELKEKQELNEIT
241 VQKEIKLKDKSNSVQNDIVDSNNNNNNNNNSITIEEQQEKQQQQQHHHHHSTPNKPP
301 KRSVSIISTPDSNIVVAGGNVISKERKRSILASFEEGSPMRSSSRLPSSRGGSIKIKVSK
361 VLEEMQLQQEFKQEQLRHSARLSQLIRDLMSSNLQDQDQQLRKNENSNNNEGDDNN
421 ENVSNDNSSDNENQNINGSILIKEEQEKIEITTTITTVITPPPPAQEPQHQQPKILTP
481 EEVEEERIRVLRIERMKDQVFSQLDELEDPLYSNGSRQRNGGGGASTSAEPSMMQIPLT
541 RLEDTASSSSSPTLQATKTTTTTTTTTTTTTTATLPINNKNLNIQGRPRKDISDHWDIG
601 RKEQPRRSMTLNIQRVGEDFSVKKAEA KKNVP

```

**Figure 57 : Structure secondaire du domaine N-terminal de FrmC.**

La séquence du domaine N-terminal de FrmC (a.a. 1 à 632) a été analysée avec les logiciels de prédiction de structures secondaires PsiPred. Les régions prédites pour se structurer en hélice  $\alpha$  sont indiquées en gris foncé et celles susceptibles de s'organiser en *coiled-coil* par des traits noirs au dessus de la séquence. Les prédictions de brins  $\beta$  sont indiquées en gris clair.

indique un domaine constitué principalement d'hélices  $\alpha$  susceptibles pour certaines d'entre elles de participer à des structures en *coiled-coil* (Figure 57).

Du fait de la présence de trois plateformes distinctes d'interaction potentielle avec des partenaires protéiques ou éventuellement lipidiques, l'étude *in silico* de FrmC nous amène donc à envisager pour FrmC un rôle comme protéine adaptatrice.

## 2. Homologues de la protéine FrmC

Chez *Dictyostelium discoideum*, FrmC est la seule protéine à domaine FERM ayant également des motifs de type LRR. Deux autres Dictyostélides, *Dictyostelium purpureum* et *Dictyostelium fasciculatum* possèdent un homologue de FrmC, présentant respectivement 83% et 75% d'homologies avec Dd-FrmC, avec une conservation de séquence plutôt faible dans la partie N-terminale. Une forme plus courte limitée aux seuls domaines FERM et LRRs est en revanche trouvée chez divers protistes comme d'autres Dictyostélides (*Polysphondilium pallidum*) ou encore *Entamoeba histolytica*, *Naegleria gruberi*, *Trypanosoma cruzi*, *Capsaspora owczarzaki*. Par contre, à l'heure actuelle, aucun équivalent n'a été identifié chez les Mammifères, ni même de façon plus générale chez les organismes multicellulaires.

## II. CONSTRUCTION D'OUTILS POUR L'ÉTUDE DE LA PROTÉINE FRMC

Afin de permettre l'étude de cette nouvelle protéine et de tester son interaction avec la protéine AdcA, plusieurs outils ont du être élaborés durant ce travail.

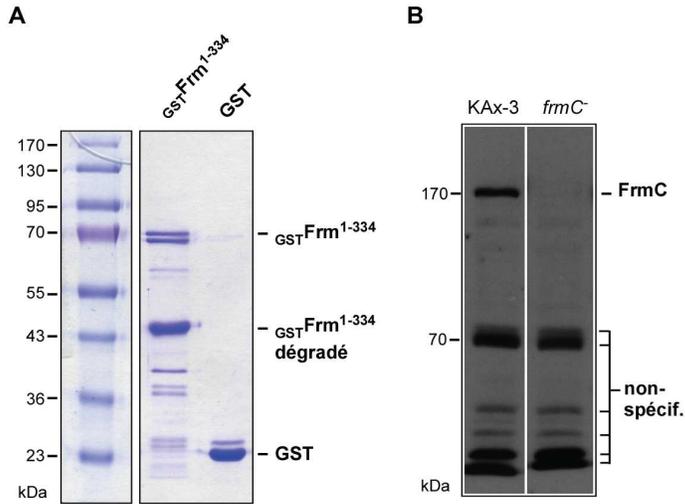
### 1. Production d'anticorps dirigés contre FrmC

Afin d'obtenir des anticorps spécifiques de FrmC, nous avons fait le choix de deux immunogènes différents, l'un correspondant à une partie du domaine N-terminal de la protéine (FrmC<sup>1-334</sup>), l'autre correspondant à un mélange de trois peptides de FrmC.

#### 1.1. Obtention d'anticorps dirigés contre le domaine N-terminal de FrmC

##### 1.1.1. Expression du domaine GSTFrmC<sup>1-334</sup> utilisé comme immunogène

Le fragment d'ADN correspondant à la région 1-334 de FrmC (FrmC<sup>1-334</sup>) a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur pGEX-KG permettant l'expression du fragment FrmC<sup>1-334</sup> sous une forme



**Figure 58 : Génération d'anticorps anti-FrmC<sup>1-334</sup>.**

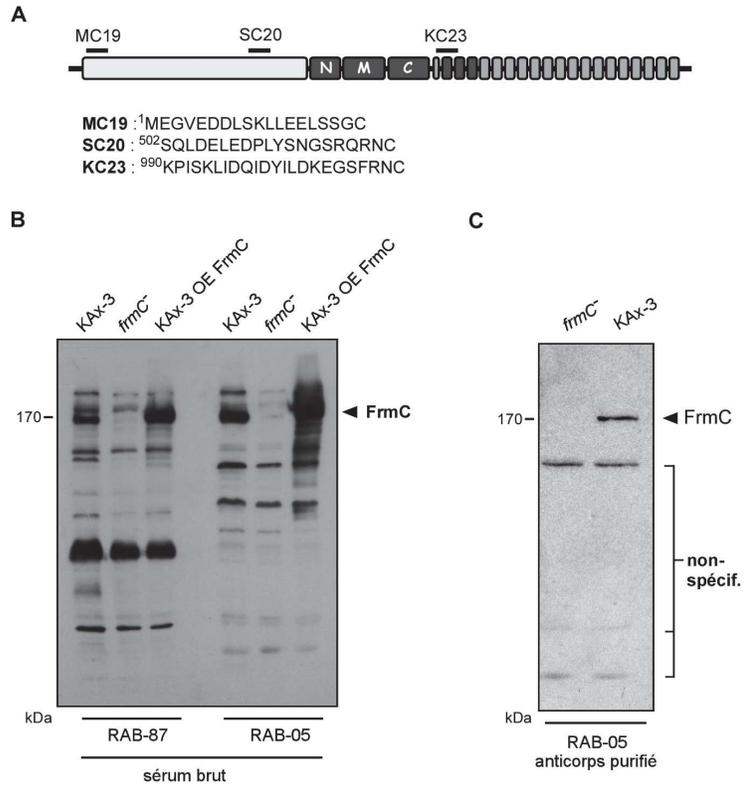
**A. Expression en système bactérien de l'extrémité N-terminale de FrmC.** L'extrémité N-terminale de FrmC (a.a. 1 à 334) fusionné à la GST et la GST seule ont été exprimés dans *E. coli* BL21-DE3 pendant 3 h à 37°C puis purifiées sur colonne de glutathion-Sepharose. Les préparations ont été analysées par séparation sur gel de polyacrylamide à 12 % et coloration au bleu de Coomassie avant couplage covalent aux billes de glutathion-Sepharose **B. Purification des anticorps anti-FrmC<sup>1-334</sup>.** Les anticorps ont été purifiés par affinité sur la colonne de GST-FrmC<sup>1-334</sup> puis testés par Western blot sur des échantillons protéiques totaux de cellules parentales KAx-3 et de cellules invalidées pour *frmC* (*frmC*<sup>-</sup>), déposés sur gel de polyacrylamide 10 %.

**Figure 59 : Obtention d'anticorps anti-peptides.**

**A. Localisation des peptides utilisés pour l'immunisation.** La position des différents peptides (MC-19, SC-20, KC-23) sur la séquence protéique de FrmC ainsi que leur séquence ont été indiquées.

**B. Test des sérums par Western blot.** Les sérums des 2 lapins (RAB-05 et RAB-87) ont été utilisés en Western blot au 1/500 comme anticorps primaire, sur des extraits protéiques totaux de cellules parentales KAx-3, *frmC*<sup>-</sup> et KAx-3 surexprimant FrmC préalablement déposés sur gel de polyacrylamide 10%.

**C. Purification d'anticorps anti-FrmC MC-19.** Après purification du sérum du lapin RAB-05 sur une colonne contenant le peptide MC-19, la solution d'anticorps anti-FrmC MC-19 a été testée en Western blot sur des échantillons protéiques totaux de cellules KAx-3 et *frmC*<sup>-</sup> déposés sur gel de polyacrylamide 10%.



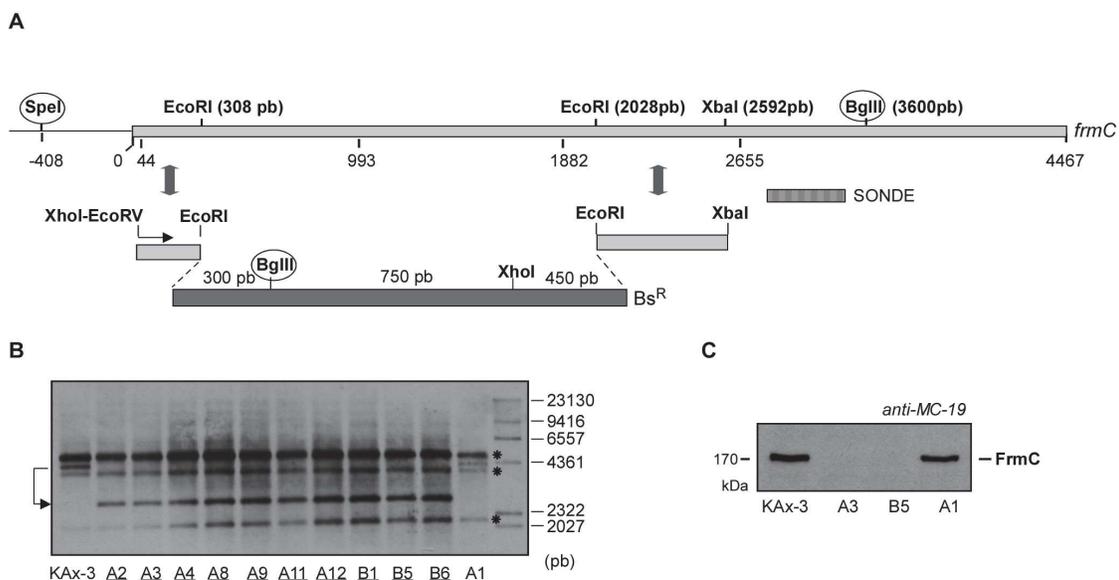
étiqueté en N-terminal avec la GST ( $\text{GST-FrmC}^{1-334}$ ). La protéine  $\text{GST-FrmC}^{1-334}$  a été exprimée dans la souche BL21-DE3 d'*E. coli* et purifiée par affinité sur une colonne de glutathion-Sepharose. La qualité de la préparation a été évaluée par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Comme illustré figure 58.A, alors que la préparation de GST seule utilisée comme contrôle contient une seule bande à la taille attendue de ~30 kDa, celle de  $\text{GST-FrmC}^{1-334}$  contient une protéine à 70 kDa, taille attendue pour  $\text{GST-FrmC}^{1-334}$  (40 kDa pour  $\text{FrmC}^{1-334}$  et 30 kDa pour la GST) ainsi que plusieurs produits de dégradation dont une forme majoritaire vers 43 kDa. Malgré une dégradation importante, la préparation de  $\text{GST-FrmC}^{1-334}$  a été confiée à la société Covalab (<http://www.covalab.com>) pour l'immunisation de deux lapins (RAB-1 et RAB-20).

### 1.1.2. Purification des anticorps dirigés contre $\text{FrmC}^{1-334}$

Au terme du protocole d'immunisation (J74), les anticorps présents dans les sérums des deux lapins ont été purifiés successivement sur des colonnes de GST (afin d'éliminer les anticorps spécifiques de la GST) et de  $\text{GST-FrmC}^{1-334}$  puis testés par Western blot sur des extraits protéiques totaux de cellules parentales KAx-3 et de cellules invalidées pour *frmC* (*frmC*, voir paragraphe II.2.1). Les deux sérums purifiés reconnaissent plusieurs protéines dont une majoritaire à 170 kDa, présente dans la souche parentale et absente dans la souche *frmC*, correspondant à FrmC (Figure 58.B, illustré uniquement pour le sérum du lapin RAB-20). Le sérum du lapin RAB-20 donnant globalement un signal de meilleure qualité, il a été conservé pour la suite des expériences (nommé anticorps anti-FrmC RAB-20). Ces anticorps sont efficaces en Western blot mais ne fonctionnent pas dans des expériences nécessitant la reconnaissance de la protéine sous forme native comme l'immunofluorescence ou l'immunoprécipitation, limitant de ce fait leur champ d'utilisation.

### 1.2. Obtention d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale de *FrmC*

Devant les limites d'utilisation des anticorps anti-FrmC RAB-20, une autre stratégie a été adoptée utilisant des peptides comme immunogènes. Les peptides sélectionnés se localisent au niveau de l'extrémité N-terminale de FrmC (peptide MC-19 : a.a. 1 à 18) à la fin du domaine N-terminal (peptide SC-20 : a.a. 502 à 520) et au début du domaine LRR (peptide KC-23 : a.a. 990 à 1011) (Figure 59.A). Deux lapins (RAB-05 et RAB-87) ont été immunisés avec un mélange contenant ces 3 peptides couplés à la KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*). La synthèse des peptides ainsi que l'immunisation ont été réalisées par la société BIOTEM (<http://www.biotem.fr>). Les sérums des deux lapins reconnaissent une protéine à la taille attendue pour FrmC dans la souche parentale KAx-3 surexprimant (OE FrmC) ou non FrmC, absente dans la souche *frmC* (Figure 59.B). Après purification des anticorps par affinité sur les différents peptides, leur analyse par Western blot a permis d'établir que les anticorps reconnaissent essentiellement le peptide MC-19, donc l'extrémité N-terminale de FrmC (Figure 59.C). Ces anticorps purifiés, appelés anti-FrmC MC-19 (lapin RAB-05) ont été utilisés préférentiellement



**Figure 60 : Construction de mutants *frmC*.**

**A. Stratégie de construction génique pour l'obtention de mutant *frmC*.** La séquence génomique de *frmC* est schématisée ainsi que la séquence de la cassette de résistance à la blasticidine ( $Bs^R$ ). Les régions amplifiées par PCR et les sites de restriction enzymatique utilisés pour la construction génique sont indiqués. La sonde utilisée pour la validation des clones par Southern blot est également localisée sur la séquence. **B. Validation des clones par Southern blot.** Après transformation et sélection, les clones supposés *frmC* ont été vérifiés par Southern blot. Des extraits d'ADN génomique de ces différents clones et de cellules parentales KAx-3 utilisées en contrôle sont digérés avec *SpeI/BgIII* et déposés sur gel d'agarose 1%. Après migration, les fragments d'intérêt sont révélés en utilisant la sonde FRM5/FRM15 marquée à la digoxygénine (localisation sonde indiquée en A). Les astérisques indiquent les signaux non spécifiques et les clones positifs *frmC* ont été soulignés. **C. Validation des mutants *frmC* par Western blot.** Des extraits protéiques totaux issus des clones *frmC* A3 et B5 validés en Southern blot ont été déposés sur gel de polyacrylamide et testés par Western blot utilisant les anticorps anti-FrmC MC-19. Des extraits protéiques totaux de cellules KAx-3 ainsi que du clone A1 ont été utilisés en contrôle.

dans la suite des travaux, d'autant qu'ils sont capables de reconnaître la protéine FrmC endogène dans des expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation.

## 2. Élaboration de mutants invalidés pour *frmC*

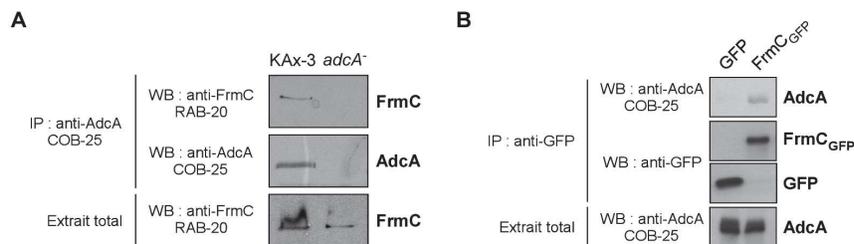
Pour permettre d'approcher le rôle fonctionnel de FrmC, des mutants invalidés pour *frmC* ont été construits afin d'évaluer l'impact de l'absence de FrmC sur la biologie de l'organisme.

### 2.1. Construction génétique

L'invalidation de *frmC* a été obtenue par l'intégration de la cassette de résistance à la blasticidine ( $Bs^R$ ), au niveau du locus de *frmC*, par recombinaison homologue. Les séquences 44-993 pb et 1882-2655 pb du gène ont été amplifiées par PCR (avec les couples d'amorces FRM29/FRM2 et FRM17/FRM4, portant des sites de restriction appropriés) puis digérées par les enzymes *XhoI/EcoRI* et *EcoRI/XbaI* respectivement (Figure 60.A). Les 2 fragments ont été intégrés dans le vecteur pBlueScript puis la cassette de résistance à la blasticidine extraite du plasmide pUCBsr a été introduite au niveau du site *EcoRI*. Cette cassette flanquée par les séquences homologues de *frmC* a ensuite été digérée par les enzymes de restriction *EcoRV/XbaI* et électroporée dans la souche parentale KAx-3. Après sélection en présence de blasticidine, des clones indépendants ont été isolés et testés pour leur génotype *frmC* nul.

### 2.2. Validation des mutants *frmC* nuls

Afin de vérifier l'intégration de la cassette de résistance à la blasticidine dans le locus du gène *frmC*, les clones isolés ont fait l'objet d'une première validation par PCR en utilisant des amorces spécifiques de *frmC* ou de la cassette  $Bs^R$ . Les clones présentant l'amplicon attendu ont ensuite été testés par southern blot. Une sonde marquée à la digoxygénine a été générée par PCR avec le couple d'amorces FRM5/FRM15 (Figure 60.A, sonde), situé entre les positions 2656 pb et 3122 pb et l'ADN génomique des mutants potentiels a été digéré avec les enzymes *SpeI/BglIII*. Avec cette combinaison d'enzymes, il est attendu que la sonde révèle un fragment de 4294 pb dans la souche parentale et un fragment de 3324 bp dans la souche mutante du fait de la présence d'un site *BglIII* dans la cassette  $Bs^R$  (Figure 60.A). Malgré le fait que la sonde s'hybride sur des fragments supplémentaires de l'ADN génomique (marqués par un astérisque), elle a permis d'identifier 10 clones avec le profil attendu, validant l'intégration de la cassette dans le locus de *frmC* (Figure 60.B, clones soulignés). Des extraits protéiques totaux issus de ces mêmes clones ont été testés par Western blot avec l'anticorps anti-FrmC RAB-20. Comme illustré sur la figure 60.C pour les clones A1, A3, B5 et la souche parentale, les clones validés comme nuls pour *frmC* par Western blot (A3, B5) ne présentent pas de signal à la taille



**Figure 61 : Validation de l'interaction AdcA/FrmC.**

**A. Interaction entre les protéines endogènes.** AdcA endogène est immunoprécipitée à partir d'un lysat de cellules parentales KAx-3, à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25. Après séparation des protéines co-immunoprécipitées sur gel de polyacrylamide 10 %, la présence de FrmC dans l'immunoprécipitat et l'immunoprécipitation d'AdcA sont contrôlées par Western blot à l'aide respectivement de l'anticorps anti-FrmC RAB-20 et anti-AdcA COB-25. Les quantités de FrmC endogène sont également vérifiées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-FrmC RAB-20. La même expérience est réalisée dans une souche *adcA*<sup>-</sup> en contrôle de spécificité. **B. Co-immunoprécipitation d'AdcA avec FrmC<sub>GFP</sub>.** FrmC<sub>GFP</sub> ou la GFP surexprimées dans une souche parentales KAx-3 sont immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-GFP. La présence d'AdcA dans l'immunoprécipitat est analysée par Western blot avec l'anticorps anti-AdcA COB-25. Les quantités d'AdcA endogène et de FrmC<sub>GFP</sub> immunoprécipitées sont également contrôlées par Western blot avec les anticorps anti-AdcA COB-25 et anti-GFP, respectivement.

de FrmC, contrairement à la souche parentale KAx-3. Parmi l'ensemble des clones validés, les clones A3 et B5, issus de transformations indépendantes, ont été conservés pour la caractérisation phénotypique de la souche *frmC* nulle. Sauf exception précisée dans le texte, les illustrations présentées correspondent aux résultats obtenus sur le clone B5.

### III. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ADCA/FRMC

Initialement, la protéine FrmC a été identifiée par spectrométrie de masse comme partenaire putatif d'AdcA dans des expériences de *pull-down* utilisant AdcA<sub>GFP</sub> comme cible. Nous avons voulu confirmer l'interaction entre ces deux protéines et préciser les domaines impliqués dans cette interaction.

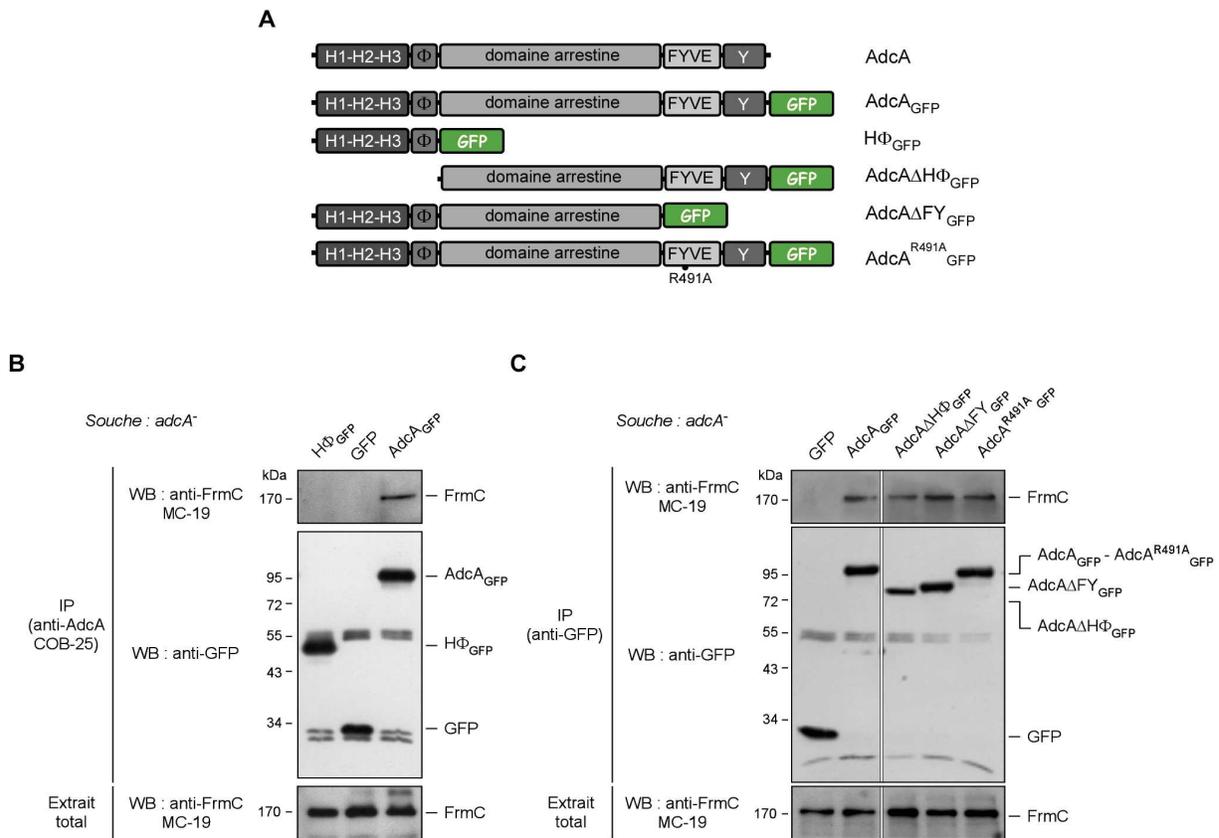
#### 1. Validation de l'interaction AdcA/FrmC

Afin de valider la protéine FrmC comme partenaire d'AdcA, des expériences de co-immunoprécipitation ont été menées sur la souche parentale KAx-3 et sur la souche *adcA* nulle utilisée comme contrôle de spécificité. Comme illustrée figure 61.A, l'immunoprécipitation d'AdcA endogène avec l'anticorps anti-AdcA COB-25 conduit à la co-immunoprécipitation de FrmC endogène dans la souche KAx-3. Par contre, en l'absence d'AdcA (souche *adcA* nulle), FrmC n'est pas retrouvée dans l'immunoprécipitat, validant la spécificité de l'interaction AdcA/FrmC. L'expérience inverse qui consiste à immunoprécipiter FrmC endogène en utilisant l'anticorps anti-FrmC MC-19 n'a pas permis de co-immunoprécipiter AdcA endogène malgré l'immunoprécipitation consécutive de FrmC (non montré). En revanche, le même type d'expériences menées sur la souche KAx-3 surexprimant FrmC<sub>GFP</sub> ou la GFP seule avec des anticorps anti-GFP permet la co-immunoprécipitation FrmC-dépendante d'AdcA (Figure 61.B). Ces résultats pourraient refléter l'inaccessibilité de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-FrmC MC-19 sur la protéine FrmC en complexe avec AdcA.

La comparaison des quantités de FrmC et d'AdcA co-immunoprécipitées par rapport à celles immunoprécipitées par les anticorps suggèrent que seule une fraction limitée de chacune d'entre elle est impliquée dans le complexe AdcA/FrmC.

#### 2. Caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction

Des formes tronquées d'AdcA et de FrmC fusionnées à la GFP ont ensuite été utilisées afin d'identifier les sous-domaines de ces protéines impliqués dans l'interaction.



**Figure 62 : Domaine(s) d'AdcA interagissant avec FrmC.**

**A. Schéma des différentes constructions d'AdcA.** Sont représentées les différentes constructions d'AdcA utilisées dans les expériences de co-immunoprécipitation. Les protéines ont été étiquetées avec la protéine GFP en C-terminal. **B. C. Co-immunoprécipitation de FrmC avec les différentes constructions d'AdcA.** Les différentes constructions d'AdcA surexprimées dans des cellules *adcA*<sup>-</sup> sont immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25 (B) ou anti-GFP (C). La co-immunoprécipitation de FrmC est analysée par Western blot avec l'anticorps anti-FrmC MC-19 après migration de l'immunoprécipitat sur gel de polyacrylamide. Les quantités de protéines immunoprécipitées et de FrmC endogène sont également contrôlées par Western blot à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti-FrmC MC-19, respectivement.

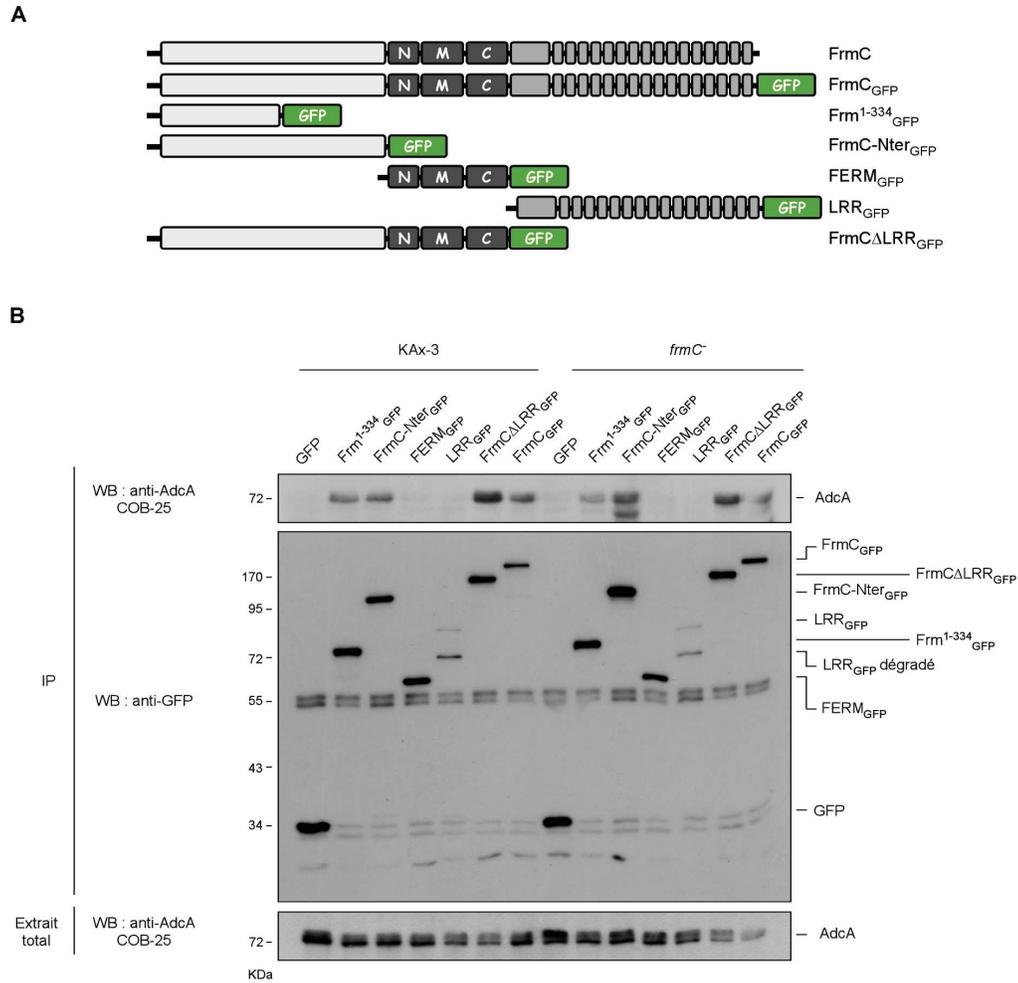
### 2.1. Domaine(s) d'AdcA impliqué(s) dans l'interaction

Diverses constructions d'AdcA, générées au laboratoire lors du travail de thèse de D. Guetta ont été exprimées dans la souche *adcA* nulle (afin d'éviter une contribution éventuelle de la protéine AdcA endogène) et immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-AdcA COB-25 ou anti-GFP : H $\phi$ <sub>GFP</sub>, (a.a. 1-156), AdcA $\Delta$ H $\phi$ <sub>GFP</sub> (a.a. 140-580) et AdcA $\Delta$ FY<sub>GFP</sub> (a.a. 1-459) (Figure 62.A). Les souches *adcA* exprimant AdcA<sub>GFP</sub> ou la GFP seule ont été utilisées comme contrôles. L'analyse de l'immunoprécipitat par Western blot à l'aide d'anticorps anti-FrmC MC-19 indique que l'ensemble des constructions permet la co-immunoprécipitation de FrmC à l'exception de la GFP seule et du domaine N-terminal d'AdcA (H $\phi$ <sub>GFP</sub>), malgré une immunoprécipitation importante du domaine (Figure 62.B. et C.). Le domaine H $\phi$  à lui seul n'est donc pas capable de médier l'interaction avec FrmC. Par ailleurs, ni le domaine H $\phi$  ni le domaine C-terminal d'AdcA contenant le domaine FYVE et l'extrémité riche en tyrosines ne sont essentiels puisqu'en leur absence, l'interaction est maintenue (Figure 62.C ; AdcA $\Delta$ H $\phi$ <sub>GFP</sub> et AdcA $\Delta$ FY<sub>GFP</sub>). L'hypothèse la plus simple est de proposer que l'interaction FrmC/AdcA soit assurée par le cœur arrestine d'AdcA. On ne peut exclure toutefois que les autres domaines contribuent à renforcer l'interaction. La construction correspondant au seul domaine arrestine d'AdcA (AdcA<sup>146-441</sup><sub>GFP</sub>) ne permet pas l'expression d'une protéine stable. Cet écueil n'a donc pas permis de tester de façon plus directe l'implication du domaine arrestine dans l'interaction avec FrmC.

Par ailleurs, alors que la protéine AdcA est majoritairement localisée sur la voie endocyttaire, la protéine AdcA $\Delta$ FY<sub>GFP</sub> est exclusivement cytosolique (Guetta et al., 2010). Les résultats indiquent que ce changement de localisation n'interfère pas avec la capacité d'AdcA à interagir avec son partenaire. En accord avec cette observation, le mutant ponctuel AdcA<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub> également cytosolique est lui aussi toujours capable de lier FrmC, suggérant que l'interaction n'est pas dépendante de la localisation endocyttaire d'AdcA.

### 2.2. Domaine(s) de FrmC impliqué(s) dans l'interaction

La même stratégie a été utilisée pour définir les domaines de FrmC impliqués dans la liaison d'AdcA. La forme tronquée du domaine N-terminal de FrmC (FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>), son domaine N-terminal entier (FrmC-Nter<sub>GFP</sub>), son domaine FERM (FERM<sub>GFP</sub>), son domaine LRR (LRR<sub>GFP</sub>) ou encore la protéine entière délétée de ce même domaine (FrmCALRR<sub>GFP</sub>) ont été exprimés dans les souches KAx3 et *frmC* nulle et testées dans des expériences d'immunoprécipitation (Figure 63). La protéine entière (FrmC<sub>GFP</sub>) et la GFP seule ont été utilisés en contrôle. Dans les deux fonds génétiques, seules les protéines FrmC<sub>GFP</sub>, FrmC-Nter<sub>GFP</sub>, FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub> et FrmCALRR<sub>GFP</sub> sont capables de co-immunoprécipiter AdcA (Figure 63). Ces résultats nous indiquent que le domaine FERM n'est pas



**Figure 63 : Domaine(s) de FrmC interagissant avec AdcA.**

**A. Schéma des différentes constructions de FrmC.** Sont représentées les différentes constructions de FrmC utilisées ci-après, portant une étiquette GFP en C-terminal. **B. Co-immunoprécipitation d'AdcA avec les différentes constructions de FrmC.** Les différentes constructions de FrmC surexprimées dans des cellules KAx-3 ou *frmC* ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-GFP. La co-immunoprécipitation d'AdcA est analysée par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AdcA COB-25 après migration de l'immunoprécipitat sur gel de polyacrylamide. Les quantités de protéines immunoprécipitées et d'AdcA endogène sont également contrôlées par Western blot avec les anticorps anti-GFP et anti-AdcA COB-25, respectivement.

essentiel à l'interaction. La construction LRR<sub>GFP</sub> étant très faiblement exprimée, l'absence de co-immunoprécipitation d'AdcA avec ce domaine nécessitera d'être validé par ailleurs. En revanche, le domaine N-terminal de FrmC (FrmC-Nter<sub>GFP</sub>) à lui seul est capable de lier AdcA et cette interaction est maintenue avec la forme tronquée du domaine FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>, restreignant la zone d'interaction à cette région de FrmC. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans des expériences de *pull-down* utilisant le domaine FrmC<sup>1-334</sup> fusionné à la GST en N-terminal (GST-FrmC<sup>1-334</sup>) et exprimé en bactéries. La protéine GST-FrmC<sup>1-334</sup> et la GST sont mises en présence d'un extrait cytosolique de cellules KAX-3 ou *adcA* surexprimant AdcA<sub>GFP</sub> ou la GFP seule, utilisée en contrôle. Comme illustré figure 64, seule la construction GST-FrmC<sup>1-334</sup> est capable d'interagir avec AdcA<sub>GFP</sub>, ce qui n'est pas observé pour la GST seule (Figure 64). Ce résultat pourrait expliquer l'incapacité de l'anticorps anti-FrmC MC-19 à immunoprécipiter le complexe FrmC/AdcA, dans l'hypothèse où l'interaction viendrait masquer l'épitope reconnu par l'anticorps.

Les expériences d'immunoprécipitation semblent indiquer également que la protéine tronquée de son domaine LRR (FrmCALRR<sub>GFP</sub>) co-immunoprécipite AdcA de façon plus efficace que le domaine N-terminal seul correspondant à la protéine tronquée des domaines LRR et FERM, malgré un niveau d'expression similaire (Figure 63). Cette observation pourrait impliquer la participation éventuelle du domaine FERM dans la liaison d'AdcA. Le domaine FERM isolé n'étant pas capable de lier la protéine, il pourrait par contre modifier la conformation du domaine N-terminal et faciliter l'accessibilité au site de liaison d'AdcA.

### 3. Conclusions

Cette partie du travail a permis de valider l'interaction AdcA/FrmC sur les protéines endogènes et de proposer un rôle du cœur arrestine d'AdcA et de la région N-terminale de FrmC dans cette interaction. Les expériences ayant été réalisées sur des extraits cellulaires totaux, elles ne permettent pas de conclure sur une interaction directe entre ces deux protéines. L'utilisation de protéines recombinantes exprimées en bactéries dans un test d'interaction directe n'a pas pu être envisagée du fait de l'insolubilité du domaine arrestine d'AdcA dans ce système d'expression. Des tests en double-hybride chez le modèle Levure pourraient permettre de contourner cette difficulté.

## IV. ÉTUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE FRMC

Afin d'approcher le rôle fonctionnel de FrmC, nous nous sommes intéressés à sa localisation subcellulaire. Comme détaillé dans la partie Introduction, l'amibe *Dictyostelium* présente un cycle de



vie dépendant de la disponibilité en nutriment dans le milieu environnant. La carence nutritive oriente l'organisme vers un programme de développement multicellulaire avec une phase d'agrégation des cellules individuelles en jeûne puis une phase de différenciation. Afin de cibler l'étude de sa localisation intracellulaire sur les conditions les plus pertinentes, nous avons tout d'abord cherché à préciser les étapes du cycle durant lesquelles la protéine FrmC est exprimée.

## 1. Expression temporelle de FrmC

Pour déclencher le programme de développement, les cellules KAx-3 végétatives ont été lavées, reprises dans un tampon phosphate dépourvu d'éléments nutritifs et étalées sur une gélose. Des extraits protéiques totaux réalisés au cours de la cinétique de développement ont été analysés par Western blot avec l'anticorps anti-FrmC RAB-20. De façon intéressante, AdcA et FrmC présentent un profil d'expression similaire. FrmC, comme AdcA, est surtout présente au stade végétatif (stade où a été détectée l'interaction AdcA/FrmC) avec une disparition des deux protéines après les premières étapes du programme de développement multicellulaire (Figure 65 ; Guetta et al., 2010). L'étude de la localisation subcellulaire de FrmC a donc été menée exclusivement sur cellules végétatives.

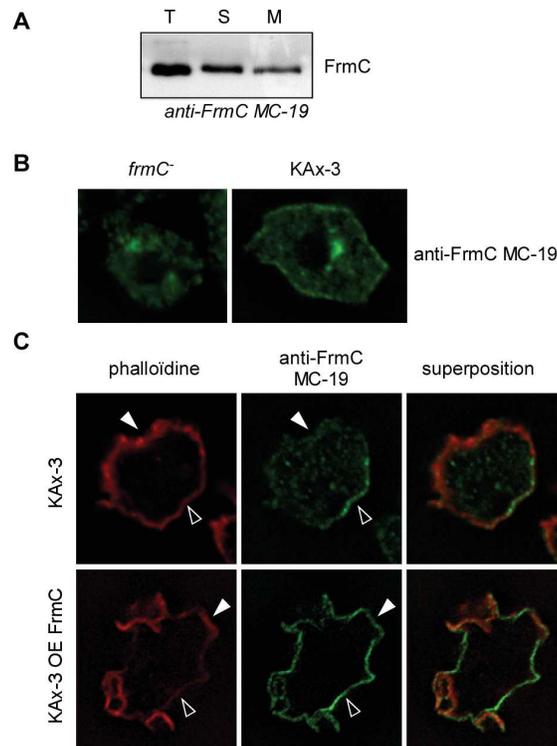
## 2. FrmC est associée à la membrane plasmique

### 2.1. Fractionnement subcellulaire

En première approche, des expériences de fractionnement subcellulaire ont été réalisées permettant de séparer la fraction soluble (cytosol) d'une fraction membranaire (membrane plasmique, vésicules, ...) d'un cassat cellulaire. Comme nous pouvons le constater sur la figure 66.A, FrmC est retrouvée dans les deux fractions, avec cependant une préférence pour la fraction cytosolique.

### 2.2. Détermination de la localisation subcellulaire de FrmC par microscopie

L'obtention des anticorps anti-FrmC MC-19 nous a permis d'étudier la localisation subcellulaire de la protéine endogène dans des approches d'immunofluorescence. Dans la souche parentale, son utilisation sur des cellules parentales KAx-3 conduit à un marquage de la zone sous-membranaire plasmique et au niveau d'un agrégat ponctiforme dans le cytosol (Figure 66.B). Le marquage ponctiforme est également retrouvé dans une souche *frmC* indiquant qu'il est non-spécifique de la protéine, contrairement au marquage au niveau de la membrane plasmique. Ce marquage est discontinu et plus ou moins intense le long du pourtour cellulaire, suggérant une distribution hétérogène de la protéine. Des résultats similaires ont été observés dans la souche KAx-3 surexprimant la protéine FrmC sans étiquette, FrmC<sub>notag</sub> (Figure 66.C). En accord avec la surexpression, le marquage



**Figure 66 : Localisation subcellulaire de FrmC.**

**A. Fractionnement subcellulaire.** Des cellules KAx-3 sont lysées en tampon HEPES et les fractions membranaires (M) et solubles (S) sont séparées par ultracentrifugation d'un surnageant post-nucléaire (fraction totale T). La répartition de FrmC dans ces fractions est analysée par Western blot avec l'anticorps anti-FrmC MC-19. **B. C Immunofluorescence.** Des cellules parentales KAx-3, *frnC<sup>-</sup>* et KAx-3 surexprimant FrmC sans étiquette (KAx-3 OE FrmC) sont laissées à adhérer 1 h 30 dans une chambre multi-puits. Après fixation/perméabilisation, la protéine FrmC est marquée à l'aide de l'anticorps anti-FrmC MC-19 (en vert) et un anticorps secondaire approprié et l'actine avec de la phalloïdine-Alexa 568 (en rouge, **B**). Les cellules sont ensuite observées sur un microscope Zeiss Axiovert 200M. Les images présentées représentent une section optique, après déconvolution sur Axiovision. Les flèches vides indiquent des zones où FrmC co-localise avec l'actine et les flèches pleines, les zones enrichies en actine et plutôt moins riches en FrmC.

est plus prononcé mais la répartition hétérogène de la protéine est maintenue. Dans cette souche, le marquage non spécifique ponctiforme apparaît moins net, possiblement du fait de l'augmentation du rapport signal spécifique/bruit mais également d'un marquage cytosolique plus fort sans doute lié à une part plus importante de la protéine dans le cytoplasme. Des résultats comparables ont été obtenus avec la protéine FrmC<sub>GFP</sub>, avec toutefois une fluorescence cytosolique plus forte que dans le cas de la protéine non étiquetée (non montré).

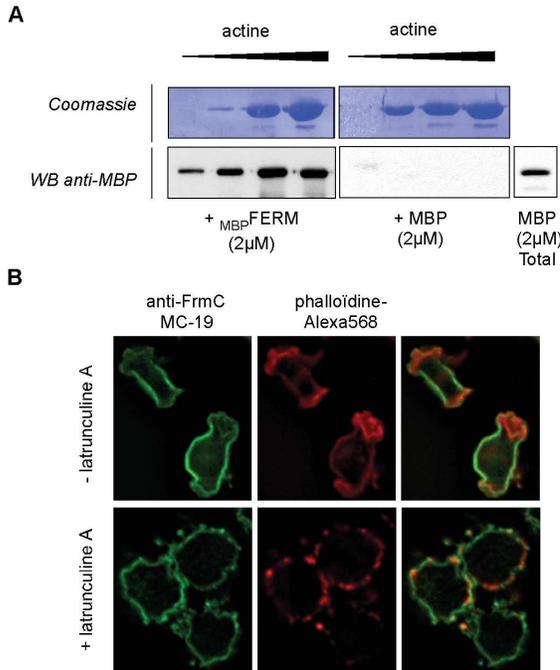
Dans la région sous-membranaire, FrmC colocalise avec l'actine corticale comme l'indique le co-marquage des cellules avec l'anticorps anti-FrmC MC-19 et la phalloïdine-Alexa 568 permettant de visualiser l'actine filamenteuse (actine-F). Dans les cellules végétatives, en plus de sa localisation corticale, l'actine-F est particulièrement enrichie au niveau des protrusions et des coupes macropinocytiques (Figure 66.C, flèches pleines). Ces zones riches en actine-F sont en revanche généralement moins riches en FrmC et inversement (Figure 66.C, flèches).

### 3. Contribution de l'actine dans la localisation de FrmC

FrmC présente différents domaines fonctionnels qui pourraient contribuer à la localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique. Les domaines FERM, en particulier, ont été décrits comme interagissant avec des protéines membranaires, certains phosphoinositides de la membrane plasmique mais aussi avec l'actine (Ardura et al., 2011; Barret et al., 2000; Bompard et al., 2003; Carvalho et al., 2010; Mahon, 2009; Moore et al., 2012; Pestonjamas et al., 1995; Reczek, 1997; Roy et al., 1997; Turunen et al., 1994; Yonemura, 1998). A lui seul, ce domaine de FrmC pourrait donc apporter plusieurs sites d'ancrage dans l'environnement de la membrane plasmique. Afin de d'identifier les acteurs responsables de sa localisation, nous avons, dans un premier temps, testé la possibilité d'une contribution de l'actine.

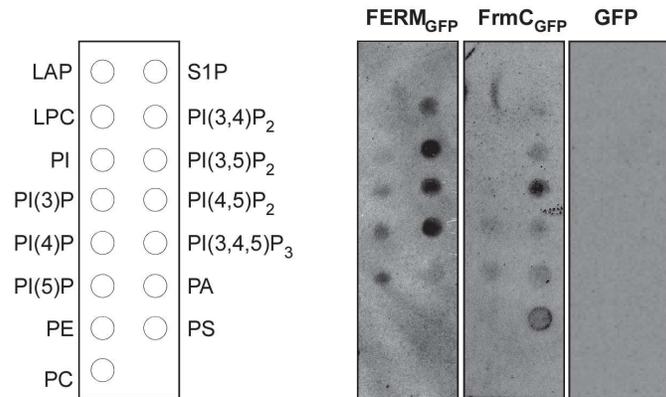
#### 3.1. Le domaine FERM de FrmC interagit avec l'actine *in vitro*

La capacité du domaine FERM de FrmC à interagir avec l'actine a d'abord été testée *in vitro*. Dans cet objectif, des expériences de co-sédimentation avec de l'actine-F purifiée de muscle de lapin ont été réalisées. Le domaine FERM de FrmC étiqueté en N-terminal avec la MBP (<sub>MBP</sub>FERM) et la MBP seule purifiées (2  $\mu$ M) ont été mises en présence de concentrations croissantes d'actine monomérique (0 à 10  $\mu$ M) dans un tampon permettant sa polymérisation en actine-F. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'actine-F est sédimentée par ultracentrifugation à 100 000 x g et la co-sédimentation de <sub>MBP</sub>FERM analysée par Western blot. Alors que la MBP seule est massivement retrouvée dans la fraction soluble, la protéine <sub>MBP</sub>FERM s'associe de façon dose-dépendante au culot



**Figure 67 : La localisation de FrmC est indépendante de l'actine-F.**

**A. FrmC interagit avec l'actine *in vitro*.** Les protéines MBP et <sup>MBP</sup>FERM sont mises en présence de quantités croissantes d'actine monomérique dans un tampon permettant sa polymérisation. La fraction de protéines recombinantes associées à l'actine-F est récupérée par ultracentrifugation et analysée par Western blot, à l'aide d'un anticorps anti-MBP. La quantité d'actine est vérifiée par marquage au bleu de Coomassie. **B. Effet de la latrunculine A sur la localisation de FrmC.** Des cellules KAx-3 surexprimant FrmC sans étiquette sont laissées à adhérer 1 h 30 et traitées avec 5  $\mu$ M de latrunculine A pendant 5 min, pour permettre la dépolymérisation des filaments d'actine. La localisation de FrmC est analysée par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps anti-FrmC MC-19. L'actine-F est marquée avec la phalloïdine-Alexa 568.



**Figure 68 : FrmC interagit avec des phosphoinositides.**

Des cytosols de cellules *frmC* surexprimant FERM<sub>GFP</sub>, FrmC<sub>GFP</sub> ou la GFP seule sont ajoutés à des membranes Echelon portant différents lipides (position indiquée panel de gauche). Après incubation, l'interaction de la GFP, FERM<sub>GFP</sub> et FrmC<sub>GFP</sub> avec les lipides est révélée par Western blot en utilisant un anticorps anti-GFP.

LAP : acide lysophosphatidique, LPC : lysophosphocholine, PI : phosphatidylinositol, PI(3)P : phosphatidylinositol-3-phosphate, PI(4)P : phosphatidylinositol-4-phosphate, PI(5)P : phosphatidylinositol-5-phosphate, PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, S1P : sphingosine-1-phosphate, PI(3,4)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-3,4-biphosphate, PI(3,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-3,5-biphosphate, PI(4,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PA : acide phosphatidique, PS : phosphatidylsérine.

d'actine-F (Figure 67.A). Le domaine FERM est donc capable d'interagir directement avec des filaments d'actine *in vitro*.

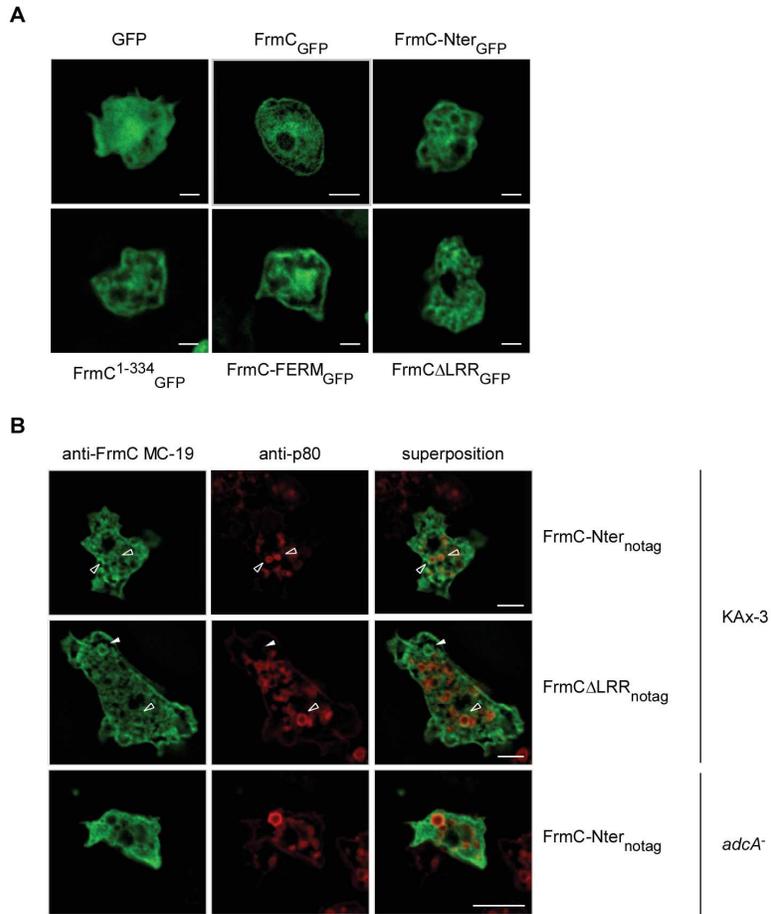
### 3.2. La localisation de FrmC est indépendante de l'actine

Afin de déterminer si la localisation membranaire de FrmC est médiée par une interaction avec l'actine, des cellules KAx-3 surexprimant FrmC<sub>notag</sub> ont été traitées avec un agent dépolymérisant du cytosquelette d'actine, la latrunculine A (5  $\mu$ M). Comme illustré figure 67.B, ce traitement conduit à un arrondissement cellulaire et une perte de l'intensité de marquage avec la phalloïdine-Alexa 568. L'actine-F restante est retrouvée sous forme de points localisés dans le cytosol ou sur le pourtour membranaire. *A contrario*, la protéine FrmC reste majoritairement localisée dans la région corticale de la cellule. Donc, malgré le fait que le domaine FERM soit capable de lier l'actine-F, ce réseau d'actine-F n'est pas responsable du recrutement de FrmC à la membrane plasmique.

## 4. FrmC interagit avec des phosphoinositides

En dehors de leurs caractéristiques de plateforme d'interaction protéine/protéine, les domaines FERM sont également décrits pour interagir avec certains lipides, notamment le PI(4,5)P<sub>2</sub> localisé à la membrane plasmique (Barret et al., 2000; Bompard et al., 2003; Carvalho et al., 2010; Moore et al., 2012). Afin de tester la capacité de FrmC et de son domaine FERM à interagir avec des phosphoinositides de la membrane plasmique, des expériences de *lipid blot overlay* ont été réalisées sur des membranes Echelon portant différents lipides dont des phosphoinositides mais également le phosphatidyléthanolamine (PE), l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC) ou encore l'acide lysophosphatidique (LPA) et la lysophosphocholine (LPC).

Ces expériences ont été effectuées avec des extraits cytosoliques de cellules *frmC* exprimant les protéines FrmC<sub>GFP</sub>, FERM<sub>GFP</sub> ou la GFP seule, utilisée comme contrôle. FrmC<sub>GFP</sub> ou FERM<sub>GFP</sub> sont capables de lier spécifiquement des phosphoinositides (Figure 68). Toutefois, la liaison ne semble pas spécifique d'un membre particulier de cette famille. En effet, le domaine FERM<sub>GFP</sub> lie plutôt les di-phosphoinositides et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. En revanche, la protéine entière FrmC<sub>GFP</sub> lie principalement le PI(4,5)P<sub>2</sub>, en accord avec la localisation membranaire plasmique de FrmC. Il est à noter que dans la protéine entière, le domaine FERM de FrmC possède des extensions à ses deux extrémités. Ceci pourrait expliquer les différences observées dans ces expériences, si les domaines N-terminal et LRR de FrmC devaient modifier la conformation de la protéine et du domaine FERM, et moduler ainsi la spécificité de reconnaissance ou l'affinité du domaine FERM pour des phosphoinositides particuliers.



**Figure 69 : Localisation des domaines de FrmC.**

**A. L'ensemble des domaines de FrmC présente une localisation comparable.** L'extrémité N-terminale (FrmC<sup>1-334</sup>), les domaines N-terminal (FrmC-N-ter) et FERM (FrmC-FERM) de FrmC et la protéine déléetée de son domaine LRR (FrmCΔLRR), fusionnés à la GFP sont surexprimés dans des cellules *frmC*. La protéine entière ainsi que le GFP seule sont également utilisées, en contrôle. La localisation des différentes constructions est visualisée par microscopie (grossissement 63x) après fixation des cellules. Les images représentent une section optique déconvoluée. Échelle = 10 μm. **B. Co-localisation de FrmC avec la voie endocytaire.** Des cellules KAx-3 ou *adcA*<sup>-</sup> surexprimant le domaine N-terminal de FrmC (FrmC-N-ter<sub>notag</sub>) ou FrmC déléetée de son domaine LRR (FrmCΔLRR<sub>notag</sub>) non étiquetées sont marquées avec les anticorps anti-p80 et anti-FrmC MC-19.

Les résultats ne permettent pas à ce stade de conclure si la liaison aux phosphoinositides est un élément clé dans le ciblage de FrmC à la membrane plasmique. Leur reconnaissance pourrait intervenir parallèlement à d'autres interactions, possiblement avec des protéines intégrales de la membrane plasmique, pour consolider le recrutement de FrmC.

## 5. Contribution des domaines de FrmC dans sa localisation

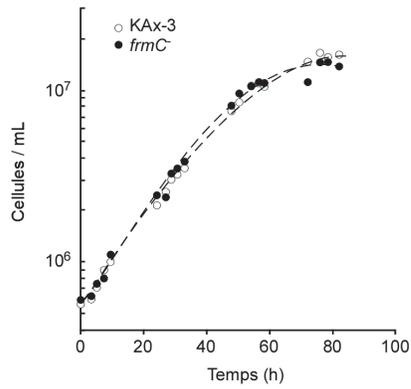
Afin d'affiner ces résultats, nous avons cherché à savoir quel(s) domaine(s) de FrmC étaient nécessaires à sa localisation membranaire. Différentes formes tronquées de FrmC étiquetées avec la GFP en C-terminal exprimées dans la souche *frmC*<sup>-</sup> ont été analysées en imagerie pour leur distribution subcellulaire : FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>, FrmC-Nter<sub>GFP</sub>, FERM<sub>GFP</sub> et FrmCALRR<sub>GFP</sub>. La construction LRR<sub>GFP</sub> n'a pas pu être exploitée du fait de son niveau d'expression très faible dans la cellule, et non détectable en microscopie.

De façon générale, les constructions testées, à l'exception de FERM<sub>GFP</sub>, présentent une distribution beaucoup plus cytosolique que la protéine entière. Toutefois, un marquage membranaire plasmique reste détectable pour l'ensemble des constructions (Figure 69.A). Le domaine FERM et le domaine N-terminal de FrmC pris isolément pourraient donc contribuer tous les deux à la localisation corticale de FrmC.

En plus de leur localisation corticale, les constructions FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>, FrmC-Nter<sub>GFP</sub> et FrmCALRR<sub>GFP</sub> sont occasionnellement présentes sur des vésicules intracellulaires, dont certaines sont positives pour le marqueur p80, un transporteur de la membrane plasmique également présent sur la voie endocytaire (Figure 69.B, flèches pleines) (Ravanel et al., 2001). Du fait de la localisation endocytaire de son partenaire AdcA, nous avons testé l'éventuelle contribution d'AdcA à cette localisation vésiculaire. D'après la figure 69.B, l'absence de la protéine ne modifie pas la distribution de FrmC-Nter<sub>notag</sub> excluant un rôle dans cette localisation.

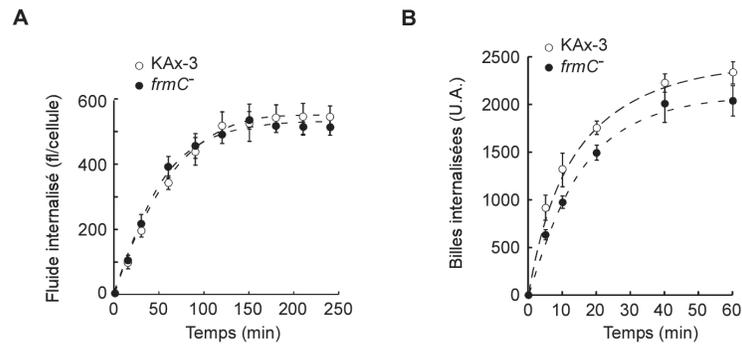
## 6. Conclusions

Cette partie du travail a permis de déterminer que FrmC se localise de façon préférentielle à la membrane plasmique et que cette localisation implique *a minima* le domaine FERM et le domaine N-terminal. Alors que la contribution du domaine FERM pourrait s'appuyer sur une double interaction à la fois lipidique (phosphoinositides) et protéique (à démontrer mais attendue de par les données sur les domaines FERM), celle du domaine N-terminal ne semble pas mettre en jeu une interaction via des lipides puisque des essais de *lipid blot overlay* menés sur la protéine recombinante <sub>MBP</sub>Nter n'ont



**Figure 70 : Croissance des cellules *frmC*.**

La croissance en milieu axénique de cellules parentales KAx-3 et des cellules invalidées pour *frmC* (*frmC*<sup>-</sup>) a été suivie au cours du temps à partir d'une culture à 2.10<sup>5</sup> cellules/ml par comptage des cellules sur un compteur de cellules Beckman Coulter.



**Figure 71 : Activité endocytaire des cellules *frmC*.**

Les activités macropinocytaire et phagocytaire des cellules *frmC* ont été évaluées par capacité à internaliser le marqueur de phase fluide FITC-dextran (A) et des billes de fluorescentes de 1  $\mu$ m, respectivement (B). L'activité endocytaire de cellules parentales KAx-3 est présentée en contrôle (A et B). La quantité de FITC-Dextran (fl) et de billes internalisées (u.a.) par les cellules ont été suivies respectivement par spectrofluorométrie ( $\lambda_{exc}$  470 nm et 520 nm) ou par FACS.

jusqu'à-là donné aucun résultat positif (non montré). La participation du domaine LRR, quant à elle, n'a pas pu être étudiée au cours de ce travail.

Par ailleurs, nous avons pu établir que le domaine FERM de FrmC est capable d'interagir avec l'actine, ouvrant la possibilité que FrmC, depuis la membrane plasmique, fonctionne comme adaptateur entre des protéines membranaires et le réseau d'actine sous-jacent.

La distribution subcellulaire de FrmC, comparée à celle d'AdcA massivement endocytaire, n'indique pas une colocalisation évidente de ces deux protéines à l'exception du cytosol. Comme mentionné précédemment, le complexe AdcA/FrmC ne semble impliquer qu'une fraction restreinte de chacune des protéines, des conditions qui pourraient être peu favorables à l'identification d'une localisation commune. A ce stade du travail, le site d'interaction entre AdcA et FrmC reste donc encore à définir.

## V. FRMC EST IMPLIQUÉE DANS LE PROCESSUS D'ADHÉSION

Afin de déterminer le rôle fonctionnel de FrmC, une analyse phénotypique approfondie du mutant *frmC* a été entreprise.

### 1. Les cellules *frmC* ne sont pas affectées dans leur croissance

Des courbes de croissance ont été réalisées sur le mutant invalidé pour *frmC* en culture liquide agitée. Comme illustré figure 70, ce mutant ne présente pas de défaut de croissance avec un temps de doublement de  $10,8 \pm 1,2$  h (n= 3) pour le clone B5 contre  $9,1 \pm 1,6$  h (n= 3) pour la souche parentale KAx-3. Des résultats comparables ont été obtenus avec le clone A3. L'absence de FrmC n'a donc pas d'effet majeur sur la croissance cellulaire en suspension.

### 2. L'activité endocytaire n'est pas altérée en l'absence de FrmC

Les cellules de *Dictyostelium* sont maintenues en culture dans du milieu axénique qu'elles internalisent par macropinocytose (voie principale d'entrée des nutriments dans ces conditions). En accord avec les résultats précédents, le mutant *frmC* ne présente pas de défaut dans l'internalisation du milieu nutritif, mesurée à l'aide du marqueur de phase fluide, le FITC-dextran (Figure 71.A). L'entrée de fluide suit une cinétique bi-phasique avec une phase linéaire d'entrée et un plateau correspondant à un équilibre dynamique entre l'entrée et la sortie de fluide. Le volume apparent de fluide internalisé à 120 min est de  $496 \pm 28$  fl/cellule (n=5) pour la souche mutante contre  $437 \pm 31$  fl/cellule (n=5) pour



la souche parentale KAx-3 et la vitesse d'internalisation est d'environ  $7,2 \pm 0,9$  fl/cellule/min (n=3) contre  $6,4 \pm 0,6$  fl/cellule/min (n=3) pour KAx-3.

Les cellules de *Dictyostelium* étant également capables de se nourrir par phagocytose, nous avons testé l'impact de l'invalidation de *frmC* sur son activité phagocytaire. Les mutants *frmC* ayant pu être clonés sur un tapis de *Klebsiella aerogenes*, il est attendu que la mutation *frmC* nulle n'ait pas un effet inhibiteur majeur sur le processus de phagocytose. Une étude plus quantitative a été réalisée par FACS à l'aide de billes de latex fluorescentes de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les cellules *frmC* sont mises en présence de ces billes et la quantité de billes internalisées par les cellules est suivie au cours du temps par mesure de fluorescence. D'après la figure 71.B, nous pouvons voir que les mutants nuls pour *frmC* ont une capacité similaire à internaliser des billes de latex comparée à la souche parentale, avec une valeur moyenne de fluorescence intracellulaire de  $2088 \pm 160$  u.a. (n=4) au bout de 60 min contre  $2304 \pm 114$  u.a. (n=4) pour la souche parentale.

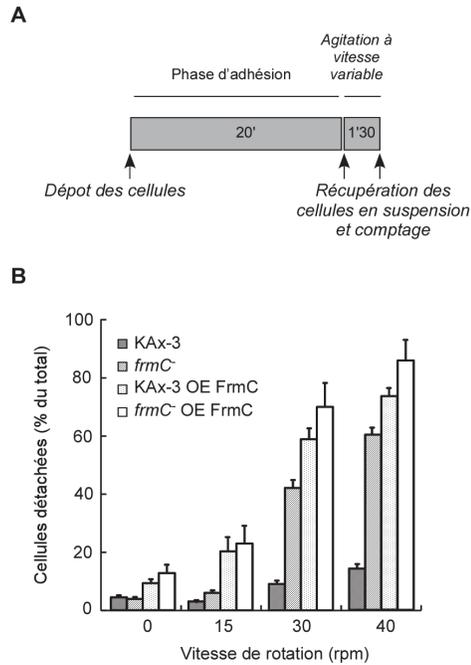
L'invalidation de *frmC* n'altère donc pas la capacité des cellules à internaliser ni de la phase fluide et ni des particules solides.

### 3. Le mutant *frmC* n'est pas affecté dans son développement

Nous avons vu que FrmC est principalement exprimée en phase végétative et dans les étapes précoces du développement multicellulaire déclenché par la carence. Elle pourrait donc jouer un rôle dans les premières étapes ou la mise en place de ce programme de développement. Le comportement de cellules parentales KAx-3 et de cellules *frmC* a été suivi après étalement des cellules sur un milieu gélosé dépourvu de nutriments. Dans ces conditions, les deux souches s'engagent dans une phase d'agrégation permettant la formation d'agrégats multicellulaires qui évoluent pour former des fructifications avec une morphologie et une cinétique comparables (non montré). FrmC ne semble donc pas être impliquée dans le processus de développement.

### 4. Les mutants de FrmC présentent un défaut d'adhésion

Plusieurs membres de la famille des protéines à domaine FERM sont impliqués dans des processus d'adhésion, en particulier les talines et les kindlines, largement décrites pour leur rôle dans l'activation des intégrines (Calderwood et al., 2013). De façon générale, ces protéines interviennent en assurant le couplage entre des protéines d'adhésion de la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. Nous avons montré que FrmC est capable d'interagir avec l'actine-F *in vitro* et se localise à la membrane plasmique suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle similaire. Nos efforts de caractérisation se sont donc ensuite focalisés sur un rôle éventuel de FrmC dans l'adhésion cellulaire.

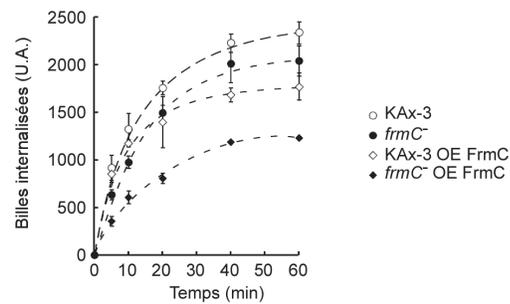


**Figure 72: Les mutants de *frmC* présentent un défaut d'adhésion.**

**A. Déroulement des expériences d'adhésion-décollement.** Les cellules sont déposées sur une boîte de Pétri et laissées à adhérer pendant 20 min. La boîte est ensuite agitée par rotation orbitale (15, 30 ou 40 rpm) ou non pendant 1 min 30 et les cellules non adhérentes sont ensuite collectées et comptées. **B.** Les cellules KAx-3, *frmC*<sup>-</sup> surexprimant FrmC sans étiquette (KAx-3 OE FrmC, *frmC*<sup>-</sup> OE FrmC) ou non sont soumises à des expériences d'adhésion-décollement. Les résultats présentés représentent une valeur moyenne d'au moins 5 expériences indépendantes (voir texte).

**Figure 73: Activité phagocytaire des mutants de surexpression de *frmC*.**

L'activité phagocytaire de cellules KAx-3, *frmC*<sup>-</sup> surexprimant FrmC sans étiquette (KAx-3 OE FrmC, *frmC*<sup>-</sup> OE FrmC) ou non est évaluée par leur capacité à internaliser de billes de latex fluorescentes de 1  $\mu\text{m}$ , suivie par FACS ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ).



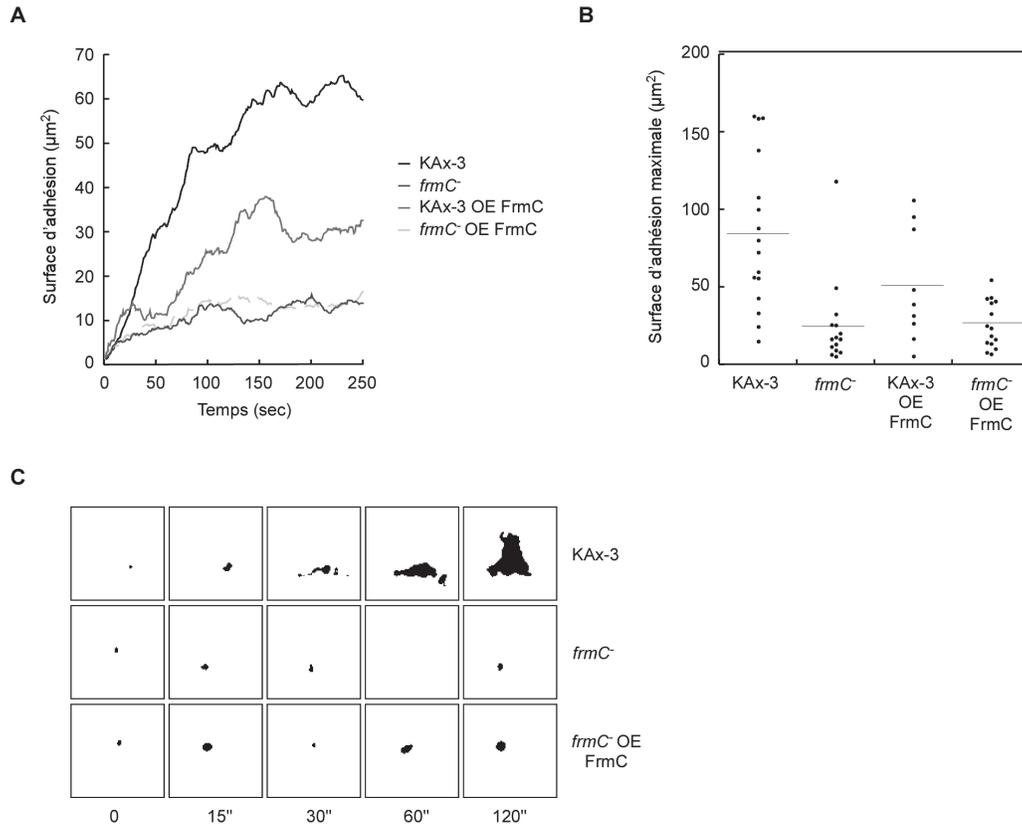
#### 4.1. Étude de la capacité d'adhésion

Afin d'évaluer la capacité d'adhésion cellule/substrat des cellules *frmC*, des tests d'adhésion/décollement ont été menés sur boîtes de Pétri (Figure 72.A). Des cellules en phase exponentielle de croissance sont reprises dans du milieu de culture frais, laissées 1 h 30 en agitation puis déposées sur boîte de Pétri plastique. Après 20 min d'adhésion, les boîtes de Pétri sont soumises à une agitation orbitale variable allant de 0 à 40 rpm pendant 1 min 30. Le surnageant est récupéré et analysé au compteur de cellules afin de quantifier le nombre de cellules décrochées par l'agitation.

Comme illustré figure 72.B, à l'issue des 20 min, environ 95 % des cellules parentales et des cellules *frmC* sont adhérentes sur le fond de la boîte de Pétri. Suite à l'agitation orbitale, alors que la majorité des cellules parentales restent adhérentes ( $14,9 \pm 1,2$  % (n=13) de cellules décrochées à la vitesse de 40 rpm), les cellules *frmC* se décrochent à hauteur de  $42,7 \pm 2,8$  % pour une vitesse de 30 rpm et de  $60,9 \pm 2,4$  % pour 40 rpm (n=7), indiquant un rôle de FrmC dans l'adhésion des cellules sur le substrat plastique. Afin de compléter ce phénotype, des cellules *frmC* ont été transformées avec une construction permettant la surexpression de FrmC non étiquetée (FrmC<sub>notag</sub>). De façon inattendue, ces cellules présentent un défaut d'adhésion plus marqué que la souche *frmC* avec  $86,6 \pm 6,9$  % de cellules décrochées à 40 rpm (n=5). Au vu de ces résultats, la souche parentale KAx-3 surexprimant FrmC<sub>notag</sub> a également été analysée. Comme nous pouvons le constater figure 72, cette souche présente également une résistance à l'agitation moindre par rapport à la souche parentale ( $74,2 \pm 2,7$  % de cellules décrochées pour 40 rpm (n=12)), suggérant un effet dominant négatif de la surexpression.

Il faut noter que les expériences portant sur les surexpresseurs sont réalisées sur une population non clonale de cellules présentant donc un niveau de surexpression hétérogène, qui pourrait expliquer l'effet différentiel de la surexpression observé dans les deux fonds génétiques KAx-3 vs *frmC*. Afin de corrélérer le niveau d'inhibition avec le niveau d'expression, les cellules ont donc été clonées. Malheureusement, malgré le clonage et en accord avec l'expérience du laboratoire et de la communauté *Dictyostelium*, une hétérogénéité d'expression est rapidement récupérée ne permettant pas de valider l'hypothèse.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus indiquent clairement que les défauts d'adhésion générés par la surexpression de FrmC sont plus importants que ceux générés par la seule invalidation de *frmC*. L'adhésion cellulaire met en jeu des voies de signalisation diverses en fonction notamment des molécules/récepteurs d'adhésion impliqués. L'hypothèse la plus simple pour expliquer cette observation est de proposer que FrmC joue un rôle dans une de ces voies de signalisation mais que la surexpression de FrmC interfère avec les autres voies de signalisation, par exemple par la titration de partenaires communs aux différentes voies.



**Figure 74 : Étude de l'adhésion précoce des mutants de *frmC* par RICM.**

**A. Mise en place de l'adhésion.** L'adhésion de cellules KAx-3 et *frmC* surexprimant (OE FrmC) ou non FrmC non étiquetée est suivie au cours du temps par vidéo-microscopie RICM après le premier contact avec le substrat à raison d'une image toutes les 6 sec pendant 300 sec. La surface d'adhésion est mesurée pour chaque temps d'acquisition après traitement des images sous Image Pro Plus. **B. Surface maximale d'adhésion.** Chaque point correspond à la surface d'adhésion maximale atteinte pour chaque cellule individuelle. La surface maximale moyenne est indiquée par une barre. **C. Surface d'adhésion des mutants à différents temps.** Des images ont été extraites des films aux temps indiqués afin d'illustrer les différences observées de surface d'adhésion occupée par les cellules KAx-3, *frmC* et *frmC* OE FrmC.

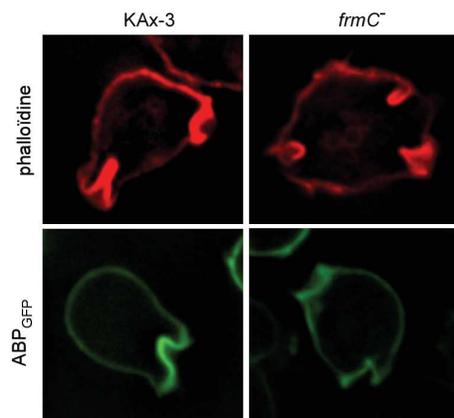
Ceci nous a amené à tester l'effet de la surexpression de FrmC sur la phagocytose. En effet, à la différence de la macropinocytose, la phagocytose fait intervenir des protéines de surface qui permettent l'adhésion de la particule à phagocyter avant internalisation. Différentes protéines d'adhésion sont mises en jeu en fonction de la nature des particules (billes de latex, bactéries, levures ...). Nous avons vu que la phagocytose de billes de latex carboxylées ne nécessite pas la protéine FrmC. En revanche, et quel que soit le fond génétique, la surexpression de FrmC provoque un défaut marqué d'internalisation des billes avec seulement  $1058 \pm 306$  u.a. de fluorescence (soit  $46 \pm 13$  % par rapport au sauvage) dans le contexte KAx-3 et  $1618 \pm 286$  u.a. de fluorescence (soit  $70 \pm 12$  % par rapport au sauvage) dans le contexte *frmC* (Figure 73). Ces résultats confortent l'hypothèse qu'une quantité trop importante de FrmC par rapport au niveau endogène pourrait interférer avec des voies de signalisation contrôlant l'adhésion cellule/substrat normalement FrmC-indépendante.

Etant donné ces résultats, il sera intéressant de tester l'effet de l'inactivation de *frmC* sur la phagocytose d'autres types de particules, telles que des billes de tailles variables, différentes bactéries ou encore des levures, afin de définir si FrmC est en fait associée spécifiquement à un type d'adhésion particulier ou si la phagocytose chez l'amibe n'implique pas d'adhésion FrmC-dépendante, quelle que soit la nature de la particule à internaliser.

#### 4.2 Étude de l'adhésion précoce par microscopie RICM

Afin de mieux comprendre le rôle de FrmC dans l'adhésion, des cellules parentales KAx-3 et *frmC* surexprimant ou non FrmC<sub>notag</sub> ont été analysées par microscopie RICM (*reflection interference contrast microscopy*). Cette technique permet de visualiser les zones de contact de la cellule avec le substrat et de suivre ainsi l'extension de la zone d'adhésion lors des étapes précoces de l'adhésion. Des cellules prélevées de boîtes de Pétri sont reprises en milieu de culture neuf et déposées sur une lame de verre. Lorsque les cellules atteignent la lame, une zone de contact apparaît en blanc puis en noir et l'évolution de l'aire de contact est suivie au cours du temps par vidéo-microscopie sur une durée de 300 secondes.

Comme illustré figure 74, la surface d'adhésion des cellules parentales augmente progressivement pour atteindre une aire maximale moyenne de  $85 \pm 12 \mu\text{m}^2$  (n=16). Cette surface atteint un plateau correspondant au stade où les cellules ont fini d'installer leurs points d'ancrage sur le substrat et commencent à se déplacer. Les cellules invalidées pour *frmC* (clone B5) présentent une cinétique d'adhésion très différente avec une évolution plus limitée de l'aire de contact qui atteint en moyenne  $25 \pm 7 \mu\text{m}^2$  (n=15) après 300 sec de contact avec le substrat. Les cellules ne semblent pas parvenir à stabiliser une zone d'adhésion, ne permettant pas leur étalement sur le substrat (Figure 74.C). Des résultats similaires ont été obtenus avec le clone *frmC* A3 (non montré).



**Figure 75 : Intégrité du cytosquelette d'actine dans le mutant *frmC*<sup>-</sup>.**

L'organisation du réseau d'actine-F dans la souche parentale KAx-3 et *frmC*<sup>-</sup> est analysée par marquage de l'actine-F avec la phalloïdine-Alexa 568 ou par expression de la protéine de liaison à l'actine ABP<sub>GFP</sub>. Les images correspondent à une section optique sur cellules vivantes non fixées.

En accord avec les résultats précédents, la surexpression de FrmC ne permet pas la complémentation du phénotype *frmC* nul et conduit à un défaut net dans la phase initiale d'étalement des cellules avec une surface d'adhésion maximale de  $50 \pm 12 \mu\text{m}^2$  (n=9) dans le contexte KAx-3 (Figure 74.A et B).

Pour conclure, les mutants de FrmC présentent un phénotype d'adhésion anormal caractérisé par des défauts dans la mise en place de zones de contact avec le substrat compatible avec un étalement cellulaire efficace et par la mise en jeu de forces globales d'interaction moindres conduisant à une résistance plus faible au décollement.

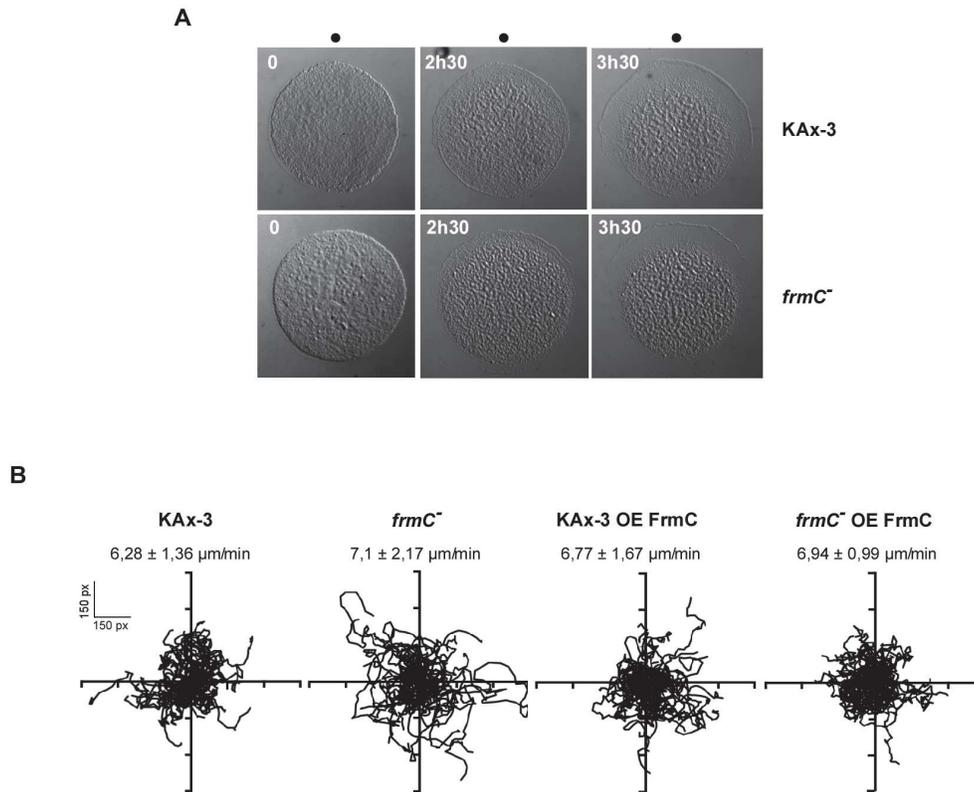
#### 4.3. Les défauts d'adhésion des mutants de *frmC* ne sont pas liés à une désorganisation du cytosquelette d'actine.

L'adhésion cellule/substrat fait intervenir de nombreux acteurs impliqués directement dans la machinerie d'adhésion (molécules d'adhésion transmembranaire, protéine d'échafaudage ou de signalisation) ou en interface avec le cytosquelette d'actine. L'intégrité du réseau d'actine est essentielle dans le processus d'adhésion cellulaire, notamment à travers son rôle dans la stabilisation des points focaux d'adhésion de la cellule sur le substrat (pour revue Ciobanasu et al., 2013). Nous avons donc vérifié l'intégrité du cytosquelette d'actine dans ce contexte mutant.

Dans les cellules *frmC* nulles, le marquage de l'actine-F avec de la phalloïdine-Alexa 568 est très comparable à celui obtenu sur des cellules parentales (Figure 75). De même, les protéines ABP<sub>GFP</sub> (*Actin Binding Protein*) qui interagit avec l'actine polymérisée et LIME $\Delta$ CC<sub>GFP</sub> qui se fixe spécifiquement sur les filaments d'actine nouvellement polymérisés présentent une distribution assez similaire à la membrane plasmique avec des zones enrichies au niveau des protrusions et des coupes phagocytiques aussi bien dans la souche parentale que dans la souche *frmC*, suggérant que l'absence de FrmC ne conduit pas une désorganisation majeure du cytosquelette (Figure 75, illustré uniquement pour ABP<sub>GFP</sub>). Ce résultat est en accord avec l'absence de défauts, pour le mutant *frmC* nul, de macropinocytose et de phagocytose des billes de latex, processus faisant intervenir le cytosquelette d'actine.

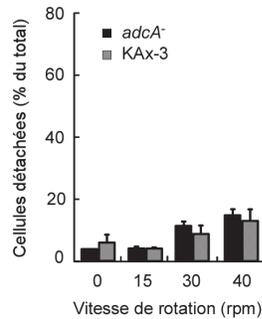
#### 4.4. *FrmC* n'est pas impliquée dans la migration cellulaire

Des défauts dans l'adhésion cellule/substrat s'accompagnent souvent d'anomalies dans la motilité cellulaire, les deux processus étant étroitement liés. Ainsi, les travaux de Fey *et al.* ont montré que l'inactivation de *sadA* conduit à une adhésion cellule/substrat très altérée qui s'accompagne d'une persistance de migration moindre et d'une vitesse de migration plus importante (Fey et al., 2002). A



**Figure 76 : Motilité des mutants *frmC* nuls.**

**A. Chimiotactisme.** Des cellules KAx-3 et *frmC*<sup>-</sup> sont déposées sur une gélose d'agar à proximité d'une gouttelette de folate (●). La migration chimiotactique des cellules vers le folate est ensuite suivie au cours du temps. **B. Motilité exploratoire.** Les cellules KAx-3, *frmC*<sup>-</sup> surexprimant ou non FrmC non taguée (OE FrmC) sont déposées en milieu HL5 sur lamelle de verre et suivies par vidéo-microscopie sur une durée de 40 minutes à raison d'une image par min. Pour chaque souche, le trajet de 45 cellules a été analysé grâce au logiciel FIJI et utilisé pour calculer une vitesse moyenne de migration.



**Figure 77 : Capacité d'adhésion des cellules *adcA*<sup>-</sup>.**

Des cellules parentales KAx-3 *adcA*<sup>-</sup> sont soumises à un test d'adhésion-décollement. Après une période d'adhésion de 20 min, les cellules sont soumises à une agitation orbitale (15, 30 ou 40 rpm) pendant 1 min 30 et les cellules décollées par l'agitation sont comptées.

l'inverse, une adhésion plus importante s'accompagne souvent d'une motilité réduite, comme par exemple chez le mutant *frmA*<sup>-</sup> de *Dictyostelium* (Patel et al., 2008).

Dans le cas des mutants de FrmC, deux types de motilité ont été abordés : la migration chimiotactique et la migration exploratoire. Ces aspects ont été étudiés au cours du stage de Master 2 de Lauriane Mas dans notre équipe. Les capacités migratoires de la souche *frmC* nulle et des surexprimeurs en réponse à un chimio-attractant ont été évaluées par un test qualitatif. Les cellules préalablement lavées en tampon phosphate sont déposées sur une gélose à proximité d'une goutte de chimio-attractant, l'acide folique. Le déplacement des cellules vers l'acide folique est suivi à la loupe binoculaire. Comme illustré sur la figure 76.A, les cellules *frmC* nulles et les cellules surexprimant FrmC se déplacent en direction du chimio-attractant de façon comparable à la souche parentale.

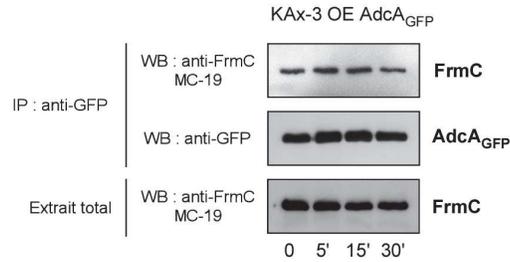
La motilité exploratoire a fait l'objet d'une analyse plus quantitative. Le déplacement des cellules a été suivi par vidéo-microscopie et le trajet et la distance parcourus par les cellules, sur une durée de 30 min, ont été extraits à l'aide du logiciel Fiji et analysés pour environ 40 cellules (Figure 76.B). Les mutations ne semblent pas modifier ni le déplacement aléatoire des cellules (surface couverte) ni la vitesse de migration de façon significative.

Contrairement à ce qui a été observé pour les mutants *sadA*, l'adhésion moindre des mutants de *frmC* ne s'accompagnent donc pas d'une motilité accrue des cellules.

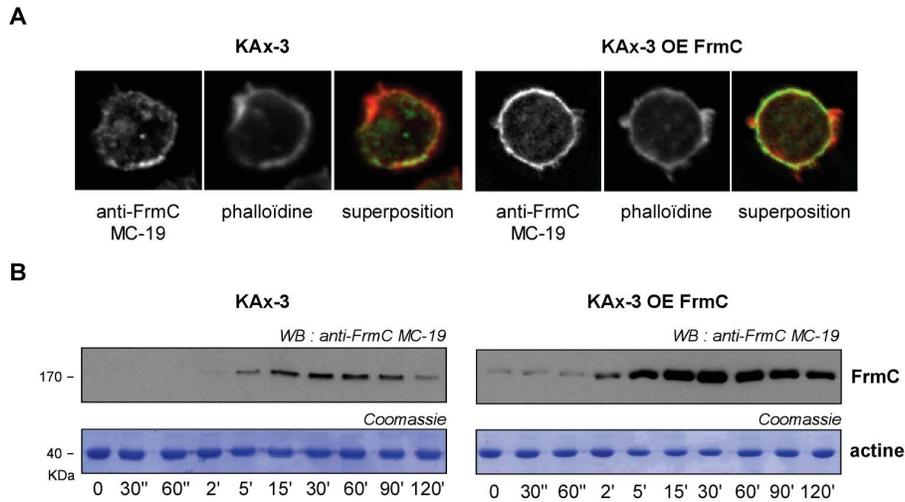
#### 4.5. La protéine AdcA ne participe pas directement à l'adhésion cellulaire

FrmC étant un partenaire d'AdcA, nous avons testé un rôle éventuel de cette protéine dans l'adhésion. Le comportement des cellules *adcA*<sup>-</sup> ont été analysées dans des expériences d'adhésion/décollement sur boîte de Pétri afin d'évaluer leur capacité d'adhésion. D'après la figure 77, nous remarquons que les cellules *adcA*<sup>-</sup> sont capables d'adhérer sur un substrat plastique, comme des cellules parentales K-Ax3, avec seulement 4 % environ de cellules non adhérentes après une période d'adhésion sans agitation de 20 min. L'application de l'agitation orbitale provoque un décollement des cellules *adcA*<sup>-</sup> à hauteur de  $15,8 \pm 2,1$  % pour une vitesse de 40 rpm (valeur comparable avec la souche parentale K-Ax3), nous indiquant que la délétion d'*adcA* n'affecte pas la force d'adhésion des cellules.

Stress : 200 mM sorbitol



**Figure 78 : L'interaction AdcA/FrmC est maintenue en stress hyper-osmotique.** Des cellules KAx-3 surexprimant AdcA<sub>GFP</sub> sont soumises à un stress de 200 mM sorbitol. A t0', t5', t15' et t30' min post-choc, AdcA<sub>GFP</sub> est immunoprécipité et la co-immunoprécipitation de FrmC endogène est vérifiée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-FrmC MC-19. Les quantités d'AdcA<sub>GFP</sub> immunoprécipitée et de FrmC endogène sont contrôlées pour chaque temps de cinétique, par Western blot à l'aide des anticorps anti-GFP et anti-FrmC MC-19, respectivement.



**Figure 79 : Localisation de FrmC en condition de stress hyper-osmotique.**  
**A. FrmC est largement maintenue à la membrane plasmique.** La localisation subcellulaire de FrmC en réponse à un stress de 200 mM sorbitol est analysée par immunofluorescence sur des cellules KAx-3 surexprimant ou non FrmC sans étiquette (KAx-3 OE FrmC) à l'aide de l'anticorps anti-FrmC MC-19. L'actine a été marquée à l'aide de phalloïdine-Alexa 568.  
**B. FrmC transloque en partie sur la fraction Triton X-100 insoluble.** Après application d'un stress de 200 mM sorbitol, des cellules KAx-3 et KAx-3 OE FrmC sont prélevées au cours du temps et la fraction Triton X-100 insoluble récupérée par centrifugation. La présence de FrmC dans cette fraction enrichie en F-actine est analysée par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-FrmC MC-19.

## VI. FRMC ET LA RÉPONSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence qu'AdcA répond à des conditions de stress diverses dont le stress hyper-osmotique. Nous avons donc examiné le comportement de FrmC dans ces conditions de stress et investigué un rôle éventuel en connexion avec AdcA.

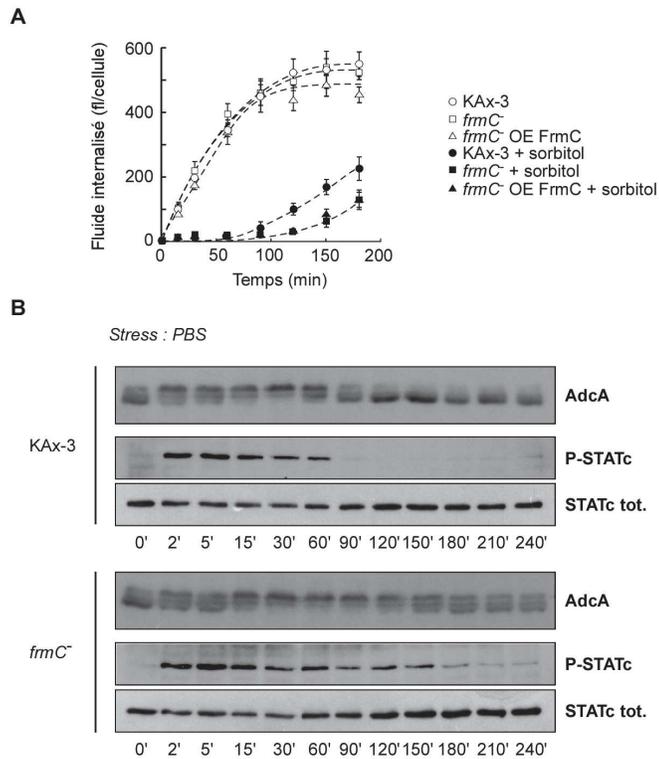
### 1. L'interaction entre AdcA et FrmC est maintenue en stress hyper-osmotique

L'interaction AdcA/FrmC a été établie dans des cellules végétatives placées dans des conditions de croissance optimale. Nous avons vu que l'hyper-osmolarité conduit à une phosphorylation d'AdcA, susceptible de modifier son fonctionnement. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à savoir si l'interaction AdcA/FrmC était maintenue dans ces conditions.

Des cellules parentales surexprimant AdcA<sub>GFP</sub> ont été soumises à un stress de 200 mM sorbitol pendant 30 min. La protéine AdcA<sub>GFP</sub> a ensuite été immunoprécipitée avec l'anticorps anti-GFP et la co-immunoprécipitation de FrmC endogène suivie par Western Blot au cours du temps avec l'anticorps anti-FrmC MC-19. Les résultats de la figure 78 illustrent que l'interaction entre AdcA et FrmC est maintenue en stress hyper-osmotique. En accord avec ces résultats, l'utilisation des formes mutées AdcA<sup>S70A/S77A</sup> ou AdcA<sup>S70D/S77D</sup> n'affectent pas non plus la capacité d'AdcA à interagir avec FrmC (non montré).

### 2. FrmC répond au stress hyper-osmotique par translocation dans la fraction Triton X-100 insoluble

Nous avons ensuite cherché à savoir si le stress hyper-osmotique pouvait conduire à une modification de la localisation subcellulaire de FrmC. Malgré les changements morphologiques majeurs occasionnés par l'hyper-osmolarité, FrmC est maintenue à la membrane plasmique où elle est retrouvée en co-localisation partielle avec l'actine-F (Figure 79.A). En revanche, une fraction de FrmC est transloquée transitoirement sur la fraction Triton X-100 insoluble qui contient une large part d'actine polymérisée. Des cellules parentales surexprimant ou non la protéine FrmC (FrmC<sub>notag</sub>) ont été soumises à un choc de 200 mM sorbitol et la fraction Triton X-100 insoluble a été extraite à différents temps de cinétique. Comme illustré sur la figure 79.B, l'application du stress provoque une association transitoire de FrmC endogène à cette fraction dès 5 minutes post-choc qui atteint un maximum entre 30 et 60 minutes, avant de disparaître progressivement. Cette translocation présente une cinétique très proche de la cinétique de phosphorylation d'AdcA. Une même cinétique est observée dans le surexprimeur, à la différence que FrmC<sub>notag</sub> est déjà légèrement associée à la fraction Triton X-100



**Figure 80 : FrmC participe à la récupération cellulaire suite à un stress hyper-osmotique.**

**A. L'invalidation de *frmC* ralentit la reprise d'activité endocytaire.** Des cellules KAx-3, *frmC* et *frmC* surexprimant FrmC sans étiquette (*frmC* OE FrmC) sont stressées par l'ajout de sorbitol (200 mM final). L'activité macropinocytaire des cellules est suivie au cours du temps par mesure de la quantité de marqueur de phase fluide FITC-dextran internalisé, par spectrofluorimétrie ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ). La quantité de fluide internalisé est exprimée en fl/cellule. **B. L'absence de FrmC modifie les réponses d'AdcA et de STATc.** Les cinétiques de phosphorylation-déphosphorylation d'AdcA et de STATc dans des cellules KAx-3 et *frmC* soumises à un stress hyper-osmotique sont analysées par Western blot à l'aide des anticorps anti-AdcA COB-25 et anti-phospho-STATc (CP22), respectivement. La quantité totale de STATc est vérifiée à l'aide de l'anticorps anti-STATc total (7H3).

insoluble avant l'application du choc. Un tel comportement a été observé pour d'autres protéines comme l'hisactophiline ou la SAPK, mais contrairement à FrmC, ces protéines sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette (Pintsch et al., 2002; Sun et al., 2003). L'enrichissement de FrmC dans la fraction Triton X-100 insoluble pourrait plutôt refléter un changement dans la dynamique de liaison de FrmC avec le cytosquelette d'actine du fait de la restructuration du réseau d'actine.

### 3. FrmC participe à la réponse cellulaire en situation de stress hyper-osmotique

#### 3.1. L'invalidation de *frmC* ralentit la récupération cellulaire

La translocation de FrmC sur la fraction Triton X-100 nous a amenés à rechercher un rôle de FrmC dans la résistance des cellules au stress. Des tests de repousse cellulaire sur un tapis bactérien de *Klebsiella* après un stress osmotique de 200 mM indiquent un taux de survie similaire pour le mutant *frmC* nul et la souche parentale excluant une sensibilité exacerbée des cellules *frmC* à l'hyperosmoticité (non montré).

Par contre, le suivi de la réponse cellulaire après un stress à 200 mOsm par mesure de l'activité macropinocytaire a permis de mettre en évidence une récupération plus lente des cellules invalidées pour *frmC*. En l'absence de stress, nous avons établi que le mutant *frmC* nul présente une activité endocyttaire de phase fluide comparable à celle du parent (Figures 71). En condition de stress hyper-osmotique, en revanche, alors que les cellules parentales récupèrent leur capacité d'internalisation vers 60-90 min avec un volume de fluide endocyté de  $170 \pm 24$  à t150' (n=3), les cellules *frmC* présentent un délai dans cette récupération avec un volume de fluide internalisé 150 min post-stress de  $63 \pm 18$  fl/cellule (n=3) (Figure 80.A). Les cellules *frmC* surexprimant FrmC présentent un même type de défaut avec  $86 \pm 16$  fl/cellule à t150' (n=3), confirmant l'effet dominant négatif de la surexpression de FrmC, déjà observé sur l'adhésion.

La protéine FrmC intervient donc dans la phase de récupération cellulaire en condition de stress hyper-osmotique.

#### 3.2. L'absence de *FrmC* modifie les réponses d'*AdcA* et de *STATc*

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que les réponses d'*AdcA* et de *STATc* corrèlent cinétiquement avec l'adaptation cellulaire. Le phénotype de récupération cellulaire observé dans des cellules *frmC* nous a donc amenés à tester leurs réponses respectives dans ce contexte mutant. L'utilisation du protocole classique décrit dans la Partie 1 (paragraphe I.1) n'a pas permis de mettre en évidence de façon reproductible un effet sur la cinétique de phosphorylation/déphosphorylation de ces deux protéines. Par contre, l'utilisation d'un autre protocole



légèrement différent par les concentrations cellulaires et le mode d'agitation utilisés a permis de mettre en évidence un net délai dans la phase de déphosphorylation de AdcA mais aussi de STATc (Figure 80.B). Dans ce protocole, les cellules sont remises en suspension à une concentration 5 fois plus élevée ( $5.10^7$  cellules/ml) et sont agitées en microtube sur une roue plutôt qu'en erlen. L'application d'un stress de 170 mOsm par reprise des cellules en PBS conduit à la phosphorylation d'AdcA avec une cinétique très comparable à celle observée avec le protocole classique (Figures 80.B et 28). De façon intéressante, dans ces mêmes conditions, l'absence de FrmC conduit à un maintien de la forme phosphorylée d'AdcA, toujours visible même après 240 min de stress. Ce retard, spécifique de l'inactivation de *frmC*, est également observé pour la réponse de STATc qui reste aussi plus longtemps phosphorylée (jusqu'à 180 min). Ainsi, en accord avec les résultats précédents, l'absence de FrmC semble interférer avec la réponse cellulaire face au stress hyper-osmotique, qui se répercute sur l'état de phosphorylation d'AdcA et du facteur de transcription STATc, de façon plus ou moins prononcée selon les conditions de test utilisées.

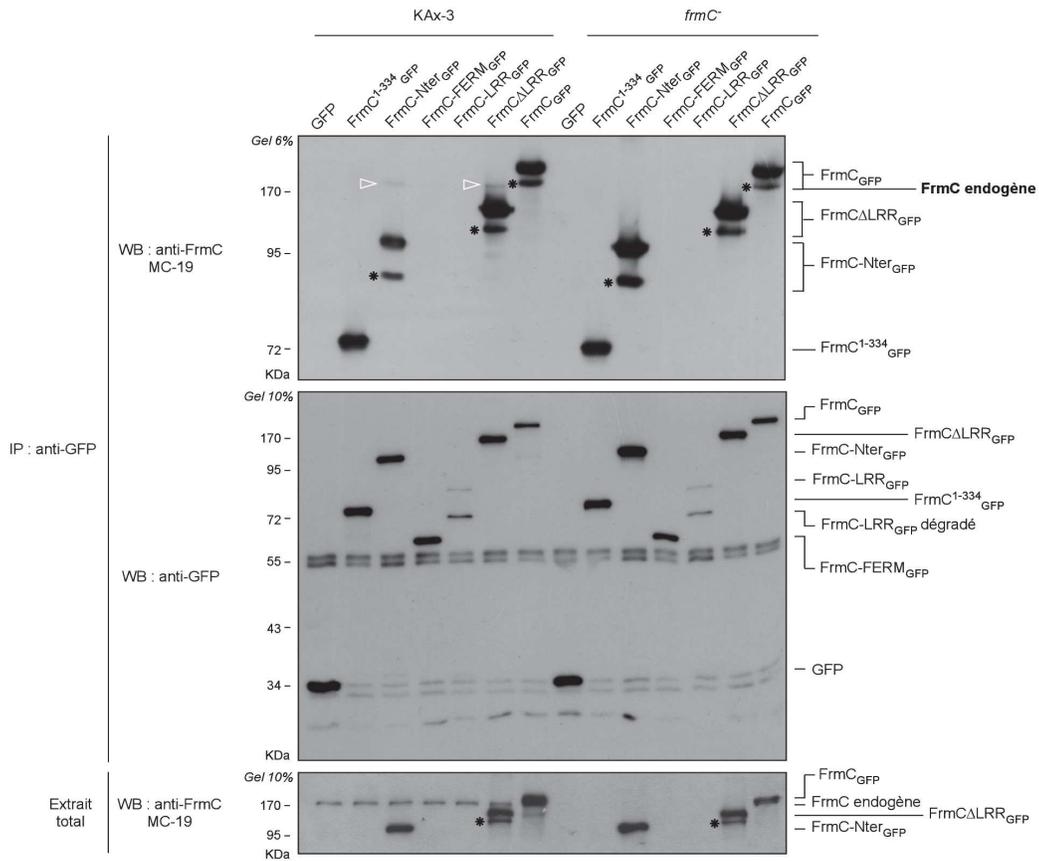
Les raisons de ces différences de résultats obtenus avec les deux protocoles sont encore inconnues. Le protocole de test classique semble générer des conditions dans lesquelles la cellule peut s'affranchir plus facilement de l'absence de FrmC que dans le second protocole qui semble exacerber la mise en jeu d'une voie de régulation FrmC-dépendante.

## VII. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE LA PROTÉINE FRMC

Dans l'objectif d'intégrer FrmC dans un contexte de signalisation plus étoffé, une recherche de partenaires a été entreprise. Les expériences d'immunoprécipitation menées sur la protéine FrmC<sub>GFP</sub> ou des versions tronquées de la protéine au cours de l'étude de l'interaction FrmC/AdcA ont révélé la présence de FrmC endogène dans l'immunoprécipitat. Ce point a donc fait l'objet d'une étude plus détaillée afin de préciser une éventuelle capacité de FrmC à former des oligomères. Parallèlement, des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur les immunoprécipitats afin d'identifier d'autres partenaires putatifs. Par ailleurs, le phénotype d'adhésion des cellules *frmC* nous a poussés à tester son éventuelle interaction avec certaines protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion.

### 1. FrmC est capable de former des oligomères

Les constructions des différentes formes tronquées de FrmC fusionnées à la GFP ont été utilisées dans des expériences de co-immunoprécipitation. FrmC<sub>GFP</sub>, FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>, FrmC-Nter<sub>GFP</sub>, FERM<sub>GFP</sub>,



**Figure 81 : FrmC forme des oligomères.**

Les constructions FrmC<sup>1-334</sup><sub>GFP</sub>, FrmC-Nter<sub>GFP</sub>, FrmC-FERM<sub>GFP</sub>, FrmC-LRR<sub>GFP</sub>, FrmC-LRR<sub>GFP</sub>, FrmC<sub>GFP</sub> ou la GFP seule exprimées dans des cellules parentales KAx-3 sont immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps anti-GFP. La présence de FrmC endogène dans l'immunoprécipitat est vérifiée par Western blot utilisant l'anticorps anti-FrmC MC-19 (flèches blanches). La même expérience est réalisée dans des cellules *frmC*<sup>-</sup> en contrôle afin de vérifier la spécificité des bandes reconnues par l'anticorps anti-FrmC. Les astérisques indiquent les produits de dégradation des constructions FrmC-Nter<sub>GFP</sub>, FrmC-LRR<sub>GFP</sub> et FrmC<sub>GFP</sub>.

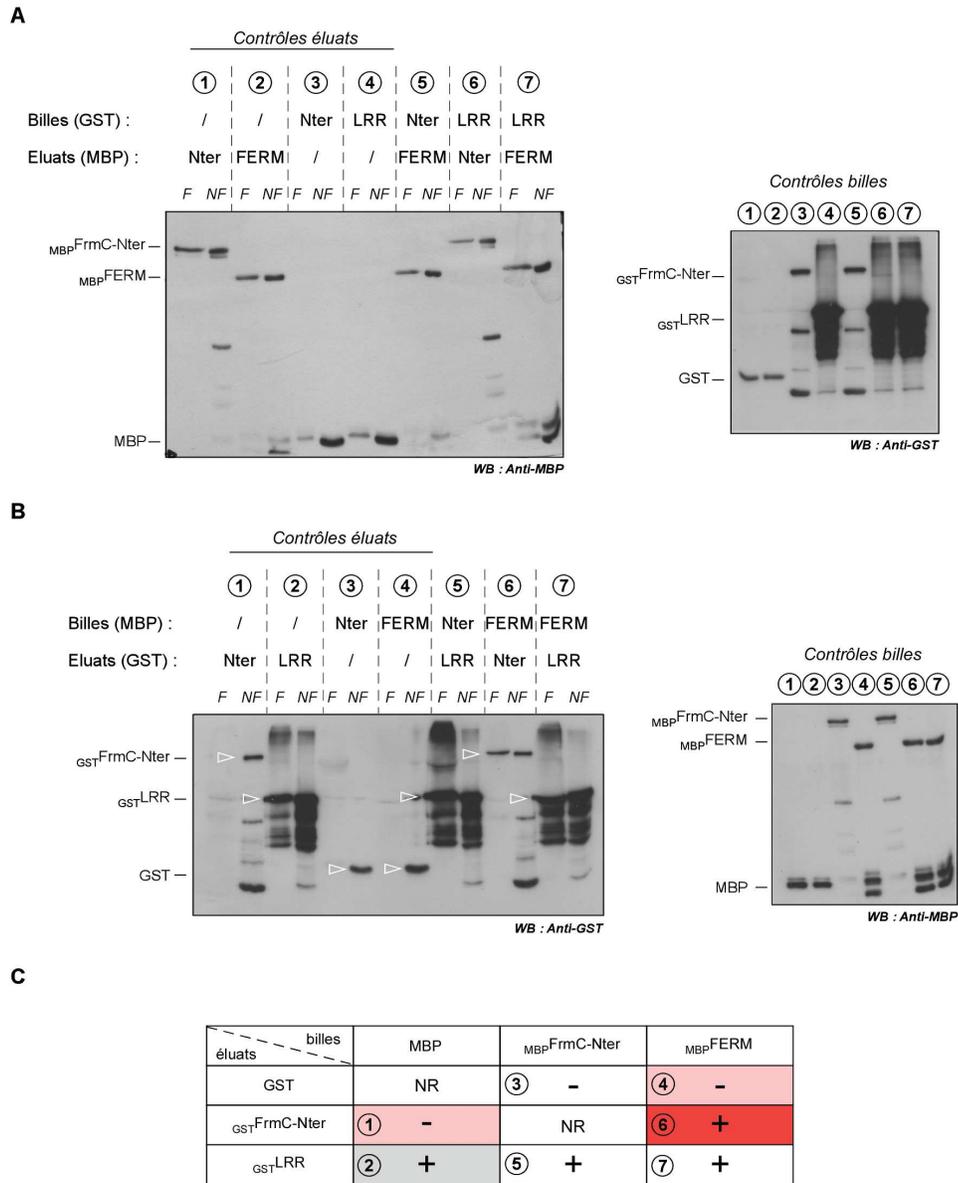
LRR<sub>GFP</sub> malgré son faible niveau d'expression, FrmCALRR<sub>GFP</sub> et la GFP seule, utilisée en contrôle, exprimées dans des cellules parentales KAx-3 ou *frmC* ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP et la co-immunoprécipitation de FrmC endogène a été analysée par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-FrmC MC-19.

Les résultats sont illustrés sur la figure 81 et montrent que, contrairement aux domaines FERM, FrmC<sup>1-334</sup> et LRR, le domaine N-terminal de FrmC (FrmC-Nter<sub>GFP</sub>) et FrmC déléetée de son domaine LRR (FrmCALRR<sub>GFP</sub>) sont capables de co-immunoprécipiter FrmC endogène (Figure 81, flèches). Par ailleurs, la comparaison des blots révélés soit avec l'anticorps anti-GFP soit avec l'anticorps anti-FrmC MC-19 identique la présence de produits de dégradation pour les constructions FrmC<sub>GFP</sub>, FrmCALRR<sub>GFP</sub> et FrmC-Nter<sub>GFP</sub> surexprimées, bien que non-reconnus par l'anti-GFP sans doute du fait d'une dégradation C-terminale et donc non-immunoprécipitable (Figure 81, astérisques).

Ces observations nous amènent donc à proposer que FrmC soit capable d'homo-oligomériser, possiblement à travers son domaine N-terminal. Plusieurs membres de la famille des protéines à domaine FERM faisant l'objet d'une auto-régulation par des interactions intramoléculaires entre les sous-domaines des protéines (Ellis et al., 2013; Goksoy et al., 2008; Goult et al., 2009; Lietha et al., 2007; Pufall and Graves, 2002; Song et al., 2012; Tepass, 2009), nous avons également entrepris des expériences de *pull-down* utilisant les différents domaines de FrmC purifiés pour tester l'existence d'une régulation similaire dans le cas de FrmC. .

Chacun des sous-domaines de FrmC fusionnés en N-terminal avec la GST ou la MBP a été exprimé dans *E. coli* à 21°C sur la nuit. Ces conditions ont permis l'expression des protéines recombinantes sous une forme soluble à l'exception de <sub>GST</sub>FERM et <sub>MBP</sub>LRR, qui n'ont pas pu être obtenues même en modifiant les conditions d'induction. Les différentes protéines ont été purifiées sur une colonne de glutathion-Sepharose pour les protéines fusionnées avec la GST ou sur une colonne d'amylose pour celles fusionnées avec la MBP puis éluées ou maintenues sur les billes. Les protéines MBP, <sub>MBP</sub>FrmC-Nter et <sub>MBP</sub>FERM fixées sur les billes ont été mises en présence de GST, <sub>GST</sub>FrmC-Nter et <sub>GST</sub>LRR éluées et inversement, et l'interaction entre les différents domaines a été analysée par Western blot en utilisant des anticorps anti-GST ou anti-MBP. Une fraction des protéines non fixées après les tests d'interaction est prélevée en contrôle.

Les résultats de cette expérience préliminaire sont illustrés figure 82. Plusieurs difficultés ont été rencontrées : 1) dans nos conditions expérimentales, les billes de glutathion-Sepharose lient la MBP seule puisque l'ensemble des protéines recombinantes fusionnées à la GST fixées sur billes co-purifient toutes les protéines fusionnées à la MBP, MBP seule incluse (Figure 82.A). De ce fait, nous n'avons pas pu conclure sur les expériences utilisant les protéines étiquetées avec la GST fixées sur les billes et les éluats de protéines étiquetées avec la MBP ; 2) les préparations de protéines purifiées



**Figure 82 : Interaction intramolécule de FrmC.**

Les constructions MBP, MBP<sup>FrmC-Nter</sup>, MBP<sup>FERM</sup>, GST, GST<sup>FrmC-Nter</sup> et GST<sup>LRR</sup> ont été exprimées en bactéries et purifiées sur colonne d'amylose (pour les protéines étiquetées avec la MBP) ou de glutathion-Sepharose (pour les protéines étiquetées avec la GST). Pour chaque construction, une fraction des protéines purifiées est maintenue sur billes et l'autre est éluée. La MBP, MBP<sup>FrmC-Nter</sup> et MBP<sup>FERM</sup> éluées sont mises en présence des billes fixées avec la GST, GST<sup>FrmC-Nter</sup> et GST<sup>LRR</sup> (A) et inversement (B). Les protéines fixées sur les billes (F) ou restées dans la fraction soluble (NF) sont analysées par Western blot utilisant les anticorps anti-MBP ou anti-GST. La quantité de protéines fixées sur les billes est également vérifiée par Western blot pour chacun des essais (de 1 à 7, panneaux de droite A et B). Les résultats de l'expérience décrite en B sont récapitulés en C (+ = interaction, - = pas d'interaction, NR = non réalisé). En B, les protéines d'intérêt sont indiquées avec des flèches blanches.

éluées présentent de nombreux produits de dégradations malgré la présence d'inhibiteurs de protéases ( $_{GST}Nter$  et  $_{GST}LRR$ , figure 82.B, essais n°1, 2, 5, 6 et 7) : les protéines d'intérêts ont donc été indiquées avec des flèches blanches sur la figure 30.B afin de simplifier sa compréhension ; 3) la protéine  $_{GST}LRR$  en solution interagit avec la MBP seule fixée sur les billes d'amylose ne nous permettant pas d'exploiter les résultats des expériences utilisant cette protéine recombinante (Figure 82.B, essai n°2, et C.).

Par contre, les tests menés sur le domaine  $_{MBP}FERM$  fixé sur les billes et le domaine  $_{GST}FrmC-Nter$  élué ont révélé que la protéine  $_{GST}FrmC-Nter$  interagit avec  $_{MBP}FERM$  (Figure 82.B, essai n°6) dans des conditions où la MBP seule ne permet pas le *pull-down* de ce même domaine (Figure 82.B, essai n°1) et que la GST seule ne lie pas le domaine FERM (Figure 82.B, essai n°4). Le domaine N-terminal de FrmC est donc capable d'interagir avec le domaine FERM *in vitro*. En revanche, des essais préliminaires visant à tester une interaction intermoléculaire via le domaine N-terminal de chaque protéine (combinaison  $_{GST}FrmC-Nter$  soluble /  $_{MBP}FrmC-Nter$  immobilisée) n'ont pas permis de conclure sur cette hypothèse.

Ces expériences préliminaires nous indiquent que le domaine N-terminal semble donc capable d'interagir avec le domaine FERM *in vitro*. Ce même domaine, contrairement au domaine FERM, est capable d'interagir avec la protéine FrmC entière. Ces observations pourraient s'expliquer par une double régulation de la protéine FrmC via des interactions intermoléculaires (oligomérisation) et des interactions intramoléculaires (repliement), toutes deux impliquant le domaine N-terminal de la protéine.

## 2. Recherche de nouveaux partenaires de FrmC

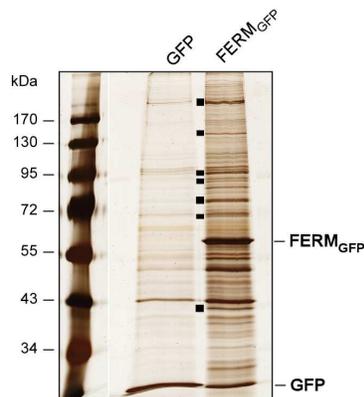
### 2.1. FrmC n'interagit pas avec les protéines d'adhésion SibA, SibB et SibC

Les résultats précédents ont permis d'établir que la protéine FrmC joue un rôle dans les mécanismes d'adhésion cellule/substrat. Du fait de la présence du domaine FERM et de l'absence de défaut majeur du cytosquelette d'actine, il nous a semblé pertinent d'envisager que FrmC puisse fonctionner comme régulateur de protéines d'adhésion de la membrane plasmique. Chez *Dictyostelium*, seules quelques protéines membranaires ont été décrites dans la littérature pour leur rôle dans le processus d'adhésion, notamment les protéine à 9 passages transmembranaires SadA et Phg1A ou encore les protéines intégrines  $\beta$ -like Sib (Cornillon et al., 2008; Fey et al., 2002; Kowal and Chisholm, 2011). Les intégrines sont des récepteurs membranaires hétérodimériques (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ ) qui jouent un rôle clé dans l'adhésion cellulaire et la motilité. Le domaine extracellulaire ( $\alpha/\beta$ ) assure la liaison avec la matrice extracellulaire et la partie cytosolique de la chaîne  $\beta$  est connectée à des protéines du réseau d'actine comme l' $\alpha$ -actinine et la taline ou à des protéines de signalisation

Constructions	Activité $\beta$ -galactosidase (U.A.)
pEG203/SibA + pJG4.6 vide	9
pEG203/SibA + pJG4.6/FrmC-FERM	22
pEG203/SibA + pJG4.6/TalA-FERM	1332
pEG203/SibB + pJG4.6 vide	3
pEG203/SibB + pJG4.6/FrmC-FERM	27
pEG203/SibB + pJG4.6/TalA-FERM	64
pEG203/SibC + pJG4.6 vide	14
pEG203/SibC + pJG4.6/FrmC-FERM	23
pEG203/SibC + pJG4.6/TalA-FERM	524
pEG203 vide + pJG4.6/FrmC-FERM	2
pEG203 vide + pJG4.6/TalA-FERM	1

**Tableau 4 : Le domaine FERM de FrmC n'interagit pas la queue cytosolique des protéines SibA, B et C dans des expériences de double hybride.**

Les domaines FERM de FrmC et de la Taline A (utilisé comme contrôle positif) ont été exprimés chez *S. cerevisiae* et testés par double-hybride pour leur capacité d'interaction avec le domaine C-terminal cytoplasmique des protéines SibA, B et C. L'interaction est mise en évidence par mesure de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase utilisée comme rapporteur (exprimée en unités arbitraires).



**Figure 83 : Co-immunoprécipitation de FERM<sub>GFP</sub>.**

Le domaine FERM<sub>GFP</sub> ou la GFP seule exprimés dans des cellules *frmC* sont immunoprécipités à l'aide du kit GFP-Trap. Les protéines présentes dans l'immunoprécipitat (IP) sont séparées sur gel de polyacrylamide 12% et révélées par coloration du gel à l'argent. Les bandes présentes dans l'IP FERM<sub>GFP</sub> et absentes dans l'IP GFP sont découpées pour analyse par spectrométrie de masse (astérisques).

comme la FAK. Les intégrines sont activées par un changement de conformation induit notamment par la liaison de protéines régulatrices comme la taline ou les kindlines (pour revues Margadant et al., 2011; Ye et al., 2014).

Les protéines Sib (A à E) de *Dictyostelium* partagent des similarités structurales et fonctionnelles avec la chaîne  $\beta$  des intégrines de Mammifères, notamment un court segment cytosolique portant deux sites NPXY, qui sont reconnus par le domaine FERM de la taline A de *Dictyostelium* (Cornillon et al., 2006). Les travaux de l'équipe de P. Cosson ont montré que ces protéines Sib présentent des profils d'expression distincts et variables en fonction du cycle de développement cellulaire. Ainsi, l'entrée en développement conduit à une chute des niveaux d'ARNm de SibA et C et une augmentation pour SibB et E. L'inactivation génique de *sibA* et/ou *sibC* conduit à une perte d'adhésion des cellules végétatives sur certains substrats, apportant une preuve fonctionnelle de leur rôle comme molécules d'adhésion (Cornillon et al., 2008).

Afin de tester une interaction éventuelle de FrmC avec ces intégrines *like* de *Dictyostelium*, des expériences de double-hybride, utilisant le domaine FERM de FrmC et les extrémités cytosoliques des protéines Sib ont été réalisées, en collaboration avec François Letourneur (Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Lyon). Dans ces expériences préliminaires, seul les domaines cytosoliques de SibA, B et C ont été testés. Comme indiqué dans le tableau 4, le domaine FERM de FrmC ne présente qu'une affinité très faible pour les protéines Sib testées, comparé au domaine FERM de la taline A utilisé comme contrôle. Au vu des résultats, il est donc vraisemblable que FrmC ne soit pas un régulateur de ces protéines d'adhésion sauf à proposer un niveau supplémentaire de régulation nécessaire à l'interaction, comme une phosphorylation activatrice ou un changement de conformation suite à la liaison de phospholipides membranaires par exemple, qui ne serait pas présent dans nos conditions de test. Les protéines SibD et E restent à tester.

### 2.3. Recherche de partenaires par co-immunoprécipitation

Afin d'identifier de nouveaux partenaires de FrmC, des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur les protéines isolées par *pull-down* avec le domaine FERM de FrmC. En l'absence d'anticorps spécifique, nous avons choisi d'utiliser ce domaine fusionné à la GFP et immunoprécipité à l'aide du kit GFP-Trap dans des cellules *frmC*, pour éviter une compétition éventuelle avec FrmC endogène. Les protéines issues de l'immunoprécipitation ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et révélées par un marquage à l'argent. D'après la figure 83, nous remarquons qu'un certain nombre de bandes sont présentes dans l'immunoprécipitat de FrmC<sub>GFP</sub> et absentes dans celui de la GFP seule nous indiquant qu'elles correspondent à des protéines spécifiquement associées à FrmC. Les bandes les plus intenses ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse après digestion trypsique. Le gel a également été découpé aux mêmes positions dans les puits contrôle correspondant

	Accession	Protéine	Description	Pep.
Cytosquelette/Adhésion/Motilité	DDB_G0286355	Chaîne lourde de la myosine II	Polymérisation actine – Motilité – Cytocinèse – Développement.	135
	DDB_G0269144	Hsp70 ( <i>Heat shock cognate 70 kDa protein 1</i> )	Polymérisation actine.	25
	DDB_G0276153	NsfA ( <i>N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion</i> )	Polymérisation actine – Motilité – Endocytose – Phagocytose.	13
	DDB_G0268632	$\alpha$ -actinine A	Polymérisation actine – Motilité – Adhésion – Résistance au stress – Développement.	12
	DDB_G0272106	Arp-2 ( <i>Actin-related protein 2</i> )	Appartient au complexe arp2/3 – Polymérisation de l'actine.	5
	DDB_G0287035	LmpB ( <i>Lysosomal integral membrane glycoprotein B</i> )	Récepteur lysosomal – Adhésion ?	4
	DDB_G0290481	Taline A	Interaction avec l'actine et la myosine – Adhésion – Cytocinèse – Développement.	3
	DDB_G0274455	Chaîne lourde Myosine VII	Interaction avec la Taline A – Polymérisation actine – Adhésion – Phagocytose.	3
	DDB_G0293084	Rac GEF ZizB ( <i>Zizim</i> )	Migration cellulaire – Chimiotactisme – Développement.	2
	DDB_G0273447	ABP-E ( <i>Actin binding protein E</i> )	Interaction avec l'actine – Motilité – Chimiotactisme – Phagocytose – Maturation lysosome.	2
	DDB_G0269134	ABP-50 (appelé aussi EFA1 : <i>Elongation factor 1 <math>\alpha</math></i> )	Interaction avec l'actine-F - Stress hyper-osmotique – Facteur d'élongation de la traduction.	2
	DDB_G0277851	Dynamine B (dymB)	Adhésion – Phagocytose - Stress hypotonique.	2
Endocytose/Trafic vésiculaire	DDB_G0287127	VatA ( <i>Vacuolar proton ATPase subunit <math>\alpha</math></i> )	Transporteur de proton.	8
	DDB_G0291858	VatM ( <i>Vacuolar proton ATPase subunit M</i> )	Phagocytose – Régulation pH intracytosolique.	4
	DDB_G0281957	Sous-unité $\gamma$ du complexe AP-1	Interaction avec la clathrine – Trafic cargos membranaires sur le réseau trans-Golgien.	3
	DDB_G0290081	Sortiline1 ( <i>PDZ domain-containing protein</i> )	Protéine transmembranaire ? - Transport au niveau du Golgi ?	3
	DDB_G0277221	Chaîne lourde de la clathrine	Trafic vésiculaire – Motilité – Endocytose – Développement.	3
	DDB_G0286131	Sec63 ( <i>Secretory 63</i> )	Transport des protéines modifiées de façon post-traductionnelle le long du RE ?	3
	DDB_G0272578	Sous-unité $\beta$ du complexe AP-3	Trafic vésiculaire.	2
	DDB_G0284735	Sous-unité $\beta$ du coatomère (COP- $\beta$ )	Transport vésiculaire ?	2
Signalisation cellulaire	DDB_G0284845	RacGEF GxcC	Développement - Régulation de GTPase Rho ?	9
	DDB_G0277913	RasGEF J	Régulation de GTPase ?	4
	DDB_G0268758	Ola ( <i>Obg-Like ATPase</i> )	GTPase Ras-like.	3
	DDB_G0278703	Protéine non caractérisée (RacGEF)	Régulation de GTPase Rho ?	2
	DDB_G0278535	Sérine/Thréonine-protéine kinase putative	Non caractérisée.	2
Stress	DDB_G0273249	Hsc70-2 ( <i>Heat shock cognate 70 kDa protein 2</i> )	Réponse au stress ?	25
	DDB_G0273445	SAPK ( <i>Stress-activated protein kinase <math>\alpha</math></i> )	Polymérisation actine – Stress hyper-osmotique – Chimiotactisme – Cytocinèse – Développement.	6
	DDB_G0290187	HspH ( <i>Heat shock protéine Hsp70 protein family</i> )	Réponse au stress ?	2

**Tableau 5 : Partenaires du domaine FERM de FrmC identifiés par spectrométrie de masse.**

Les protéines identifiées en spectrométrie de masse par au moins 2 peptides ont été classées en fonction de leur rôle établi ou putatif. Le numéro d'accèsion, le nom de la protéine, la fonction (Description) présumée (indiquée par un point d'interrogation) ou connue et le nombre de peptides (Pep.) pour chaque identification sont donnés.

à la GFP seule. Une analyse différentielle des peptides identifiés dans la situation test et la situation contrôle nous a permis de générer une liste de partenaires putatifs de FrmC (identifiés par au moins 2 peptides différents) et classées en fonction de leur rôle fonctionnel établi ou supposé (Tableau 5).

Plusieurs des protéines identifiées présentent un intérêt évident dans le contexte de ce travail. En accord avec un rôle putatif de FrmC comme protéine d'échafaudage entre le cytosquelette d'actine et des cargos membranaires, plusieurs protéines d'interaction avec l'actine ou participant à la dynamique du cytosquelette sont présentes, telles que les myosines VII et II, la taline A, l' $\alpha$ -actinine ou encore arpB. Certaines de ces protéines sont également décrites pour participer à l'adhésion cellulaire, notamment la taline A et la myosine VII et pourraient avec FrmC contribuer à des complexes d'adhésion. Sont retrouvées également plusieurs protéines impliquées dans l'endocytose et le trafic vésiculaire, notamment certaines sous-unités du complexe AP-1 et la chaîne lourde de la clathrine. Des protéines impliquées dans la réponse au stress hyper-osmotique comme la SAPK, ABP-50, l' $\alpha$ -actinine ou encore l'ATPase vacuolaire (qui permet la régulation du pH intracytosolique) sont également présentes, décrites pour certaines pour leur accumulation stress-dépendante dans la fraction Triton X-100 insoluble (Liu et al., 2002; Rivero et al., 1996; Zischka et al., 1999). Enfin, un grand nombre des partenaires identifiés n'ont pas encore été caractérisés et leur rôle est encore incertain.

Cette liste de partenaires putatifs devra être confirmée. L'utilisation des différents domaines de FrmC et de la protéine entière dans des expériences similaires pourra nous permettre de consolider ces premiers résultats et éventuellement d'étendre cette liste.

## VIII. DISCUSSION

FrmC est une protéine non caractérisée dans la littérature, identifiée comme partenaire putatif d'AdcA durant la thèse de Dorian Guetta. Cette protéine appartient à la grande famille des protéines à domaine FERM, qui comprend 7 membres chez *Dictyostelium*. FrmC est étendue à chaque extrémité de son domaine FERM, par un long domaine N-terminal sans homologie de séquence avec des protéines connues et un domaine C-terminal composé de plusieurs motifs LRR. Sa fonction pourrait être complexe, étant donnée son architecture multi-modulaire originale. Contrairement à d'autres protéines à domaine FERM de *Dictyostelium*, comme les talines A et B, FrmC ne possède aucun homologue chez les Mammifères. Chez *Dictyostelium*, il existe de nombreux exemples de protéines associant des domaines fonctionnels qui, chez des organismes plus évolués, existent sous la forme de protéines isolées ou dans des assemblages différents. C'est le cas de la protéine Spalten qui combine une activité phosphatase de type PP2C avec une sous-unité  $G\alpha$  des protéines G hétérotrimérique



(Aubry and Firtel, 1998). C'est aussi le cas des arrestines de *Dictyostelium* dont AdcA, qui cumule un cœur arrestine et plusieurs modules d'interaction protéique ou lipidique.

Mes travaux ont permis une première caractérisation de la protéine FrmC. J'ai pu mettre en évidence que cette protéine à domaine FERM est effectivement capable, à travers son extrémité N-terminale, d'interagir avec l'arrestine AdcA. Son étude a permis d'établir sa localisation préférentielle à la membrane plasmique et de mettre à jour son implication dans l'adhésion cellulaire et la réponse au stress hyper-osmotique. Plusieurs aspects de ces données seront discutés dans cette dernière partie.

### **1. FrmC, un nouvel acteur dans le processus d'adhésion**

L'élaboration de mutants invalidés pour la protéine *frmC* a permis d'identifier un rôle de cette protéine dans l'adhésion cellule/substrat. Les cellules *frmC* présentent un défaut prononcé dans la mise en place de zones stables d'adhésion cellule/substrat et dans la résistance des cellules à des forces de décollement. L'adhésion cellule/substrat est un processus complexe mettant un jeu un réseau intriqué de protéines. Chez les Mammifères, l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire est assurée par les intégrines (pour revues Epifano and Perez-Moreno, 2012; Parsons et al., 2010). La liaison à leurs ligands extracellulaires conduit à un changement de conformation permettant l'accessibilité de leur queue cytosolique à un large répertoire d'adaptateurs cytoplasmiques capables de lier le cytosquelette d'actine. Ce réseau de protéines, appelé adhésome, inclut notamment des acteurs clé comme la vinculine, l' $\alpha$ -actinine ou encore les protéines à domaine FERM tels que les talines et les kindlines. Les points focaux d'adhésion construits autour des intégrines servent de plateforme de signalisation et sont étroitement régulés, leur dynamique étant un élément essentiel pour l'étalement, l'ancrage mais aussi la motilité cellulaires. Un défaut d'adhésion peut résulter de causes multiples, un cytosquelette d'actine défectueux, une activation de protéines d'adhésion réduite ou encore une connexion altérée entre la membrane et le cytosquelette d'actine, éventuellement due à l'absence des protéines d'adhésion elles-mêmes.

FrmC est une protéine adaptatrice du cytosol, donc incapable de médier une interaction directe avec le substrat extracellulaire. Par ailleurs, son invalidation génique est sans effet majeur sur le cytosquelette d'actine, à la différence de la protéine Phg2, une sérine/thréonine kinase également impliquée dans l'adhésion chez *Dictyostelium*, excluant un rôle général dans la structuration du réseau d'actine, malgré sa capacité à lier l'actine polymérisée (Gebbie et al., 2004). Son architecture multi-modulaire incluant un domaine FERM et son recrutement à la membrane plasmique nous amènent plutôt à privilégier un rôle dans la formation de structures d'adhésion au niveau de la membrane en tant qu'adaptateur entre des protéines d'adhésion membranaires, le cytosquelette d'actine et vraisemblablement d'autres protagonistes susceptibles d'interagir avec les différents domaines de la



protéine. Ce type de fonction est classique pour les protéines à domaine FERM, en particulier pour la sous-famille des protéines ERM incluant l'eitrine et la moésine ou encore celle représentée par les talines/kindlines à laquelle appartient FrmC, avec les autres protéines amibiennes talA, talB et FrmA. Chez les Mammifères, les talines/kindlines interagissent directement avec les intégrines via leur domaine FERM et les sites N(P)xY présents sur la queue intracellulaire des intégrines. La taline A de *Dictyostelium* semble jouer un rôle similaire par reconnaissance du même type de motifs par son domaine FERM sur les protéines membranaires intégrine-like Sib. Ces protéines d'adhésion Sib, en particulier les formes SibA et SibC dont le rôle dans l'adhésion cellulaire en phase végétative a été clairement établi (Cornillon et al., 2008), ne semblent pas être des cibles de la protéine FrmC. Dans le génome de *Dictyostelium*, nous avons pu identifier une cinquantaine de gènes codant pour des protéines membranaires exposant un motif NPxY du côté cytoplasmique, dont la grande majorité n'a pas été caractérisée mais qui pourrait inclure des cibles de FrmC.

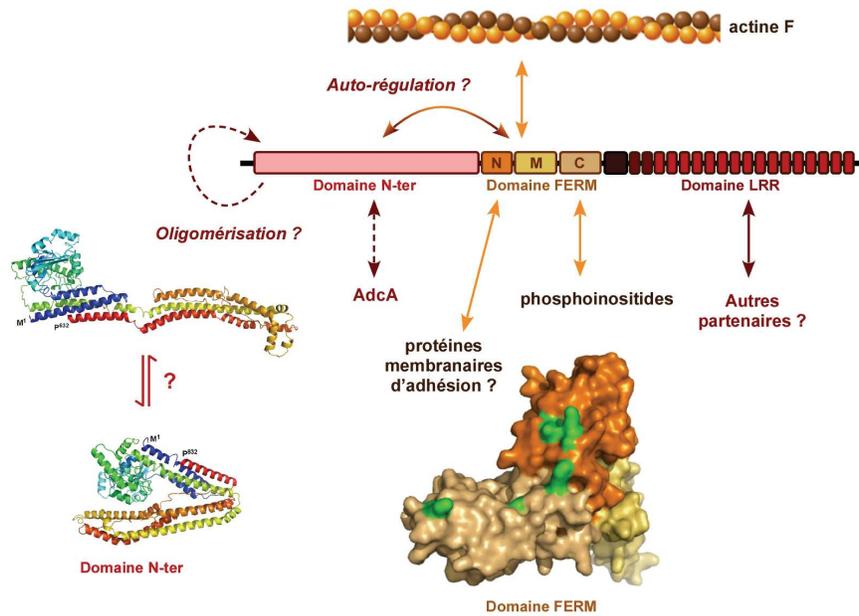
Les travaux préliminaires de recherche de partenaires du domaine FERM de FrmC n'ont pas permis d'identifier de protéines membranaires connues pour ou susceptibles de jouer un rôle en tant que molécules d'adhésion. Par contre, des protéines solubles impliquées dans l'adhésion - dont la taline A - et de nombreuses protéines de liaison à l'actine ou régulant la dynamique du cytosquelette, font partie de la liste des partenaires putatifs confortant l'idée que FrmC pourrait faire partie d'une structure adhésive complexe dont les différents acteurs restent à préciser/valider afin de définir plus précisément le rôle de FrmC dans ce processus d'adhésion.

## 2. FrmC, une véritable plateforme d'interaction

L'organisation multi-modulaire de FrmC suggère fortement un rôle de plateforme d'interaction multipartenaires. Plusieurs des domaines présents dans la protéine ont des rôles avérés dans la liaison de partenaires lipidiques et/ou protéiques, c'est le cas du domaine FERM et du module LRR. De nombreux exemples dans la littérature ont mis en évidence que les domaines FERM fonctionnent déjà par eux-mêmes comme adaptateurs en connectant le cytosquelette d'actine dans l'environnement de cibles membranaires, un rôle facilité par la liaison par ce même domaine de phospholipides de la membrane plasmique, notamment des phosphoinositides.

### 2.1. Des partenaires variés

Dans cette étude, nous avons pu établir que le domaine FERM de FrmC, à l'image des résultats obtenus sur divers domaines FERM de Mammifères, est capable de lier l'actine filamenteuse et des lipides de type phosphoinositides. Comme pour les autres domaines FERM, le site d'interaction avec l'actine-F présent dans le domaine FERM de FrmC ne semble pas impliquer de séquence(s) de liaison canonique(s), déjà répertoriée(s). Quant à la liaison des phosphoinositides, les travaux menés sur la



**Figure 84 : Partenaires protéiques et lipidiques identifiés ou potentiels de la protéine FrmC.**  
 Le domaine N-terminal de FrmC qui interagit avec AdcA est potentiellement le siège d'une oligomérisation de la protéine. La structure de ce domaine proposée par I-TASSER sous une conformation ouverte et fermée est montrée. Le domaine FERM de FrmC interagit avec l'actine *in vitro* et avec certains phosphoinositides. Les acides aminés de surface susceptibles de participer à cette liaison ont été indiqués en vert (lysine et arginine). Les sous-domaines F1, F2 et F3 de FERM sont respectivement représentés en orange, jaune et beige.

radixine, l'eitrine, la kindline ou encore la protéine PTPL1 indiquent que l'interaction fait intervenir des résidus basiques positionnés sur la surface générée par les domaines F1/F3, dans des régions parfois différentes selon les protéines, par exemple, le sillon à l'interface des domaines F1 et F3 pour la radixine ou au moins deux régions des domaines F1 et F3 dans le cas de l'eitrine et de PTPL1 (Barret et al., 2000; Bompard et al., 2003; Hamada et al., 2000). L'analyse de la localisation des acides aminés arginines et lysines sur la structure modélisée du domaine FERM de FrmC suggère plusieurs résidus candidats en surface de la protéine qui pourraient jouer un rôle similaire (Figure 84). Ajoutés à ces partenaires et comme discuté précédemment, la localisation membranaire plasmique de FrmC et les défauts phénotypiques du mutant nul laissent envisager son recrutement sur des protéines membranaires qui pourrait également être assuré par le domaine FERM, par analogie avec les protéines à domaines FERM des Mammifères.

Le domaine N-terminal en amont du domaine FERM présente un site d'interaction avec l'arrestine AdcA dans la région 1-334 du domaine. L'interaction directe entre ces deux protéines n'a pas été fermement démontrée et on ne peut donc exclure la participation de protéine(s) intermédiaire(s). Des travaux en cours, utilisant une approche double-hybride devraient permettre de préciser ce point. Par ailleurs, des résultats préliminaires indiquent que ce domaine est également capable d'interagir avec la protéine FrmC entière, suggérant une régulation possible de la protéine par oligomérisation. Cette extension de FrmC porte peu d'information fonctionnelle au niveau de sa séquence primaire. Toutefois, une tentative de modélisation du domaine N-terminal par le logiciel I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) propose une structure en torsades d'hélices, en accord avec la prédiction de domaines en *coiled-coil* par le logiciel PsiPred. De façon intéressante, deux configurations différentes sont proposées, une conformation « ouverte » et une conformation « fermée » (Figure 84).

Quant au module LRR qui étend le domaine FERM dans sa partie C-terminale, il a été très peu étudié au cours de ce travail en partie du fait de la difficulté à exprimer la protéine tronquée chez l'amibe. Néanmoins, la présence de ce long domaine pourrait venir étendre encore la liste des partenaires de la protéine.

Le rôle attendu pour FrmC de protéine d'échafaudage pourrait expliquer l'effet dominant négatif de la surexpression de FrmC observé sur les propriétés d'adhésion de la souche parentale. En situation de surexpression, FrmC pourrait séquestrer des effecteurs cellulaires normalement partagés sur différentes voies de signalisation régulant l'adhésion, affectant ainsi des voies normalement FrmC-indépendantes. Parmi les partenaires putatifs identifiés par *pull-down*, la séquestration d'acteurs comme la taline A par exemple pourrait générer le type de répercussions observées.



## 2.2. Une auto-régulation de FrmC par repliement de la protéine ?

Mes travaux ont également mis en évidence que le domaine FERM de FrmC est capable d'interagir *in vitro* avec le domaine N-terminal de la protéine. Ce même domaine ne semble pas capable de co-immunoprécipiter la protéine FrmC, favorisant plutôt l'hypothèse d'une interaction intramoléculaire. En situation basale, le domaine FERM de plusieurs membres de la famille des protéines à domaine FERM a été impliqué dans un processus d'auto-inhibition par maintien d'une conformation fermée de la protéine. A l'état inactif, la moésine par exemple est repliée, la queue carboxy-terminale en interaction avec l'interface F2/F3 du domaine FERM. La liaison de ce même domaine à des phosphoinositides de la membrane plasmique permet le dépliement de la protéine (forme active) démasquant un site d'interaction à l'actine présent à l'extrémité C-terminale de la protéine, et autorisant ainsi son couplage avec le cytosquelette (Pearson et al., 2000). Dans le cas de la FAK, une protéine structurellement très différente de la moésine, le domaine FERM vient bloquer le site actif du domaine kinase et l'accessibilité d'un site clé dans l'activation de la protéine, la tyrosine Y<sup>397</sup>. Le déplacement du domaine FERM par la liaison d'un partenaire, possiblement membranaire, permettrait une activation partielle de la FAK, l'autophosphorylation de la protéine sur la tyrosine Y<sup>397</sup> et le recrutement de la kinase Src parachevant l'activation complète de la kinase FAK par la phosphorylation de la boucle d'activation (Lietha et al., 2007). L'existence d'une telle auto-inhibition dans le cas de la protéine FrmC reste à confirmer. Cette auto-régulation pourrait ainsi moduler l'accessibilité des domaines FERM et N-terminal à leurs partenaires cellulaires et modifier la composition des assemblages multi-protéiques formés par FrmC en fonction des conditions rencontrées.

## 3. Quel rôle pour le couple AdcA/FrmC ?

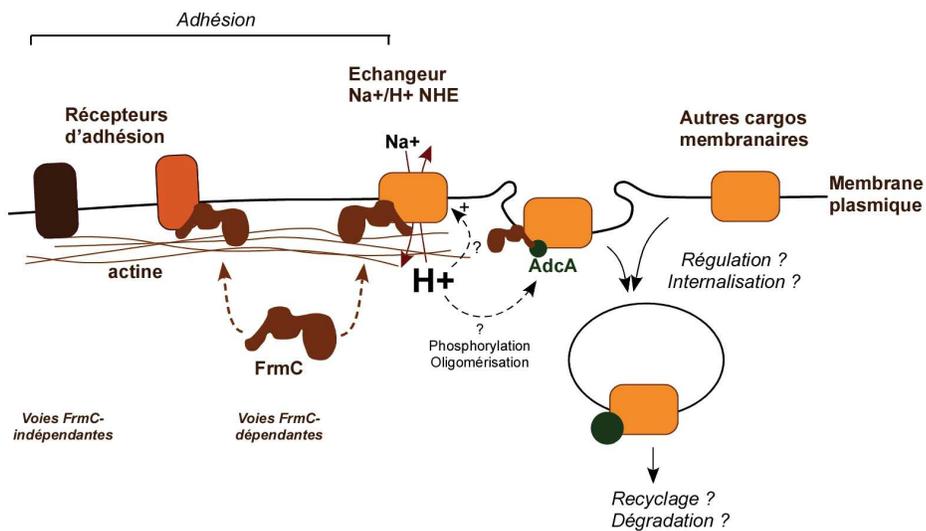
La protéine FrmC a été identifiée comme partenaire de la protéine AdcA et sa caractérisation fonctionnelle a été entreprise dans l'objectif de définir le champ d'action de cette arrestine ambiante. L'étude de la distribution subcellulaire de FrmC n'a pas permis d'identifier un site commun de localisation pour ces deux protéines. La protéine FrmC est recrutée spécifiquement à la membrane plasmique et ne semble pas présente sur la voie endocytaire, ni macropinosomale, ni phagocytaire. La protéine AdcA, quant à elle, est massivement présente sur les macropinosomes et les phagosomes. Toutefois, sa distribution subcellulaire est complexe avec la présence de la protéine également sur des petites vésicules très dynamiques dans le cytosol, qui pourraient représenter des vésicules de transport/recyclage entre compartiments. Les travaux de Reinders *et al.* ont aussi identifié la protéine AdcA dans leur protéome de centrosomes purifiés (Reinders et al., 2006). Par contre, la protéine ne semble pas être associée à la membrane plasmique de façon convaincante même si des marquages occasionnels ont pu être visualisés sur des surexprimeurs. En revanche, elle est recrutée très tôt sur la



voie endocyttaire, puisque qu'elle est détectable à un faible niveau sur les premiers compartiments macropinocytaires tout juste détachés de la membrane plasmique et encore recouverts d'actine. Dans l'hypothèse d'un recrutement très transitoire à la membrane plasmique, sa localisation membranaire pourrait ne pas être visualisable dans nos conditions expérimentales. Les outils dont nous disposons actuellement ne nous placent pas dans une situation optimale. Les protéines endogènes FrmC et AdcA sont difficilement détectables, peut-être du fait d'un faible niveau d'expression, ce qui nous a amené à travailler sur des souches de surexpression. Mes travaux semblent indiquer que les anticorps anti-FrmC MC-19 pourraient ne pas reconnaître la protéine en complexe avec AdcA, et donc ne pas permettre de marquer les sites de co-localisation en immunofluorescence, et l'utilisation de protéines étiquetées avec la GFP donne un signal plus diffus, avec un marquage cytosolique plus important. Des approches de microscopie à haute résolution ou permettant l'étude d'événements membranaires plasmiques comme le TIRFF pourraient peut-être mettre à jour une co-localisation de FrmC et AdcA sur des sites spécifiques de la membrane plasmique ou de la voie endocyttaire.

Mes travaux ont montré que l'absence de FrmC affecte les propriétés d'adhésion de *Dictyostelium*. Chez les Mammifères, l'adhésion et la motilité cellulaire mettent en jeu un certain nombre de protéines membranaires, cibles des arrestines. C'est le cas des intégrines ou encore des VE-cadhérines. La transition de l'état adhérent vers l'état motile, et la motilité en tant que telle nécessitent le remodelage des points focaux d'adhésion. L'internalisation arrestine-dépendante des protéines d'adhésion dans la voie endocyttaire permet une dynamique des sites adhésion compatible avec la migration cellulaire. Chez *Dictyostelium*, la dynamique des récepteurs d'adhésion n'a pas été étudiée dans le détail, mais pourrait, de façon similaire, impliquer des protéines de type arrestine. Des tests d'adhésion/décollement, utilisant le mutant *adcA* nul indiquent que la protéine n'est pas requise pour l'adhésion elle-même, dans des conditions nécessitant la protéine FrmC. Dans l'hypothèse où l'absence d'AdcA renforcerait plutôt l'adhésion, des tests préliminaires ont été réalisés pour des temps d'adhésion plus courts. Un comportement similaire a été observé pour les souches mutante et parentale. Dans ces mêmes tests, la surexpression d'AdcA ne semble pas non plus affecter l'adhésion des cellules. A ce stade, les résultats ne sont pas en faveur d'un rôle pour AdcA dans le recyclage de molécules d'adhésion, et la fonction de FrmC dans l'adhésion pourrait être dissociée de celle d'AdcA.

Les membres de la famille NHE sont également des cibles de  $\beta$ -arrestines et de protéines à domaine FERM (Beaty et al., 2014; Denker et al., 2000; Simonin and Fuster, 2010). Les protéines NHE régulent l'adhésion et la motilité et servent de mécano-senseur et de site d'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique. Ces protéines sont avant tout des transporteurs ioniques, acteurs clé de la régulation du pH intracellulaire par l'expulsion de protons contre des ions sodium en situation d'acidification du cytosol. Nous avons montré dans ce travail que l'absence de FrmC ralentit la récupération des cellules placées en situation de stress hyper-osmotique. De façon



**Figure 85 : Proposition de modèle du mécanisme de fonctionnement du couple AdcA/FrmC.** FrmC interagit à la membrane plasmique avec certains cargos membranaires spécifiques, impliqués dans l'adhésion et/ou dans la réponse au stress osmotique, ici un échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. AdcA pourrait prendre en charge cet échangeur dans la voie en endocytaire afin d'optimiser la réponse des cellules face au stress hyper-osmotique (voir texte).

intéressante, le stress hyper-osmotique conduit à une perte de l'adhésion, un arrondissement des cellules, un arrêt de la motilité (et de l'endocytose) avec une restructuration massive du cytosquelette d'actine. Une acidification du cytosol est également attendue des travaux de Pintsch *et al.* menés sur cellules carencées, d'autant qu'une acidification du cytosol est un signal d'activation de STATc et de phosphorylation de AdcA, au même titre que l'addition de sorbitol dans le milieu extracellulaire (Pintsch et al., 2001). A l'échelle macroscopique, l'adaptation des cellules aux conditions de stress s'illustre par la restauration d'un phénotype cellulaire adhérent, motile et endocytique et la réorganisation du cytosquelette. Au niveau cellulaire, elle met en jeu des cascades de signalisation complexes, impliquant notamment le facteur de transcription STATc, permettant de restaurer un équilibre ionique/osmotique et un pH cytosolique compatibles avec la survie cellulaire. Chez *Dictyostelium*, il existe 4 protéines de type NHE (Nhe1-4). Nhe1 semble être impliquée dans les étapes du développement où elle régulerait l'homéostasie du pH (Patel and Barber, 2005). Les autres membres de la famille NHE n'ont pas encore été étudiés et pourraient être impliqués dans l'adhésion et dans la réponse au stress par un rôle dans la restauration d'un pH intracellulaire approprié. Un modèle d'action du couple FrmC/AdcA, conciliant les résultats obtenus pendant ma thèse, est proposé sur la figure 85. La protéine amibienne FrmC pourrait agir sur différentes protéines membranaires incluant récepteurs d'adhésion et/ou membres de la famille NHE. La dérégulation de ces cargos membranaires par l'absence de FrmC pourrait générer des conséquences diverses dont une réduction de l'adhésion cellulaire et une adaptation plus lente au stress hyper-osmotique. Dans l'hypothèse d'une conservation de fonctions des arrestines chez *Dictyostelium*, AdcA pourrait réguler le devenir de certains de ces cargos membranaires en permettant leur orientation dans la voie endocytique. Des modifications locales de pH, notamment dans l'environnement de la protéine NHE pourrait être détectées par le domaine N-terminal de AdcA et moduler ainsi son activité par oligomérisation comme suggéré par les résultats de Dorian Guetta et/ou par phosphorylation. Dans des conditions physiologiques normales (sans stress), la phosphorylation d'AdcA pourrait être asynchrone et restreinte à une fraction limitée de la protéine et des sites spécifiques de la cellule du fait d'une signalisation très locale et ponctuelle, rendant difficile sa détection. La situation de stress hyper-osmotique pourrait exacerber et synchroniser la réponse d'AdcA, permettant ainsi sa visualisation.



CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

---

## CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'inscrit dans un objectif de caractérisation fonctionnelle des protéines de la famille des arrestines. Ces protéines adaptatrices sont impliquées dans un large panel de fonctions dont la régulation de cargos membranaires et de diverses voies de signalisation cellulaire, et qui pourrait s'étendre encore avec l'identification de nouveaux membres jusque là non caractérisés. Cette étude s'est focalisée sur l'arrestine non conventionnelle AdcA de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, un membre original de la famille du fait de son organisation multi-modulaire atypique.

La première partie de ce travail a permis de mettre en évidence la sensibilité d'AdcA à de nombreux stress cellulaires. Sa caractérisation fonctionnelle en situation de stress nous a amené à explorer la réponse de *Dictyostelium* face à un stress hyper-osmotique en conditions végétatives et valider l'implication d'acteurs clés, décrit pour leur rôle en conditions de carence. Bien que AdcA semble non essentielle dans l'adaptation des cellules au stress hyper-osmotique, elle subit une régulation fine par multi-phosphorylation dans ces conditions. Cette modification pourrait être une signature de son activation ou de son inhibition et les mutants d'AdcA dans ses sites de phosphorylation générés au cours de cette étude pourraient permettre de définir le rôle de cette modification et nous renseigner sur les fonctions de la protéine. Le travail de caractérisation phénotypique des souches surexprimant des versions d'AdcA non phosphorylables ou mimant une forme constitutivement phosphorylée devra donc être poursuivi. Par ailleurs, des sites phosphorylés supplémentaires sont attendus du profil de migration électrophorétique d'AdcA, qui devront préalablement être précisés.

A ce stade du travail, nous n'avons pas réussi à intégrer AdcA dans une cascade de signalisation. Une approche informée a permis néanmoins d'exclure un certain nombre de protéines kinases comme responsables de la phosphorylation d'AdcA, et de préciser le rôle de messagers secondaires comme le cGMP et le calcium dans la réponse de la protéine. A défaut de phénotype identifié, associé à la mutation *adcA* nulle, l'identification de partenaires s'impose donc pour poursuivre l'étude la protéine. La protéine à domaine FERM, FrmC, qui a été l'objet de la deuxième partie de ce travail fait partie de l'interactome de l'arrestine AdcA. La caractérisation fonctionnelle de cette nouvelle protéine a permis de mettre à jour son rôle dans l'adhésion cellulaire et d'étendre ainsi les connaissances sur l'adhésion cellule/substrat chez *Dictyostelium*. Le rôle exact de la protéine FrmC dans ce processus reste néanmoins à définir. Chez *Dictyostelium*, l'adhésion cellulaire met en jeu des protéines Sib5 de type *integrin-like* connectées au cytosquelette d'actine et des protéines à neuf passages transmembranaires



comme Phg1A et SadA qui semblent réguler le trafic endocyttaire et la stabilité de ces protéines d'adhésion Sibs (Cornillon et al 2006, Froquet et al 2012). Chez les Mammifères, les protéines d'adhésion sont des cibles des protéines à domaine FERM et des arrestines. Mes travaux n'ont pas mis en évidence d'interactions directes entre FrmC et des membres de la famille des Sibs. Par ailleurs, l'inactivation d'*adcA* ne s'accompagne pas de défauts d'adhésion majeurs. Il serait néanmoins intéressant d'étudier l'existence éventuelle de connexions fonctionnelles entre ces acteurs connus de l'adhésion afin de préciser si FrmC s'intègre dans cette voie de signalisation ou participe à une cascade de signalisation distincte et si AdcA contribue d'une manière ou d'une autre aux mécanismes de régulation associés. Une telle connaissance pourrait permettre de relier les résultats obtenus dans le cadre de l'adhésion et dans le contexte du stress, dans l'hypothèse attendue d'un rôle de FrmC comme connecteur entre des protéines de la membrane plasmique – des protéines contrôlant l'adhésion notamment – et le cytosquelette d'actine.

Au delà de partenaires solubles, la littérature concernant les arrestines conventionnelles et non conventionnelles chez les Mammifères ou la Levure nous amène effectivement à envisager un rôle pour AdcA dans la régulation de protéines membranaires, transitant dans la voie endocyttaire, en accord avec son association massive aux endosomes. A ce jour, les essais du laboratoire visant à identifier des cibles membranaires d'AdcA n'ont pas été concluants avec des approches classiques de co-immunoprécipitation, possiblement du fait d'interactions trop transitoires, ou de leur non-identification par spectrométrie de masse. Une étape préalable de *cross-linking* ou encore l'utilisation d'approches de marquage de type BioID (*proximity-dependent biotin identification*, Roux et al., 2012) pourraient permettre de contourner ces difficultés.

Enfin, la protéine AdcA fait partie d'un répertoire de 6 arrestines, qui se caractérisent par des modules protéiques et un profil d'expression temporelle au cours du cycle de développement spécifiques. On ne peut toutefois exclure une redondance fonctionnelle pour ces différents membres. Un travail d'inactivation systématique (simple et multi-inactivation) des membres de cette famille *arrestine* est en cours au laboratoire à l'aide de la technique Cre-Lox. L'analyse des conséquences phénotypiques de ces mutations pourrait permettre de mettre à jour des fonctions jusque là non identifiées dans le contexte génétique du mutant simple *adcA* nul et d'étendre nos connaissances sur les autres membres amibiens, et de façon plus générale sur les fonctions assurées par les protéines du clan *arrestine*. Par ailleurs, des extensions de type FYVE (comme pour AdcA) ou C2 (comme dans AdcB et C) sont retrouvées chez d'autres arrestines des Amoebozoaires dont celles du parasite *Entamoeba histolytica*. Ce travail de caractérisation fonctionnelle mené sur le protiste *Dictyostelium* pourrait ainsi ouvrir des pistes de réflexion à investiguer chez l'amibe pathogène dans le cadre d'une recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.



# MATÉRIELS ET MÉTHODES

---



## I. MATÉRIELS

**1. Instruments**

Agitateur Classic C1 Scientific	New Brunswick
Electroporateur Gene Pulser II	Biorad
Thermocycleur PTC-200	MJ-Research
Spectrophotomètre Ultrospec 1100 pro	Amersham
Spectrofluorimètre RF-1501	Shimadzu
Compteur et analyseur de particules Coulter Z2	Beckman Coulter
Incubateur Ecotron	Infors HT
Microscope Axiovert 200M	Zeiss
Loupe binoculaire Stereo Discovery V20	Zeiss
Centrifugeuse J2-21M/E	Beckman Coulter
Centrifugeuse J-6M/E	Beckman Coulter
Centrifugeuse Allegra X-12R	Beckman Coulter
Micro-centrifugeuse 5415R	Eppendorf
Ultra-centrifugeuse L7	Beckman Coulter
Ultra-centrifugeuse Optima TL	Beckman Coulter
FACS Calibur	Beckton Dickinson

**2. Réactifs**

2-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich
8-Br-cAMP	Enzo Live Sciences
8-Br-cGMP	Enzo Live Sciences
Acides désoxyribonucléiques (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roche, New England
Biolabs	
Acide maléique	Sigma-Aldrich
Acide propionique	Sigma-Aldrich
ADN ligase T4	Promega
Agar	Beckton Dickinson
Agarose Type D-5	Euromedex
Amylose	New England Biolabs
Ampiciline	Sigma-Aldrich
Aprotinine	Roth
Bacto Tryptone	Difco
Bacto Peptone	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Blasticidine	InvivoGen
Bromure d'éthidium	Sigma-Aldrich
CIP (phosphatase alcaline)	Promega
Cycloheximide	Sigma-Aldrich
Cytochalasine A	Sigma-Aldrich
DEP	Sigma-Aldrich

Diéthylstilbestrol	Sigma-Aldrich
Digoxigénine-11-dUTP	Roche
DMSO (diméthylsulfoxyde)	Sigma-Aldrich
DTT (1,4-Dithiothréitol)	Euromedex
EDTA (acide éthylènediaminetetraacétique)	Sigma-Aldrich
EGTA (acide éthylèneglycolbis[2-aminoethylether]tetra-acétique)	Sigma-Aldrich
Enzymes de restriction	Roche, New England Biolabs
Extrait de levure	Oxoid
G418 disulfate	Sigma-Aldrich, Boeringher
Gluthation-Sepharose	GE-Healthcare
HEPES (acide 4-[2-hydroxyéthyl]-1-piperazineéthanesulfonique)	Sigma-Aldrich
Hygromycine B	PAA Cell Culture Company
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)	Euromedex
Kit GFP-Trap	ChromoTek
Kit miniprep Qiaprep Spin	Qiagen
Kit maxiprep	Qiagen
Kit nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
Kit RT-PCR	Promega, Qiagen
Latrunculines A et B	Enzo Life Sciences
Leupeptine	Roth
LoFlo <i>medium</i>	Formedium
Marqueurs de taille (protéine)	Thermo Fischer Scientific
Marqueurs de taille (ADN)	Roche
MES (acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique)	Sigma-Aldrich
NP-40 (octyl phenoxy)polyéthoxyéthanol)	Sigma-Aldrich
Oligonucleotides	Sigma-Aldrich
PFA (paraformaldéhyde)	Thermo Fischer Scientific
Phalloïdine-Alexa568	Molecular Probes
Pepstatine	Roth
Peptone	Oxoid
Phénol	QBiogene
Pipes	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Polymerases Phusion et Vent	New England Biolabs
Polymerase Taq	Euromedex
Protéine A – agarose	Roche
Protéine G – agarose	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich
Sorbitol	Sigma-Aldrich
SDS (sodium dodecylsulfate)	Sigma-Aldrich
TEMED (tetraméthylethyldiamine)	Sigma-Aldrich
Thapsigargine	Alomone Labs
Tris Base	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

Les produits chimiques courants (MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, LiCl, NaOH, HCl, cadmium) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

### 3. Plasmides

#### 3.1. Constructions d'expression et d'inactivation chez *Dictyostelium* réalisées au cours de ce travail

Constructions	Limites en a.a.	Vecteur	Étiquette	Résistance
FrmC <sub>notag</sub>	1-1489	Exp4+	-	G418
FrmC-Nter <sub>notag</sub>	1-635	Exp4+	-	G418
FrmCALRR <sub>notag</sub>	1-938	Exp4+	-	G418
FrmC <sub>GFP</sub>	1-1489	Exp4+	GFP Ct	G418
FrmC <sup>1-334</sup> <sub>GFP</sub>	1-334	Exp4+	GFP Ct	G418
FrmC-Nter <sub>GFP</sub>	1-635	Exp4+	GFP Ct	G418
FERM <sub>GFP</sub>	628-938	Exp4+	GFP Ct	G418
LRR <sub>GFP</sub>	936-1489	Exp4+	GFP Ct	G418
FrmCALRR <sub>GFP</sub>	1-938	Exp4+	GFP Ct	G418
AdcA <sub>notag</sub>	1-580	Exp4+	-	G418
HΦ <sup>S70A</sup> <sub>GFP</sub>	1-156	Exp4+	GFP Ct	G418
HΦ <sup>S77A</sup> <sub>GFP</sub>	1-156	Exp4+	GFP Ct	G418
HΦ <sup>S70A/S77A</sup> <sub>GFP</sub>	1-156	Exp4+	GFP Ct	G418
AdcA <sup>S77A</sup> <sub>notag</sub>	1-580	Exp4+	-	G418
AdcA <sup>S77D</sup> <sub>notag</sub>	1-580	Exp4+	-	G418
AdcA <sup>S70A/S77A</sup> <sub>notag</sub>	1-580	Exp4+	-	G418
AdcA <sup>S70D/S77D</sup> <sub>notag</sub>	1-580	Exp4+	-	G418
FrmCKO-Bsr	-	pBlueScript	-	Blasticidine

Ct : fusion de l'étiquette à l'extrémité carboxy-terminale

#### 3.2. Constructions d'expression chez *Dictyostelium* générées au laboratoire

Constructions	Limite en a.a.	Vecteur	Étiquette	Résistance
AdcA <sub>GFP</sub>	1-580	Exp4 <sup>+</sup>	GFP Ct	G418
HΦ <sub>GFP</sub>	1-156	Exp4 <sup>+</sup>	GFP Ct	G418
AdcAΔHΦ <sub>GFP</sub>	140-580	Exp4 <sup>+</sup>	GFP Ct	G418
AdcAΔFY <sub>GFP</sub>	1-459	Exp4+	GFP Ct	G418
AdcA <sup>R491A</sup> <sub>GFP</sub>	1-580	Exp4 <sup>+</sup>	GFP Ct	G418

Ct : fusion de l'étiquette à l'extrémité carboxy-terminale

3.3. Constructions d'expression chez *Dictyostelium* obtenues de la communauté*Dictyostelium*

Constructions	Vecteur	Étiquette	Résistance	Origine
ABP-GFP	Exp4+	GFP Ct	G418	lab. F. Bruckert
LIME-GFP	Exp4+	GFP Ct	G418	lab. F. Bruckert
PTP3 <sub>myc</sub>	Exp4+	myc Ct	G418	lab. R. Firtel
PTP3 <sup>S648C</sup> <sub>myc</sub>	Exp4+	myc Ct	G418	lab. R. Firtel
SAPK <sub>FLAG</sub>	Exp4+	FLAG Ct	G418	lab. R. Firtel
SAPK <sup>K378A</sup> <sub>FLAG</sub>	Exp4+	FLAG Ct	G418	lab. R. Firtel

Ct : fusion de l'étiquette à l'extrémité carboxy-terminale

## 3.4. Constructions d'expression en bactéries réalisées au cours de ce travail

Constructions	Limites en a.a.	Vecteur	Étiquette	Résistance
GST <sup>FrmC</sup> <sup>1-334</sup>	1-334	pGEX-3X	GST Nt	Amp.
MBP <sup>FrmC</sup> -Nter	1-635	pMAL-c2	MBP Nt	Amp.
GST <sup>FrmC</sup> -Nter	1-635	pGEX-3X	GST Nt	Amp.
MBP <sup>FERM</sup>	628-938	pMAL-c2	MBP Nt	Amp.
GST <sup>FERM</sup>	628-938	pGEX-3X	GST Nt	Amp.
MBP <sup>LRR</sup>	936-1489	pMAL-c2	MBP Nt	Amp.
GST <sup>LRR</sup>	936-1489	pGEX-3X	GST Nt	Amp.

Amp. : Ampicilline ; Nt : fusion de l'étiquette à l'extrémité amino-terminale

## 4. Souches

4.1. Souches de *Dictyostelium*

L'ensemble des souches parentales et *knock out* (KO) utilisées dans ce travail, leurs caractéristiques ainsi que leur provenance sont récapitulés dans le tableau ci-après.

Souches	ID	Fond génétique	Résistance /Auxotrophie	Provenance
SOUCHES PARENTALES				
KAx-3 (RF)*	DBS0236487	-	-	Lab. R. Firtel
KAx-3 (JH)*	DBS0236486	-	-	Lab. J. Hadwiger
KAx-3 (DSC)*	DBS0237700	-	-	Dicty Stock Center

SOUCHES PARENTALES (suite)				
Souches	ID	Fond génétique	Résistance /Auxotrophie	Provenance
JH10 (DSC)*	DBS0236450	-	Auxotrophe pour la thymidine	Dicty Stock Center
Ax-2 (JGW) *	DBS0235534	-	-	Lab. J.G. Williams
Ax-2 (LE)*	DBS0237699	-	-	Lab. L. Eichinger
SOUCHES <i>KNOCK-OUT</i>				
<i>adcA</i>	DBS0349906	KAx-3 (RF)*	Blasticidine	Le laboratoire
<i>frmC</i>	-	KAx-3 (RF)*	Blasticidine	Ce travail
<i>dstC</i>	DBS0350425	Ax-2 (JGW)*	Hygromycine	Lab. J.G. Williams
<i>erk1</i>	-	KAx-3 (JH)*	Blasticidine	Lab. J. Hadwiger
<i>erk2</i>	-	KAx-3 (JH)*	Blasticidine	Lab. J. Hadwiger
<i>gbpC</i>	DBS0302680	KAx-3 (DSC)*	Blasticidine	Dicty Stock Center
<i>pkacat</i>	DBS0236783	JH10 (DSC)*	-	Dicty Stock Center
<i>sgc/gca</i>	DBS0302679	KAx-3 (DSC)*	Blasticidine	Dicty Stock Center
<i>mek1</i>	DBS0236543	KAx-3 (RF)*	Blasticidine	Dicty Stock Center
<i>pyk3</i>	-	Ax-2 (LE)*	Blasticidine	Lab. L. Eichinger
<i>phg2</i>	-	Ax-2 (LE)*	Blasticidine	Lab. L. Eichinger
<i>dokA</i>	DBS0235920	Ax-2 (DBS0235534 Gerisch)	G418	Lab. S. Schuster
* provenance RF : R. Firtel, JGW : Jeff Williams, JH : Jeff Hadwiger, DSC : Dicty Stock Center, LE : Ludwig Eichinger				

#### 4.2. Souches bactériennes

Les différentes étapes de sous-clonage ont été réalisées dans la souche d'*E. coli* XL1-Blue (Stratagène). La souche d'*E. coli* BL21-DE3 (Stratagène) a été utilisée pour l'expression de protéines recombinantes.

## 5. Anticorps

### 5.1. Utilisation en immunofluorescence

Anticorps primaires	Source	Origine	Dilution
anti-AdcA	le laboratoire	polyclonal de cobaye	1/1000
anti-FrmC MC-19	ce travail	polyclonal de lapin	1/5000
anti-p80 (H161)	Lab. P. Cosson	monoclonal de souris	1/10000
anti-STATc total 7H3	Lab. J.G. Williams	monoclonal de souris	1/500-1/1000

Anticorps secondaire	Source	Origine	Dilution
anti-IgG de cobaye – Cy3	Jackson ImmunoResearch	âne	1/2000
anti-IgG de souris – Cy3	Jackson ImmunoResearch	âne	1/1000
anti-IgG de lapin – Cy3	Jackson ImmunoResearch	âne	1/1000
anti-IgG de souris – Alexa488	Molecular Probes	chèvre	1/800
anti-IgG de lapin – Alexa488	Molecular Probes	chèvre	1/800

### 5.2. Utilisation en Western blot

Anticorps primaires	Source	Origine	Dilution
anti-GFP (clones 7.1 et 13.1)	Roche	monoclonal de souris	1/1000 (5% lait)
anti-myc (9E10)	Roche	monoclonal de souris	1/1000
anti-MBP	Biolabs	polyclonal de lapin	1/10000
anti-AdcA	le laboratoire	polyclonal de cobaye	1/2000 (1% BSA)
anti-FrmC RAB-20	ce travail	polyclonal de lapin	1/1000 (5% lait)
anti-FrmC MC-19	ce travail	polyclonal de lapin	1/1000 (5% lait)
anti-phospho Tyr PY20	Santa Cruz Biotechnol.	monoclonal de souris	1/2000 (1% BSA)
Anti-phospho Tyr 4G10	Merck Millipore	monoclonal de souris	1/2000 (1% BSA)
anti-phospho S/T	BD Transduction Lab.	monoclonal de souris	1/2000 (1% BSA)
anti-GST	Don C. Delphin	polyclonal de lapin	1/10000
anti-actine 1D9	Biotem	monoclonal de souris	1/40 (1% BSA)
anti-P-STATc (Y <sup>922</sup> ) CP22	Don J.G. Williams	monoclonal de souris	1/500 (5% lait)
anti-STATc total 7H3	Don J.G. Williams	monoclonal de souris	1/1000 (5% lait)

Anticorps secondaires	Source	Origine	Dilution
anti-IgG de lapin couplés à HRP	Bio-Rad	chèvre	1/3000
anti-IgG de souris couplés à HRP	Bio-Rad	chèvre	1/3000
anti-IgG de cobaye couplés à HRP	Jackson ImmunoResearch	âne	1/10000

## II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 1. Sous-clonage

Les vecteurs d'expression en bactéries ou chez *Dictyostelium* ont été générés à l'aide de méthodes standard de biologie moléculaire. Les PCRs (réaction de polymérisation en chaîne) ont été réalisées avec les polymérases Vent ou Phusion sur des ADNs génomique ou complémentaire de *Dictyostelium*. La température d'élongation a été ajustée de 72°C à 68-65°C pour tenir compte de la richesse des introns en bases A et T (>90%). Fragments d'ADN et produits de PCR ont été purifiés grâce au kit NucleoSpin Extract II de Macherey-Nagel après migration sur gel d'agarose et intégrés dans des vecteurs de sous-clonage ou d'expression à l'aide de techniques classiques basées sur l'utilisation d'enzymes de restriction. Les ADN plasmidiques ont été purifiés grâce aux kits miniprep/maxiprep de Qiagen. La séquence des constructions impliquant des étapes de PCR a été validée par séquençage par Cogenics (Beckman) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques.

### 2. Préparation de bactéries compétentes d'*E. coli*

Trois millilitres d'une culture en phase stationnaire de croissance sont inoculés dans 300 ml de milieu de culture SOB (20 g/l Bacto Tryptone ; 5 g/l Bacto Yeast Extract ; 0,5 g/l NaCl ; 2,4 g/l MgSO<sub>4</sub> ; 0,186 g/l KCl). Après croissance à 18°C jusqu'à une DO<sub>600nm</sub> de 0,6, la suspension est refroidie 10 min dans la glace et centrifugée 10 min à 2 500 x g à froid. Le culot est repris dans 32 ml de tampon TB (10 mM Pipes ; 15 mM CaCl<sub>2</sub> ; 250 mM KCl plus 55 mM MnCl<sub>2</sub> ajouté après avoir tamponné le milieu à pH 6,7) froid et filtré sur filtre de 0,22 µm. La suspension est placée 10 min dans la glace et de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Le culot est repris dans 24 ml de tampon TB froid et 1,75 ml de DMSO stérile sont ajoutés progressivement. Des fractions aliquotes sont préparées et directement congelées dans de l'azote liquide.

### 3. Extraction d'acides nucléiques de *Dictyostelium*

#### 3.1. Extraction d'ADN génomique de *Dictyostelium*

Environ  $2.10^7$  cellules sont resuspendues dans 200  $\mu$ l de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM EDTA pH 7,2 ; 3,8% SDS ; 2% 2-mercaptoéthanol) et traitées au micro-onde (puissance max.) 5 sec, 10 sec puis 15 sec. Le tampon de lyse est dilué au  $\frac{1}{2}$  et rajouté au lysat à raison de 200  $\mu$ l/tube. Le lysat est placé 10 min à 75°C. Sont ensuite ajoutés 400  $\mu$ l de 20 mM Tris-HCl pH 9,5 et 500  $\mu$ l de phénol-chloroforme tamponné avec du Tris pH 8,4. La phase aqueuse est récupérée après 10 min de centrifugation à 13 000 x g et ré-extraite avec 500  $\mu$ l phénol-chloroforme. L'ADN est ensuite précipité par addition de 400  $\mu$ l d'isopropanol et 20  $\mu$ l d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et incubation 5 min à température ambiante. L'ADN est alors centrifugé 10 min à 13 000 x g à 4°C, le culot est rincé avec 750  $\mu$ l d'éthanol 70% et resuspendu dans 50  $\mu$ l de tampon TE (1 mM EDTA ; 10 mM Tris pH 7.5) contenant 0.5  $\mu$ l de RNase A (1 mg/ml).

#### 3.2. Extraction d'ARN totaux de *Dictyostelium*

Environ  $5.10^7$  cellules sont centrifugées 5 minutes à 1 000 x g et resuspendues dans 300  $\mu$ l de 50 mM Tris, pH 7,5. Sont ajoutés ensuite 250  $\mu$ l de 50 mM Tris, pH 7,5 contenant 2% de SDS ainsi que 10  $\mu$ l de DEP. Un volume de 900  $\mu$ l de phénol-chloroforme est ajouté rapidement au lysat cellulaire. Après centrifugation (2 min à 16 000 x g), la fraction supérieure aqueuse est récupérée. Trois extractions supplémentaires sont réalisées de la même façon en ajoutant 1/10 du volume d'acétate de sodium à pH 4,7 pour les deux dernières. Les ARNs totaux sont ensuite précipités par l'ajout de 1 ml d'éthanol et centrifugés 5 minutes à 16 000 x g. Le culot est resuspendu dans 400  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O-DEP et le même volume de LiCl 8 M est ajouté. Après une incubation d'une nuit à -20°C, le mélange est centrifugé 10 minutes à 16 000 x g et le culot est repris dans 400  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O-DEP. Les ARNs sont de nouveaux précipités dans 40  $\mu$ l de LiCl 8 M et 2,5 volumes d'éthanol. Après une dernière centrifugation, le culot est séché et repris dans 50  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O-DEP. Ces ARNs extraits peuvent être utilisés dans des kits de RT-PCR pour l'obtention de cDNA.

### 4. Southern blot

Pour l'analyse par Southern blot, 5  $\mu$ l d'ADN génomique (correspondant à  $2.10^6$  cellules) sont digérés avec les enzymes de restriction appropriées pendant 2 h. Les fragments d'ADN sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% dans du tampon TAE (40 mM Tris-Acétate ; 1 mM EDTA). Le gel est traité en tampon de dénaturation (0,5 M NaOH ; 1,5 M NaCl) pendant 30 min puis en tampon de neutralisation (0,5 M Tris-HCl pH 7,5 ; 3 M NaCl) également pendant 30 min.

Après rinçage en H<sub>2</sub>O, l'ADN est transféré du gel sur une membrane de Nylon chargée positivement par capillarité pendant une nuit en tampon de transfert (3 M NaCl ; 300 mM citrate de sodium, pH 7,0). L'ADN est fixé de façon covalente à la membrane par rayonnement UV.

Les fragments d'intérêt sont révélés grâce à une sonde d'ADN marquée à la digoxigénine par l'incorporation de digoxigénine-11-dUTP (DIG-11-dUTP). Le marquage de la sonde se fait par PCR en présence de 200 µM de dATP, dGTP et dCTP, 170 µM de dTTP et 30 µM de DIG-11-dUTP. L'incorporation de DIG-11-dUTP se traduit par un retard de migration du produit de PCR sur gel d'agarose. La pré-hybridation et l'hybridation sont réalisées selon le protocole du fabricant. En résumé, la membrane est bloquée pendant 2 h à 42°C avec la solution « DIG Easy » puis incubée sur la nuit avec la sonde marquée. La membrane est lavée 2 fois en solution de lavage 1 (0,3 M NaCl ; 30 mM citrate de sodium ; 0.1% SDS ; pH 7) pendant 5 min puis 2 fois en solution de lavage 2 (75 µM NaCl ; 7.5 mM citrate de sodium ; 0.1% SDS ; pH 7) pendant 15 min, à 68°C. La membrane est équilibrée 1 min en tampon d'équilibration (100 mM acide maléique ; 150 mM NaCl ; 0.3 % Tween 20 ; pH 7.5) et incubée 30 min avec la solution de blocage (1% réactif de blocage dans de l'acide maléique). Un anticorps anti-digoxigénine-AP conjugué à la phosphatase alcaline est ajouté au 1/20 000 et laissé en incubation 30 min à température ambiante. La membrane est lavée 2 fois en tampon d'équilibration pendant 15 min. Les bandes immunoréactives sont révélées par chimioluminescence après 1 min d'incubation en tampon de détection (100 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 8 ; solution de « CDP-Star » 1/100). Le marqueur *DIG-labeled DNA Molecular-Weight Marker III* (Roche) est utilisé comme marqueur de taille.

### III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

#### 1. Culture cellulaire

L'ensemble des souches utilisées sont cultivées à 21°C en boîtes de Pétri ou en culture agitée, dans du milieu axénique HL5 (14,3 g/l peptone ; 7,15 g/l extrait de levure ; 18 g/l maltose ; 0,64 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O ; 0,48 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,25 g/l dihydrostreptomycine sulfate ; pH 6,2) excepté les souche Ax-2 (J.G. Williams) et *dstC* (STATc KO, J.G. Williams) qui sont maintenues en HL5-glucose (milieu HL5 commercial de ForMedium supplémenté de 14 g/l de glucose). Les antibiotiques appropriés sont ajoutés au milieu de culture à raison de 20 µg/ml pour la généticine, de 7,5 µg/ml pour la blasticidine et 40 µg/ml pour l'hygromycine. Pour les expériences, les cellules sont systématiquement prélevées en phase exponentielle de croissance (2.10<sup>6</sup> à 8.10<sup>6</sup> cellules/ml).

Afin de suivre la croissance cellulaire, la concentration cellulaire d'une culture de *Dictyostelium* en suspension agitée est suivie par des comptages réguliers du nombre de cellules sur un compteur de particules Beckman Coulter Z2. La courbe de croissance permet d'extraire le temps de doublement de la souche analysée. Le logiciel de comptage *AccuComp Z2* permet également la mesure du diamètre cellulaire moyen de la suspension.

## 2. Transformation de *Dictyostelium* et clonage des cellules

Environ  $10^7$  cellules sont prélevées et maintenues sur la glace pendant 15 min. Après une centrifugation de 5 min à 1 000 x g, les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon d'électroporation (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6,5 ajusté avec du KOH ; 50 mM saccharose). A 30  $\mu\text{g}$  d'ADN déposé dans une cuvette d'électroporation, sont ajoutées  $8.10^6$  cellules. Le mélange est maintenu sur la glace pendant 1 min puis les cellules subissent une électroporation de 2 pulses successifs (1 kV, 3  $\mu\text{F}$ ). Les cellules sont ensuite déposées délicatement dans une boîte de Pétri contenant 10 ml de HL5. L'antibiotique permettant la sélection des cellules transformées est ajouté au milieu de culture 24 h plus tard. Après environ 10 jours de sélection et un changement régulier du milieu de culture, seules les cellules ayant intégré le plasmide sont encore présentes dans la boîte.

A ce stade, les cellules peuvent être clonées. Environ 200 cellules sont étalées sur milieu  $\text{Sm}^+/3$ -agar (14 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 3,5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 4,05 mM  $\text{MgSO}_4$  ; 3,33 g/l D-Glucose ; 3,33 g/l Bacto Peptone ; 0,3 g/l d'extrait de levure plus 15 g/l agar) avec 700  $\mu\text{l}$  de culture de *Klebsellia aerogenes* en phase stationnaire de croissance. Les boîtes sont placées à 21°C jusqu'à apparition de plages de phagocytose, correspondant à des colonies clonales de *Dictyostelium*. Les clones sont isolés par prélèvement des cellules en bordure des plages de phagocytose et transfert en boîtes de culture 12 puits en milieu HL5 supplémenté avec l'antibiotique *ad hoc*.

## 3. Fractionnement subcellulaire

Environ  $2.10^7$  cellules sont centrifugées 5 min à 1000 x g puis reprises dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon de fractionnement (20 mM HEPES-Na pH 7,5 ou MES-Na pH 6,5 ; 110 mM KCl ; 1 mM PMSF ; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine, aprotinine et pepstatine A). Des billes de verre de 0,18  $\mu\text{m}$  de diamètre (0,3 g) sont ajoutés à la suspension cellulaire puis le mélange est vortexé pendant 5 min. Le volume est ajusté à 700  $\mu\text{l}$  avec du tampon de fractionnement et le cassat cellulaire est centrifugé 10 min à 1000 x g pour éliminer les cellules non cassées et les billes. Une fraction de 40  $\mu\text{l}$  du surnageant est prélevée pour constituer la fraction totale et le reste est ultra-centrifugé 30 min à 110 000 x g (50 000 rpm en rotor TL100.3 Beckman). Une fraction du surnageant (40  $\mu\text{l}$ ) est prélevée pour constituer la fraction soluble et le culot est repris dans le volume exact de surnageant retiré pour constituer la fraction membranaire.

Les fractions sont additionnées de tampon Laemmli (solution Laemmli 1X : 2% SDS ; 10% glycérol ; 5 % 2-mercaptoéthanol ; 0,002% de bleu de bromophénol, 62,5 mM Tris-HCl ; pH 6,8) puis analysées par Western blot après migration sur gel de polyacrylamide.

#### 4. Microscopie

##### 4.1 Imagerie sur cellules non fixées

Les cellules sont déposées sur lamelle de verre compartimentée Lab-Tek 8 puits (Lab-Tek 155 411, Thermo Fisher Scientific) à raison de  $2 \cdot 10^5$  cellules par puits dans 400  $\mu$ l de HL5 pour une observation des cellules en contraste phase ou en DIC. Le milieu classique HL5 étant fluorescent aux longueurs d'onde qui nous intéressent, le milieu LoFlow moins fluorescent est utilisé de façon préférentielle pour l'observation de protéines fusionnées à la GFP. Les cellules sont laissées à adhérer 1h30, le milieu est changé par du nouveau milieu et les cellules sont ensuite observées sur un microscope inversé Zeiss M-200 à fluorescence équipé d'un piezo. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel *Axiovision* (Zeiss).

##### 4.2. Imagerie sur cellules fixées

Les cellules sont traitées comme précédemment dans 400  $\mu$ l de milieu HL5. Après adhésion, les cellules sont soit fixées 15 minutes avec une solution de HL5 – 4 % PFA et perméabilisées 2 min en PBS- 0,2 % Triton X-100, soit fixées 15 minutes en HL5 – 4 % PFA – 0,1 % Triton X-100 pour le marquage de FrnC seul avec l'anticorps anti-FrnC MC-19.

Après fixation et perméabilisation, les sites non spécifiques sont saturés en solution de blocage (PBS ; 0,5 % BSA) pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps primaire dilué dans cette même solution est alors ajouté (voir tableau X). Après 1 h d'incubation à température ambiante et 3 lavages en PBS – 0,1 % Tween 20 de 5 min, les cellules sont ensuite mises en présence de l'anticorps secondaire approprié (voir tableau X) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages, les cellules sont observées sur un microscope inversé Zeiss M-200. Le marquage de l'actine est réalisé par l'addition de phalloïdine-Alexa568 au cours de la deuxième incubation.

## 5. Tests de conditions de stress sur cellules de *Dictyostelium*

### 5.1. Protocole « erlen »

Ce protocole correspond à celui qui a été utilisé dans la grande majorité des cas de stress. Environ  $10^8$  cellules sont centrifugées 5 min à 1 000 x g et resuspendues dans 9,1 ml de milieu de culture HL5. La suspension est transférée dans un erlen sur un agitateur orbital. Après 1 h 30 de récupération, 100  $\mu$ l de culture sont prélevés et centrifugés 15 secondes dans une micro-centrifugeuse de paillasse. Le culot cellulaire qui constitue l'échantillon  $t=0'$  est lysé dans 55,5  $\mu$ l de tampon Laemmli 1X et les protéines sont dénaturées 3 min à 95°C. A la suspension cellulaire, est ajouté 1 ml de milieu de culture supplémenté ou non de sorbitol (0,5 M, 1 M, 2 M ou 4 M), de NaCl (0,25 M, 0,5 M, 1 M ou 2 M), de glucose (2 M), de glycérol (2 M), de  $D_2O_2$  (20 mM), de FCCP (100  $\mu$ M), de cytochalasine A (100  $\mu$ M), de latrunculine A ou B (50  $\mu$ M), de thapsigargine (100  $\mu$ M), de cadmium (500  $\mu$ M), de propionate (160  $\mu$ M) ou de DES (200  $\mu$ M). A différents temps de cinétique, 100  $\mu$ l de culture sont prélevés, centrifugés 15 secondes, resuspendus dans 50  $\mu$ l de tampon Laemmli 1X et chauffés 3 min à 94°C. Pour l'application du stress hypo-osmotique, les cellules sont diluées au 1/5 par addition d'eau distillée et une quantité identique de cellules est prélevée au cours du temps. Le choc thermique est réalisé par incubation de la culture cellulaire dans un bain marie à 32°C. Enfin, pour des raisons techniques, les traitements au 8-Br-cAMP (20 mM final) et 8-Br-cGMP (20 mM final) sont réalisés dans les mêmes conditions mais dans un volume réduit (1 ml final). Pour tester la nécessité d'une néo-synthèse protéique dans la réponse d'AdcA, les cellules sont traitées avec 2 mM de cycloheximide 15 min avant l'application du stress sorbitol. La modification d'AdcA dans ces différentes conditions et les réponses de STATc et de PTP3 sont suivies par migration électrophorétique des échantillons protéiques sur gel de polyacrylamide 8% (équivalent à  $2 \cdot 10^5$  cellules) et Western blot à l'aide des anticorps appropriés.

### 5.2. Protocole « tube »

De façon ponctuelle, ce protocole « tube » a été mis en œuvre pour suivre la réponse des cellules au stress. Environ  $7,5 \cdot 10^7$  cellules sont centrifugées 5 min à 1 000 x g et soigneusement débarrassées du milieu de culture. Le culot cellulaire est ensuite dans 1,5 ml dans le milieu approprié (HL5, PBS ou  $H_2O$  +/- agents de stress) contenant des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF ; 1  $\mu$ g/ml leupeptine, aprotinine et pepstatine A) et le microtube contenant les cellules placé sur un agitateur rotatif à 21°C. A différents temps de cinétique, 100  $\mu$ l de culture sont prélevés et les cellules lysées dans 16  $\mu$ l de tampon de lyse (tampon de resuspension additionné de 7,5 % Triton X-100) pendant 10 minutes dans

la glace. Les réponses d'AdcA et de STATc sont ensuite analysées par Western blot après migration des échantillons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8%.

## 6. Développement multicellulaire

Des cellules en phase exponentielle de croissance ( $2.10^7$ ) sont centrifugées 5 minutes à  $1000 \times g$  et lavées en tampon Na/K phosphate (12 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6,1 ajusté avec du KOH). Le culot est resuspendu dans 80  $\mu\text{l}$  du même tampon et des gouttes de suspension cellulaire diluée en cascade au  $\frac{1}{2}$  sont déposées sur des boîtes de Na/K phosphate/agar contenant 16 g/l agar, 2 mM  $\text{MgSO}_4$  et 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Après séchage partiel des gouttes, les boîtes sont maintenues à  $21^\circ\text{C}$  et photographiées sous loupe binoculaire toutes les 4 heures durant 24 h.

## 7. Mesure de l'activité endocytaire

### 7.1. Pinocytose

Environ  $10^8$  cellules sont centrifugées 5 min à  $1\ 000 \times g$  et resuspendues dans 8 ml de milieu de culture. Après 1 h d'incubation à  $21^\circ\text{C}$  sous agitation, 1 ml de FITC-dextran à 20 mg/ml et 1 ml de milieu de culture contenant ou non du sorbitol concentré 10 fois sont ajoutés à la culture cellulaire. Dans le cas d'un traitement à la cytochalasine A, les cellules sont initialement resuspendues dans 9 ml de milieu de culture et 5  $\mu\text{M}$  de drogue sont ajoutés en même temps que le FITC-dextran. Juste après l'ajout du FITC-dextran ainsi qu'aux différents temps de la cinétique, 1 ml de suspension cellulaire est prélevé et transféré dans 9 ml de HL5 glacé. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 min à  $1\ 000 \times g$  et lavées avec 10 ml de HL5 glacé. Après trois lavages, le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de tampon 40 mM Mes-Na (pH 6,5) et 25  $\mu\text{l}$  de cette suspension sont analysés au compteur de cellule afin de déterminer le nombre de cellules. Deux millilitres de tampon de lyse 100 mM NaPi 0,25% Triton X-100 (pH 10,5) sont ajoutés et la fluorescence est mesurée sur un spectrofluorimètre aux longueurs d'onde  $\lambda_{\text{ex}}$  470 nm et  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm. Une gamme d'étalonnage réalisée à partir du milieu d'incubation contenant le marqueur fluorescent est utilisée pour transformer les valeurs de fluorescence mesurées en volumes apparents de phase fluide internalisés (fl/cellule).

### 7.2. Phagocytose

Environ  $2.10^7$  cellules sont resuspendues dans 10 ml de milieu de culture HL5. Après une incubation d'1 h 30 sous agitation à  $21^\circ\text{C}$ , 500  $\mu\text{l}$  de la suspension cellulaire sont prélevés et transférés dans 10 ml de HL5 glacé. Cinquante microlitres de billes fluorescentes (Fluoresbrite YG 1  $\mu\text{m}$ ,

Polysciences) sont ajoutés à la suspension cellulaire et des fractions de 500  $\mu$ l de culture sont prélevées au cours du temps et ajoutées à 10 ml de HL5 glacé afin de bloquer le trafic endocytaire. Les cellules sont centrifugées 5 min à 1000 x g à 4°C. Après 2 lavages avec 10 ml de HL5 glacé, et juste avant l'analyse par FACS, le culot cellulaire est resuspendu dans 500  $\mu$ l de tampon Na/K phosphate contenant 120 mM de sorbitol. La fluorescence moyenne de la population cellulaire et donc son activité phagocytaire est mesurée par l'analyse de 50 000 cellules sur FACS-Calibur (laser  $\lambda=488$  nm, capteur FL1  $\lambda=530$  nm).

## 8. Adhésion

### 8.1. RICM

La microscopie par réflexion à contraste interférentiel (RICM) a été utilisée pour visualiser les zones de contact de la cellule avec le substrat. Le principe de cette technique est basé sur la différence de réflexion du faisceau lumineux arrivant sous la cellule en fonction de la distance entre un substrat de verre et la membrane de la cellule (). En effet, une partie du faisceau va être déviée lorsqu'il traverse la surface de verre et générer ainsi une première onde de réflexion. Une autre partie du faisceau va atteindre la membrane de la cellule en créant une deuxième onde de réflexion dont la longueur varie en fonction de la distance entre le substrat et la membrane cellulaire. Si la cellule est suffisamment proche du substrat, la distance entre les deux ondes de réflexion génère une interférence, mise en évidence par l'apparition d'une intensité lumineuse blanche. Ainsi, les zones d'adhésion apparaissent en noir et les zones proches de la surface qui vont adhérer en blanc.

Les cellules sont déposées sur lamelle de verre et observées sur un microscope Olympus IX 71 en RICM à l'objectif à immersion 60x jusqu'à apparition de zones blanches correspondant au contact imminent des cellules avec le verre. A ce moment, une acquisition d'image est réalisée sur 600 secondes, à raison de 1 image/sec. Les images sont ensuite traitées à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement d'images *Image Pro Plus (Media Cybernetics)* afin d'extraire l'évolution de l'aire de contact cellule-substrat au cours du temps et la localisation des aires gagnées et perdues au cours de l'étalement. Seules les cellules qui n'entrent pas en contact avec d'autres cellules pendant la durée de l'expérience sont analysées.

### 8.2. Adhésion en boîte

Environ  $2,5 \cdot 10^7$  cellules sont centrifugées 5 min à 1 000 x g à 4°C et resuspendues dans 25 ml de HL5. Après 1 h 30 d'adaptation sous agitation à 21°C, les cellules sont déposées dans des boîtes de Pétri (Greiner 633198) à raison de 5 ml par boîte. La concentration cellulaire exacte est mesurée sur le reste de culture sur un compteur de cellules Beckman Coulter. Les cellules sont laissées à adhérer 20

min puis sont soumises à une agitation orbitale à 0, 10, 20 ou 40 rpm pendant 1 min 30. Délicatement, le surnageant est prélevé et le nombre de cellules décrochées est déterminé par comptage et exprimé en pourcentage de cellules décrochées par rapport au nombre de cellules déposés initialement. Le comptage des cellules dans le surnageant de la boîte laissée sans agitation permet de calculer le nombre de cellules n'ayant pas adhéré à l'issue des 20 min.

## 9. Étude de la motilité cellulaire

### 9.1. Motilité exploratoire

Environ  $5.10^4$  cellules sont prélevées d'une culture en phase exponentielle de croissance et déposées sur une lamelle de verre multi-puits (Lab-Tek 8 puits) dans un volume de 200  $\mu$ l de milieu HL5. Après 1 h 30 d'adhésion et de récupération, les cellules sont observées en contraste de phase à l'objectif x40 sur un microscope AxioVert 200M Zeiss et filmées pendant 40 min à raison de 1 image/min. L'analyse des images est réalisée à l'aide du logiciel *Image J* grâce au module *Manual Tracking*.

### 9.2. Chimiotactisme

Après centrifugation 5 minutes à 1000 x g,  $10^8$  cellules sont lavées en tampon Na/K phosphate froid. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans le même tampon à une concentration de  $1.10^8$  cellules/ml et 2  $\mu$ l de la suspension cellulaire sont déposés sur milieu agar (12 mM Na/K phosphate, pH 6,2 contenant 15 g/l agarose). Un volume de 0,5  $\mu$ l d'acide folique (10 mM en tampon Na/K phosphate ; pH 7,1) est déposé à 2 mm de la goutte de cellules. La migration des cellules vers l'acide folique est suivie à la loupe binoculaire sur une durée de 4 h.

## 10. Suivi de la réponse au stress par mesure de la densité optique

La densité optique d'une culture cellulaire dépend du nombre et de la taille des cellules. La mesure de la DO (ici à 450 nm) peut être utilisée pour suivre la réponse des cellules à des stress induisant des changements morphologiques. Les cellules sont reprises en milieu HL5 et laissées 1 h 30 en récupération avant application du stress (voir paragraphe 5.1). Des fractions de 1 ml sont prélevées au cours du temps avant et après application du stress et immédiatement analysées à la longueur d'onde  $\lambda$  de 450 nm. L'évolution de la densité optique de la suspension est exprimée en  $\Delta$ DO entre deux prélèvements consécutifs en tenant compte des effets dilution et changement d'indice de réfraction du milieu entre le temps initial et les points suivants.

## IV. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

**1. Analyse des protéines***1.1. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes*

Au cours de ce travail, la séparation des protéines s'est faite de façon systématique sur des gels de polyacrylamide constitué pour le gel de concentration de 5 % d'acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; 125 mM Tris, pH 6,8 ; 0,1 % SDS ; 0,1 % persulfate d'ammonium (APS) ; 0,1 % TEMED) et pour le gel de séparation de 6 à 12 % de d'acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; 375 mM Tris pH 8,8 ; 0,1 % SDS ; 0,1 % APS et un volume approprié de TEMED en fonction de la concentration en acrylamide). La migration électrophorétique est réalisée en tampon Tris-Glycine (15,1 g/l Tris base ; 72 g/l glycine ; 5 g/l SDS) sous un champ électrique de 200 V. Les protéines sont ensuite soit colorées au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent soit transférées sur une membrane de PVDF en vue d'une analyse par Western blot.

*1.2. Coloration des protéines**1.2.1. Coloration au bleu de Coomassie*

Le gel de polyacrylamide est immergé dans une solution contenant 30% d'isopropanol, 10 % d'acide acétique et 1 mg/ml de *Brillant Blue* et coloré à température ambiante. Après 30 min d'incubation, le gel est rincé et décoloré dans une solution de 10% isopropanol, 10% acide acétique. Les protéines sont alors colorées en bleu.

*1.2.2. Coloration au nitrate d'argent*

Le gel de polyacrylamide est incubé au minimum deux fois 30 min dans une solution à 30 % d'éthanol et 7,5 % d'acide acétique. Après deux lavages de 10 min en H<sub>2</sub>O, le gel est sensibilisé 1 min dans une solution d'hydrosulfite de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) à 0,3 g/ml, préparé juste avant son utilisation. De nouveau deux lavages d'1 min en H<sub>2</sub>O sont effectués avant d'immerger le gel dans une solution de nitrate d'argent à 200 mg/ml (préparé extemporanément). Après une incubation de 45-60 min à température ambiante sur un agitateur, le gel est lavé deux fois 30 secondes dans de l'eau. Les protéines, marquées à l'argent, sont révélées par l'ajout d'une solution de carbonate de sodium (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 0,3g/ml dans laquelle est ajouté du thiosulfate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) à une concentration finale de 1 mg/ml. Après apparition du marquage, la coloration est stoppée avec une solution de 0,3 M Tris base, 2% acide acétique. Le gel peut être conservé dans une solution d'éthanol à 20%.

Lorsque les échantillons sont par la suite analysés par spectrométrie de masse, une décoloration est nécessaire après découpe des bandes d'intérêt. Tout d'abord, les bandes sont lavées 2 fois par 2 lavages successifs de 30 minutes avec une solution à 25 mM de bicarbonate d'ammonium et cette même solution supplémentée de 50% d'acétonitrile. Les bandes sont ensuite lavées 15 minutes dans l'eau puis 15 minutes dans de l'acétonitrile à 100%. Après un séchage de 5 minutes au *Speed Vac* à température ambiante, les échantillons subissent 4 lavages de 15 minutes tout d'abord en 7 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puis en H<sub>2</sub>O, puis en 100% acétonitrile et de nouveau en H<sub>2</sub>O. Enfin, les bandes décolorées sont conservés à -20°C à sec ou dans de l'éthanol 30 %, jusqu'à la digestion « in-gel » par la trypsine ou d'autres protéases des protéines présentes dans le fragment de gel et l'analyse au spectromètre de masse.

### 1.3. Western blot

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon P, Millipore). La membrane est bloquée 1 h en TBS – 0,1 % Tween contenant du 5% de lait écrémé ou 1% de BSA en fonction de l'anticorps utilisé. Ensuite, l'anticorps primaire (voir tableau X) est ajouté au tampon et laissé 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes en TBS – 0,1 % Tween 20 puis incubée avec l'anticorps secondaire approprié (voir tableau X) dans les mêmes conditions que l'anticorps primaire. Enfin, la membrane est à nouveau lavée 3 fois 5 min avec du TBS – 0,1% Tween et la détection des protéines est faite par chimioluminescence avec le système *Western Lightning Plus – ECL* (Perkin Elmer).

## 2. Purification de protéines recombinantes en bactéries

Différents domaines de FrnC ont été exprimés sous formes de protéines recombinantes étiquetées en N-terminal à la GST (vecteur pGEX-3X) ou à la MBP (vecteur pMAL-C2). Une pré-culture de bactéries BI-21 contenant ces différents plasmides d'expression est inoculée au 1/50 (250 ml final) dans du milieu LB et mises à 37°C pendant environ 2 h afin d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} = 0,6-0,8$ ). L'addition de 1 mM IPTG permet d'induire l'expression des protéines cibles. Après une induction de 3 h à 37°C ou d'une nuit à 21°C, les bactéries sont centrifugées 10 min à 6 500 rpm (Beckman, JA20), à 4°C. Une fraction aliquote de 1 ml de chaque culture est prélevée avant centrifugation afin de tester l'efficacité d'induction de l'expression de la protéine d'intérêt et de vérifier si la protéine exprimée est soluble, avant de poursuivre sa purification.

### 2.1. Test d'expression des protéines recombinantes

Un millilitre de culture est centrifugé 5 min à 2 500 x g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 300 µl de PBS contenant 5 mg/ml de lysozyme et 1 mM de PMSF. Après une incubation de 20 min sur glace, du Triton X-100 est ajouté pour atteindre une concentration finale de 1%. Après 10 min supplémentaire dans la glace, le lysat est traité aux ultrasons 2 minutes (30 sec « on », 10 sec « off ») à 40 % d'amplitude. Une fraction aliquote est récupérée et constitue la fraction totale. Après une centrifugation de 10 min à 16 000 x g, les fractions, soluble et membranaire, sont séparées. Le surnageant est soigneusement récupéré et le culot est resuspendu dans 1 ml de PBS.

Les différentes fractions (totale, membranaire et soluble) sont dénaturées par l'ajout de tampon Laemmli à 1X final et chauffage à 94°C pendant 3 min. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et analysées par une coloration au bleu de Coomassie. Une culture de bactéries ne contenant pas le vecteur d'expression ou n'ayant pas reçu d'IPTG est utilisée comme contrôle négatif.

### 2.2. Purification de protéines recombinantes

Le culot de 250 ml de culture bactérienne est repris dans 5 ml de PBS (pH 7,4) contenant 5 mM d'EDTA puis sont ajoutés 500 µl de lysozyme (à 50 mg/ml). Une incubation de 20 min dans la glace est réalisée en vortexant régulièrement. Après l'incubation, 12,5 ml de tampon de lyse (PBS ; 10 mM EDTA pH 8 ; 1 mM EGTA pH 8 ; 3 mM DTT ; 1 mM PMSF ; 1 µg/ml leupeptine, aprotinine et pepstatine A) et 2 ml de 10% Triton X-100 sont ajoutés à la suspension. Après 10 min d'incubation dans la glace, le lysat est soumis à une sonication de 5 min à 70 % d'amplitude avec un cycle de 10 secondes toutes les 5 secondes. Après 10 min de centrifugation à 30 000 x g et 1 h à 150 000 x g à froid, le surnageant est récupéré et additionné de 2 ml de billes de glutathion-Sepharose à 50 % dans le cas des protéines fusionnées à la GST ou de 1 ml de billes d'amylose à 50 % dans le cas des protéines fusionnées à la MBP, préalablement lavées avec 50 ml de PBS. Le mélange billes/surnageant est maintenu 1 h sur un agitateur rotatif à 4°C. Les billes sont ensuite lavées par centrifugation 4 fois en tampon de lavage (PBS ; 10 mM EDTA pH 8 ; 1 mM EGTA pH 8 ; 1% Triton X-100) et 1 fois avec du PBS.

A l'exception des expériences de *pull-down* où une fraction des billes couplées aux protéines d'intérêt est utilisée directement, les protéines sont éluées soit en présence de glutathion réduit (10 mM glutathion réduit ; 50 mM Tris-HCl, pH 8) pour les protéines fusionnées à la GST, soit en présence de maltose (10 mM maltose ; 20 mM HEPES, pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA) pour les protéines couplées à la MBP. L'éluat (5 ml) est récupéré par fraction de 500 µl. La concentration protéique dans chacune des fractions est évaluée par dosage de Bradford et les fractions les plus

concentrées sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au Bleu de Coomassie. Quand nécessaire, les protéines sont dialysées sur la nuit contre du PBS ou un autre tampon plus approprié.

### 3. Production et purification d'anticorps

Au cours du travail, des anticorps ont été produits par injection à des lapins de la protéine GST-FrmC<sup>1-334</sup> ou de peptides de FrmC couplés à la KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) (voir Partie Résultats). Pour permettre leur purification par affinité, les protéines GST et GST-FrmC<sup>1-334</sup> sont couplées de façon covalente après purification directement sur la colonne de glutathion-Sepharose selon le protocole proposé par Harlow et Lane (*Antibodies : A Laboratory Manual*, 1988). Les peptides (1 mg pour 1 ml de résine) sont couplés sur une résine Sulfolink® (Thermo Life Sciences) selon le protocole du fabricant par liaison thioéther entre la cystéine terminale (-SH) des peptides et les groupements iodoacétyl de la résine. Les sérums des lapins (J39 pour les anti-protéines et J63 pour les anti-peptides) sont dilués au 1/10 et purifiés selon le protocole de Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988). Les anticorps sont élués successivement avec 10 volumes de glycine 100 mM pH 2,5 puis 10 volumes de 100 mM triéthylamine pH 11,5. Les deux fractions, acide et basique, neutralisées immédiatement après élution sont dialysées contre du PBS et testées par Western blot. Pour l'ensemble des purifications effectuées, les anticorps d'intérêts ont été élués grâce à la solution acide.

### 4. Déphosphorylation des protéines à la phosphatase alcaline

Le traitement à la phosphatase alcaline CIP est effectué directement sur des échantillons dénaturés en tampon Laemmli. Une fraction aliquote correspondant à  $2.10^5$  cellules est diluée 20 fois dans une solution de 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,66 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> et 1mM spermidine. Environ 15 unités de CIP sont ajoutées et la déphosphorylation est réalisée à 37°C pendant 30 min. En contrôle, une préparation issue du même échantillon est traitée à l'identique sans addition de CIP. Les protéines sont ensuite précipitées 1 h dans la glace par l'ajout de 10% d'acide trichloroacétique (TCA). Après une centrifugation de 10 min à 16 000 x g, le culot protéique est resuspendu dans une solution de Tris base à 200 mM. Les protéines d'intérêt sont ensuite analysées par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques permettant de suivre des modifications de leur profil de migration électrophorétique.

### 5. Co-immunoprécipitation

Les cellules ( $2.10^7$ ) sont centrifugées 5 min à 1 000 x g à 4°C puis lysées 15 minutes dans la glace dans 1 ml de tampon de lyse (1x PBS pH 7,4 ; 1% NP40 ; 2 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 1 µg/ml

leupeptine, aprotinine et pepstatine A). Le lysat est centrifugé 10 min à 16 000 x g afin d'éliminer les noyaux et les débris cellulaires. Une petite fraction du surnageant est prélevée et représente l'extrait protéique total (T). Au reste du surnageant, sont ajoutées 40 µl de billes d'agarose couplées à la protéine A ou G préalablement lavées 3 fois avec 1 ml de tampon de lyse (centrifugation d'une minute à 16 000 x g à froid) et diluées à 50 % dans du tampon de lyse ainsi que 1-2 µg de l'anticorps spécifique de la protéine à immunoprécipiter. Après 1 h d'incubation à 4°C sur un agitateur rotatif, les billes sont lavées 3 fois avec 1 ml de tampon de lyse et 1 fois avec 1 ml de PBS. Les protéines fixées sur les billes ainsi que celles de l'extrait total sont dénaturées par l'ajout de 80 µl de tampon Laemmli 2x (4% SDS ; 20% glycérol ; 10 % 2-mercaptoéthanol ; 0,004% de bleu de bromophénol, 0,125 M Tris-HCl ; pH 6,8) et 3 min de chauffage à 94°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis analysées par Western blot. Dans le cas d'une approche non informée, les protéines sont colorées au nitrate d'argent (voir paragraphe IV.1.2) avant d'envisager une analyse par spectrométrie de masse (Plateforme MS/MS, EDyP, iRTSV).

Dans le cas des protéines étiquetées avec la GFP, l'utilisation du kit GFP-Trap a parfois été préférée au protocole classique utilisant des anticorps anti-GFP du fait d'un niveau faible de protéines non-spécifiques dans l'expérience contrôle négatif. La purification des protéines étiquetées et d'éventuels partenaires a été faite selon les instructions du fournisseur.

## 6. Préparation de fraction Triton X-100 insoluble

Des cellules sont prélevées, centrifugées à 1 000 x g pendant 5 minutes et resuspendues dans du milieu de culture à la densité de  $1.10^7$  cellules/ml. Après 1 h 30 de récupération, les cellules sont soumises ou non à un stress par addition de l'agent de stress dans le milieu (voir paragraphe III.5.1). Juste avant l'application du stress et à différents temps de cinétique,  $5.10^6$  cellules (soit 500 µl) sont prélevées et lysées dans 500 µl de tampon de lyse (2% Triton X-100 ; 20 mM imidazole ; 20 mM EGTA ; 1mM azide ; pH 7,5) pendant 10 min sur la glace puis pendant 10 min à 21°C. Le lysat est ensuite centrifugé à 1 000 x g pendant 4 min. Un échantillon de 40 µl est prélevé dans la fraction soluble et 10 µl de tampon Laemmli 5X sont ajoutés. Le culot est lavé une fois en tampon de lyse dilué au ½ et repris, après élimination du liquide résiduel, dans 50 µl de tampon Laemmli 1X. Les fractions soluble (10 µl) et insoluble (5 µl) sont ensuite analysées par coloration au bleu de Coomassie ou par Western blot après séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### 7. Préparation de cytosol de *Dictyostelium*

Environ  $5.10^7$  cellules sont resuspendues dans 1,5 ml de tampon de casse (40 mM HEPES pH 7,5 ; 110 mM KCl ; 1 mM PMSF ; 1  $\mu$ g/ml leupeptine, aprotinine et pepstatine A) et cassées par passage au *cell cracker*. Le cassat cellulaire est centrifugé 10 minutes à  $1\ 000 \times g$  à 4°C puis le surnageant est de nouveau centrifugé 30 min à  $110\ 000 \times g$  à 4°C. Le surnageant représente la fraction cytosolique.

### 8. Test d'interaction protéines/phospholipides (*lipid blot overlay*)

Les essais de *lipid blot overlay* ont été réalisés à l'aide de membranes de nitrocellulose commerciales (PIP Strips P-6001, Echelon) avec des protéines recombinantes purifiées de bactéries ou avec des cytosols dérivés de *Dictyostelium* sur-exprimant éventuellement la protéine d'intérêt.

La membrane présentant les différents lipides à tester est bloquée 1 h sous agitation, à température ambiante dans une solution de blocage (PBS – 0,1 % Tween 20) contenant soit 1 % de lait pour les protéines recombinantes, soit 3 % de BSA dépourvue d'acides gras pour les cytosols. Dans le cas de l'utilisation de cytosol, la membrane est lavée 2 fois en PBS – 0,1 % Tween 20 puis mises en incubation avec le cytosol correspondant à  $5.10^7$  cellules, dilué au  $\frac{1}{2}$  en tampon de casse (40 mM HEPES pH 7,5 ; 110 mM KCl) additionné de 0,5 % de NP40. Dans le cas de protéines recombinantes, les protéines purifiées sont directement ajoutées dans la solution de blocage à raison de 1  $\mu$ g/ml. Après une incubation d'environ 1 h 30, la membrane est lavée en PBS – 0,1 % Tween 20. Les protéines d'intérêt sont ensuite détectées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques dilués dans la solution de blocage initiale. Les spots immunoréactifs sont ensuite révélés par chimioluminescence après incubation avec un anticorps secondaire approprié couplé à la HRP.

### 9. Essais de co-sédimentation avec l'actine-F

Des tests de co-sédimentation avec de l'actine-F ont été réalisés avec la protéine recombinante MBP-FERM. Après purification, la protéine FERM<sub>MBP</sub> est dialysée contre du tampon IME (10 mM Imidazole, pH 7,0 ; 1 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 mM EGTA) et centrifugée à  $100\ 000 \times g$  pour éliminer d'éventuels agrégats. L'actine purifiée de muscle de lapin a été obtenue du laboratoire de L. Blanchoin sous une forme monomérique en tampon G (2 mM Tris, pH 8,0 ; 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT ; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> ; 1 mM azide). Des quantités croissantes d'actine (0 – 30  $\mu$ M) sont mises en présence de protéines FERM<sub>MBP</sub> ou MBP (2  $\mu$ M) en tampon IME contenant une concentration finale d'ATP de 0,2 mM dans un volume final de 150  $\mu$ l. Après 1 h d'incubation à température ambiante, le milieu réactionnel est centrifugé à  $100\ 000 \times g$  pendant 20 min afin de sédimenter l'actine-F. Une fraction du surnageant est conservée (fraction S) et le culot est repris dans 100  $\mu$ l de tampon Laemmli après

élimination totale du surnageant. La quantité de protéine MBP ou FERM<sub>MBP</sub> présente dans le culot est analysée par coloration au bleu de Coomassie ou Western blot après SDS-PAGE.

#### 10. Test de *pull-down*

Pour les expériences de *pull down* visant à tester l'interaction d'AdcA avec l'extrémité N-terminale de FrmC, environ 10<sup>8</sup> cellules sont mises en suspension dans 5 ml de tampon de lyse (1x PBS pH 7,4 ; 1% NP40 ; 2 mM EDTA ; 1 mM PMSF ; 1 µg/ml leupeptine, aprotinine et pepstatine A) et laissées 15 min sur la glace. Après une centrifugation de 5 min à 16000 x g à froid, le surnageant est ajouté à une suspension de billes de glutathion-Sepharose liant GSTFrm<sup>1-334</sup> ou la GST seule (voir paragraphe IV.2). Après 1 h d'incubation sur un agitateur rotatif à 4°C, les billes sont lavées 4 fois avec 1 ml de tampon de lyse et 1 fois avec 1 ml de PBS. Les protéines sont mises en suspension dans du tampon Laemmli, séparées par SDS-PAGE et analysées par Western blot.

Pour les expériences de *pull-down* visant à tester d'éventuelle(s) interaction(s) intramoléculaire(s) de la protéine FrmC, les différents domaines de FrmC fusionnés à la GST ou à la MBP sont exprimés en système bactériens, purifiés sur colonne de billes de glutathion-Sepharose ou d'amylose et en partie élués (voir paragraphe IV.2). Après dosage de la quantité de protéine maintenues sur les billes et présentes dans les différentes fractions d'élution, les volumes de billes et de préparations protéiques sont ajustés pour homogénéiser les conditions d'essai d'interaction pour chacune des protéines testées, par ajout de billes « vides » et de tampon d'élution. Les protéines recombinantes fixées sur les billes sont mises en présence des protéines éluées pendant 3 h à 4°C sur un agitateur rotatif. Après une première centrifugation à 1 000 x g, les billes sont lavées 4 fois en PBS – 1 % Triton X-100 et 1 fois en PBS. Les protéines précipitées sur les billes sont dénaturées en tampon Laemmli et par chauffage 3 min à 94°C et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les interactions inter-domaines sont ensuite contrôlées par Western blot utilisant les anticorps anti-GST ou anti-MBP. Des fractions protéiques contrôles sont prélevées avant (billes et éluats) et après l'étape d'incubation et également analysées par Western blot dans les mêmes conditions.

## BIBLIOGRAPHIE

---



## BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 35518–35525.
- Aizawa, H., Katadae, M., Maruya, M., Sameshima, M., Murakami-Murofushi, K., and Yahara, I. (1999). Hyperosmotic stress-induced reorganization of actin bundles in Dictyostelium cells over-expressing cofilin. *Genes Cells* 4, 311–324.
- Alvarez, C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 8, 222.
- Alvaro, C.G., O'Donnell, A.F., Prosser, D.C., Augustine, A.A., Goldman, A., Brodsky, J.L., Cyert, M.S., Wendland, B., and Thorner, J. (2014). Specific  $\alpha$ -arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein coupled receptor Ste2. *Mol. Cell. Biol.*
- Anthony, D.F., Sin, Y.Y., Vadrevu, S., Advant, N., Day, J.P., Byrne, A.M., Lynch, M.J., Milligan, G., Houslay, M.D., and Baillie, G.S. (2011).  $\beta$ -Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1066–1075.
- Antonescu, C.N., Aguet, F., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2011). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol. Biol. Cell* 22, 2588–2600.
- Araki, T., and Williams, J.G. (2012). Perturbations of the actin cytoskeleton activate a Dictyostelium STAT signalling pathway. *Eur J Cell Biol* 91, 420–425.
- Araki, T., Tsujioka, M., Abe, T., Fukuzawa, M., Meima, M., Schaap, P., Morio, T., Urushihara, H., Katoh, M., Maeda, M., et al. (2003). A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in Dictyostelium. *J Cell Sci* 116, 2907–2915.
- Araki, T., Langenick, J., Gamper, M., Firtel, R.A., and Williams, J.G. (2008). Evidence that DIF-1 and hyper-osmotic stress activate a Dictyostelium STAT by inhibiting a specific protein tyrosine phosphatase. *Development* 135, 1347–1353.
- Araki, T., van Egmond, W.N., van Haastert, P.J., and Williams, J.G. (2010). Dual regulation of a Dictyostelium STAT by cGMP and Ca<sup>2+</sup> signalling. *J Cell Sci* 123, 837–841.
- Ardura, J.A., Wang, B., Watkins, S.C., Vilardaga, J.-P., and Friedman, P.A. (2011). Dynamic Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor-1 Association and Dissociation Regulate Parathyroid Hormone Receptor Trafficking at Membrane Microdomains. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35020–35029.
- Arnaout, M.A., Mahalingam, B., and Xiong, J.-P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 381–410.
- Aster, J.C. (2014). In brief: Notch signalling in health and disease. *J. Pathol.* 232, 1–3.
- Aubry, L., and Firtel, R. (1999). Integration of signaling networks that regulate Dictyostelium differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 469–517.

- Aubry, L., and Firtel, R.A. (1998). Spalten, a protein containing Galpha-protein-like and PP2C domains, is essential for cell-type differentiation in Dictyostelium. *Genes Dev* *12*, 1525–1538.
- Aubry, L., and Klein, G. (2013). True arrestins and arrestin-fold proteins: a structure-based appraisal. *Prog Mol Biol Transl Sci* *118*, 21–56.
- Aubry, L., Guetta, D., and Klein, G. (2009). The arrestin fold: variations on a theme. *Curr Genomics* *10*, 133–142.
- B**ardwell, L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* *26*, 339–350.
- Barnes, W.G., Reiter, E., Violin, J.D., Ren, X.-R., Milligan, G., and Lefkowitz, R.J. (2005). beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* *280*, 8041–8050.
- Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P., and Niggli, V. (2000). Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* *151*, 1067–1080.
- Barthet, G., Carrat, G., Cassier, E., Barker, B., Gaven, F., Pillot, M., Framery, B., Pellissier, L.P., Augier, J., Kang, D.S., et al. (2009). Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT4 receptor signalling. *EMBO J* *28*, 2706–2718.
- Beaty, B.T., Wang, Y., Bravo-Cordero, J.J., Sharma, V.P., Miskolci, V., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2014). Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *The Journal of Cell Biology* *205*, 737–751.
- Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* *122*, 261–273.
- Becuwe, M. (2014). Rôle et Régulation de l'arrestine Rod1/Art4 dans le trafic des transporteurs chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Université Paris Diderot.
- Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenuer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., and Léon, S. (2012). A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* *196*, 247–259.
- Belgareh-Touzé, N., Léon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D., and Haguenuer-Tsapis, R. (2008). Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 791–796.
- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 2797–2801.
- Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987a). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 8879–8882.
- Benovic, J.L., Mayor, F., Staniszewski, C., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1987b). Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* *262*, 9026–9032.

- Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y., and Shenoy, S.K. (2009). The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J.* 28, 1684–1696.
- Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J.L., and Marchese, A. (2007). Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 282, 36971–36979.
- Bhattacharya, M., Anborgh, P.H., Babwah, A.V., Dale, L.B., Dobransky, T., Benovic, J.L., Feldman, R.D., Verdi, J.M., Rylett, R.J., and Ferguson, S.S. (2002). Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4, 547–555.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676–680.
- Boase, N.A., and Kelly, J.M. (2004). A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol. Microbiol.* 53, 929–940.
- Bode, J.G., Gatsios, P., Ludwig, S., Rapp, U.R., Häussinger, D., Heinrich, P.C., and Graeve, L. (1999). The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *J. Biol. Chem.* 274, 30222–30227.
- Bompard, G., Martin, M., Roy, C., Vignon, F., and Freiss, G. (2003). Membrane targeting of protein tyrosine phosphatase PTPN1 through its FERM domain via binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell. Sci.* 116, 2519–2530.
- Bonifacino, J.S., and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 409–414.
- Boullaran, C., Scott, M.G.H., Bourougaa, K., Bellal, M., Esteve, E., Thuret, A., Benmerah, A., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Labbé-Jullié, C., et al. (2007). beta-arrestin 2 oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18061–18066.
- Bozzaro, S., and Eichinger, L. (2011). The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 12, 942–954.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Breshears, L.M., Wessels, D., Soll, D.R., and Titus, M.A. (2010). An unconventional myosin required for cell polarization and chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6918–6923.
- Calcagno-Pizarelli, A.M., Negrete-Urtasun, S., Denison, S.H., Rudnicka, J.D., Bussink, H.-J., Múnera-Huertas, T., Stanton, L., Hervás-Aguilar, A., Espeso, E.A., Tilburn, J., et al. (2007). Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryotic Cell* 6, 2365–2375.
- Calderwood, D.A., Campbell, I.D., and Critchley, D.R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 503–517.
- Campbell, I.D. (2010). The talin FERM domain is not so FERM. *Structure* 18, 1222–1223.
- Campbell, I.D., and Spitzfaden, C. (1994). Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure* 2, 333–337.

- Carvalho, K., Khalifat, N., Maniti, O., Nicolas, C., Arold, S., Picart, C., and Ramos, L. (2010). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced conformational change of ezrin and formation of ezrin oligomers. *Biochemistry* 49, 9318–9327.
- Cha, I., Lee, S.H., and Jeon, T.J. (2010). Chemoattractant-mediated Rap1 activation requires GPCR/G proteins. *Mol. Cells* 30, 563–567.
- Chastagner, P., Israël, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS ONE* 3, e2735.
- Chen, K.S., and DeLuca, H.F. (1994). Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 26–32.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., and Lefkowitz, R.J. (2003a). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391–1394.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.-F., Lefkowitz, R.J., and Blobe, G.C. (2003b). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394–1397.
- Chen, W., Ren, X.-R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., de Sauvage, F., and Lefkowitz, R.J. (2004). Activity-dependent internalization of smoothelin mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 306, 2257–2260.
- Chutkow, W.A., and Lee, R.T. (2011). Thioredoxin regulates adipogenesis through thioredoxin-interacting protein (Txnip) protein stability. *J. Biol. Chem.* 286, 29139–29145.
- Chutkow, W.A., Patwari, P., Yoshioka, J., and Lee, R.T. (2008). Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* 283, 2397–2406.
- Chvatchko, Y., Howald, I., and Riezman, H. (1986). Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell* 46, 355–364.
- Ciobanaru, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2013). Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *European Journal of Cell Biology* 92, 339–348.
- Claing, A. (2013).  $\beta$ -Arrestins: modulators of small GTPase activation and function. *Prog Mol Biol Transl Sci* 118, 149–174.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 42509–42513.
- Coffa, S., Breitman, M., Hanson, S.M., Callaway, K., Kook, S., Dalby, K.N., and Gurevich, V.V. (2011). The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS ONE* 6, e28723.
- Cornillon, S., Gebbie, L., Benghezal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle-Haller, B., Charette, S.J., Brückert, F., Letourneur, F., and Cosson, P. (2006). An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium amoebae* with integrin beta features. *EMBO Rep.* 7, 617–621.
- Cornillon, S., Froquet, R., and Cosson, P. (2008). Involvement of Sib Proteins in the Regulation of Cellular Adhesion in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell* 7, 1600–1605.

- Cosson, P., and Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 271–276.
- Craft, C.M., Whitmore, D.H., and Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* *269*, 4613–4619.
- D**amaghi, M., Wojtkowiak, J.W., and Gillies, R.J. (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol* *4*, 370.
- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Déry, O., Mullins, R.D., and Bunnell, N.W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* *148*, 1267–1281.
- Denker, S.P., Huang, D.C., Orłowski, J., Furthmayr, H., and Barber, D.L. (2000). Direct binding of the Na<sup>+</sup>-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol. Cell* *6*, 1425–1436.
- Díez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* *21*, 1350–1359.
- Dores, M.R., and Trejo, J. (2012). Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Mol. Pharmacol.* *82*, 563–570.
- Dores, M.R., and Trejo, J. (2014). Atypical regulation of G protein-coupled receptor intracellular trafficking by ubiquitination. *Curr. Opin. Cell Biol.* *27*, 44–50.
- Dorey, C., and Faure, J.P. (1977). [Isolation and characterization of a retinal antigen inducing experimental autoimmune uveo-retinitis]. *Ann. Immunol. (Paris)* *128*, 229–232.
- Dowling, J., Yu, Q.C., and Fuchs, E. (1996). Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* *134*, 559–572.
- Draheim, K.M., Chen, H.-B., Tao, Q., Moore, N., Roche, M., and Lyle, S. (2010). ARRDC3 suppresses breast cancer progression by negatively regulating integrin beta4. *Oncogene* *29*, 5032–5047.
- Du, F., Edwards, K., Shen, Z., Sun, B., De Lozanne, A., Briggs, S., and Firtel, R.A. (2008). Regulation of contractile vacuole formation and activity in *Dictyostelium*. *EMBO J.* *27*, 2064–2076.
- Duclos, B., Marcandier, S., and Cozzone, A.J. (1991). Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Meth. Enzymol.* *201*, 10–21.
- Dupré, S., Urban-Grimal, D., and Haguener-Tsapis, R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1695*, 89–111.
- E**ichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., et al. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* *435*, 43–57.
- Elliott, P.R., Goult, B.T., Kopp, P.M., Bate, N., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K., Critchley, D.R., and Barsukov, I.L. (2010). The Structure of the Talin Head Reveals a Novel Extended Conformation of the FERM Domain. *Structure* *18*, 1289–1299.

- Ellis, S.J., Goult, B.T., Fairchild, M.J., Harris, N.J., Long, J., Lobo, P., Czerniecki, S., Van Petegem, F., Schöck, F., Peifer, M., et al. (2013). Talin autoinhibition is required for morphogenesis. *Curr. Biol.* *23*, 1825–1833.
- Epifano, C., and Perez-Moreno, M. (2012). Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adhesion & Migration* *6*, 261–273.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- F**auve, J.P., Dorey, C., Van Tuyen, V., and de Kozak, Y. (1976). Experimental autoimmune uveo-retinitis and specificity of retinal antigens. *Mod Probl Ophthalmol* *16*, 21–29.
- Ferguson, S.S., Barak, L.S., Zhang, J., and Caron, M.G. (1996). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *74*, 1095–1110.
- Fey, P., Stephens, S., Titus, M.A., and Chisholm, R.L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* *159*, 1109–1119.
- Frame, M.C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D., and Eck, M.J. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 802–814.
- Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M.J.S., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J. Cell Biol.* *183*, 865–879.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1256–1272.
- Fuchs, E., Dowling, J., Segre, J., Lo, S.H., and Yu, Q.C. (1997). Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *7*, 672–682.
- G**aidarov, I., and Keen, J.H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* *146*, 755–764.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., and Keen, J.H. (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* *18*, 871–881.
- Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Vincent, O., Arst, H.N., Tilburn, J., and Peñalva, M.A. (2007). PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* *8*, 1346–1364.
- Galindo, A., Calcagno-Pizarelli, A.M., Arst, H.N., and Peñalva, M.Á. (2012). An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J. Cell. Sci.* *125*, 1784–1795.
- Gamper, M., Howard, P.K., Hunter, T., and Firtel, R.A. (1996). Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2431–2444.
- Gamper, M., Kim, E., Howard, P.K., Ma, H., Hunter, T., and Firtel, R.A. (1999). Regulation of *Dictyostelium* protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP3) through osmotic shock and stress stimulation and identification of pp130 as a PTP3 substrate. *J Biol Chem* *274*, 12129–12138.

- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., and Pei, G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* *14*, 303–317.
- Gatsios, P., Terstegen, L., Schliess, F., Häussinger, D., Kerr, I.M., Heinrich, P.C., and Graeve, L. (1998). Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. *J. Biol. Chem.* *273*, 22962–22968.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1223–1234.
- Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J., et al. (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3915–3925.
- Germain, E.C., Santos, T.M., and Rabinovitz, I. (2009). Phosphorylation of a novel site on the {beta}4 integrin at the trailing edge of migrating cells promotes hemidesmosome disassembly. *Mol. Biol. Cell* *20*, 56–67.
- Gimenez, L.E., Kook, S., Vishnivetskiy, S.A., Ahmed, M.R., Gurevich, E.V., and Gurevich, V.V. (2012). Role of receptor-attached phosphates in binding of visual and non-visual arrestins to G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* *287*, 9028–9040.
- Girnita, L., Shenoy, S.K., Sehat, B., Vasilcanu, R., Girnita, A., Lefkowitz, R.J., and Larsson, O. (2005). {beta}-Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* *280*, 24412–24419.
- Godin, C.M., Ferreira, L.T., Dale, L.B., Gros, R., Cregan, S.P., and Ferguson, S.S.G. (2010). The small GTPase Ral couples the angiotensin II type 1 receptor to the activation of phospholipase C-delta 1. *Mol. Pharmacol.* *77*, 388–395.
- Goksoy, E., Ma, Y.-Q., Wang, X., Kong, X., Perera, D., Plow, E.F., and Qin, J. (2008). Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol. Cell* *31*, 124–133.
- Goldberg, J.M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K.E., Xu, Y., and Smith, J.L. (2006). The Dictyostelium Kinome—Analysis of the Protein Kinases from a Simple Model Organism. *PLoS Genetics* *2*, e38.
- Gomez-Raja, J., and Davis, D.A. (2012). The -Arrestin-Like Protein Rim8 Is Hyperphosphorylated and Complexes with Rim21 and Rim101 To Promote Adaptation to Neutral-Alkaline pH. *Eukaryotic Cell* *11*, 683–693.
- Gong, K., Li, Z., Xu, M., Du, J., Lv, Z., and Zhang, Y. (2008). A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* *283*, 29028–29036.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* *383*, 447–450.
- Goult, B.T., Bate, N., Anthis, N.J., Wegener, K.L., Gingras, A.R., Patel, B., Barsukov, I.L., Campbell, I.D., Roberts, G.C.K., and Critchley, D.R. (2009). The structure of an interdomain complex that regulates talin activity. *J. Biol. Chem.* *284*, 15097–15106.

- Granzin, J., Cousin, A., Weirauch, M., Schlesinger, R., Büldt, G., and Batra-Safferling, R. (2012). Crystal structure of p44, a constitutively active splice variant of visual arrestin. *J. Mol. Biol.* *416*, 611–618.
- Groer, C.E., Schmid, C.L., Jaeger, A.M., and Bohn, L.M. (2011). Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* *286*, 31731–31741.
- Guetta, D. (2010). Identification et caractérisation de AdcA, un membre de la famille des arrestines présent chez l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*. Université de Grenoble.
- Guetta, D., Langou, K., Grunwald, D., Klein, G., and Aubry, L. (2010). FYVE-dependent endosomal targeting of an arrestin-related protein in amoeba. *PLoS One* *5*, e15249.
- Gurevich, E.V., and Gurevich, V.V. (2006a). Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* *7*, 236.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2003). The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. *Structure* *11*, 1037–1042.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006b). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* *110*, 465–502.
- Gurevich, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M., Sterne-Marr, R., Hosey, M.M., and Benovic, J.L. (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* *270*, 720–731.
- H**abourdin, C., Klein, G., Araki, T., Williams, J.G., and Aubry, L. (2013). The arrestin-domain containing protein AdcA is a response element to stress. *Cell Commun Signal* *11*, 91.
- Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S., and Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* *19*, 4449–4462.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* *265*, 808–811.
- Han, S.-O., Kommaddi, R.P., and Shenoy, S.K. (2013). Distinct roles for  $\beta$ -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in  $\beta$ 2 adrenergic receptor trafficking. *EMBO Rep.* *14*, 164–171.
- Hanakam, F., Gerisch, G., Lotz, S., Alt, T., and Seelig, A. (1996). Binding of hisactophilin I and II to lipid membranes is controlled by a pH-dependent myristoyl-histidine switch. *Biochemistry* *35*, 11036–11044.
- Hanson, S.M., and Gurevich, V.V. (2006). The differential engagement of arrestin surface charges by the various functional forms of the receptor. *J. Biol. Chem.* *281*, 3458–3462.
- Hanson, S.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Klug, C.S., and Gurevich, V.V. (2006a). Visual arrestin binding to microtubules involves a distinct conformational change. *J. Biol. Chem.* *281*, 9765–9772.
- Hanson, S.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Kolobova, E.A., Hubbell, W.L., Klug, C.S., and Gurevich, V.V. (2006b). Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 4900–4905.

- Hanson, S.M., Cleghorn, W.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Raman, D., Song, X., Nair, K.S., Slepak, V.Z., Klug, C.S., and Gurevich, V.V. (2007a). Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J. Mol. Biol.* *368*, 375–387.
- Hanson, S.M., Van Eps, N., Francis, D.J., Altenbach, C., Vishnivetskiy, S.A., Arshavsky, V.Y., Klug, C.S., Hubbell, W.L., and Gurevich, V.V. (2007b). Structure and function of the visual arrestin oligomer. *EMBO J.* *26*, 1726–1736.
- Hanson, S.M., Vishnivetskiy, S.A., Hubbell, W.L., and Gurevich, V.V. (2008a). Opposing effects of inositol hexakisphosphate on rod arrestin and arrestin2 self-association. *Biochemistry* *47*, 1070–1075.
- Hanson, S.M., Dawson, E.S., Francis, D.J., Van Eps, N., Klug, C.S., Hubbell, W.L., Meiler, J., and Gurevich, V.V. (2008b). A model for the solution structure of the rod arrestin tetramer. *Structure* *16*, 924–934.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor.
- Hasdemir, B., Bunnett, N.W., and Cottrell, G.S. (2007). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. *J. Biol. Chem.* *282*, 29646–29657.
- Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2010). Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 5598–5607.
- Havugimana, P.C., Hart, G.T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A.L., Li, Z., Wang, P.I., Boutz, D.R., Fong, V., Phanse, S., et al. (2012). A census of human soluble protein complexes. *Cell* *150*, 1068–1081.
- Hebda, J.K., Leclair, H.M., Azzi, S., Roussel, C., Scott, M.G., Bidère, N., and Gavard, J. (2013). The C-terminus region of  $\beta$ -arrestin1 modulates VE-cadherin expression and endothelial cell permeability. *Cell Commun. Signal* *11*, 37.
- Henry, A.G., White, I.J., Marsh, M., von Zastrow, M., and Hislop, J.N. (2011). The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of  $\delta$ -opioid receptors. *Traffic* *12*, 170–184.
- Herrador, A., Herranz, S., Lara, D., and Vincent, O. (2010). Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 897–907.
- Herrador, A., León, S., Haguenaer-Tsapis, R., and Vincent, O. (2013). A mechanism for protein monoubiquitination dependent on a trans-acting ubiquitin-binding domain. *J. Biol. Chem.* *288*, 16206–16211.
- Herranz, S., Rodríguez, J.M., Bussink, H.-J., Sánchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Peñalva, M.A., and Vincent, O. (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 12141–12146.
- Hervás-Aguilar, A., Rodríguez, J.M., Tilburn, J., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (2007). Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J. Biol. Chem.* *282*, 34735–34747.
- Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., and Peñalva, M.A. (2010). Receptor-independent Ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *J. Biol. Chem.* *285*, 18095–18102.

- Heuser, J., Zhu, Q., and Clarke, M. (1993). Proton pumps populate the contractile vacuoles of *Dictyostelium amoebae*. *J Cell Biol* *121*, 1311–1327.
- Hibi, M., Nagasaki, A., Takahashi, M., Yamagishi, A., and Uyeda, T.Q.P. (2004). *Dictyostelium discoideum* talin A is crucial for myosin II-independent and adhesion-dependent cytokinesis. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *25*, 127–140.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 195–201.
- Hicke, L., Zanolari, B., and Riezman, H. (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.* *141*, 349–358.
- Himes, R.H., Kersey, R.N., Ruscha, M., and Houston, L.L. (1976). Cytochalasin A inhibits the in vitro polymerization of brain tubulin and muscle actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *68*, 1362–1370.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., and Sigler, P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* *97*, 257–269.
- Hoepfner, C.Z., Cheng, N., and Ye, R.D. (2012). Identification of a nuclear localization sequence in  $\beta$ -arrestin-1 and its functional implications. *J. Biol. Chem.* *287*, 8932–8943.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation. *Meth. Enzymol.* *428*, 29–45.
- Houndolo, T., Boulay, P.-L., and Claing, A. (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 5598–5604.
- Howard, P.K., Sefton, B.M., and Firtel, R.A. (1993). Tyrosine phosphorylation of actin in *Dictyostelium* associated with cell-shape changes. *Science* *259*, 241–244.
- Hwang, J., Suh, H.-W., Jeon, Y.H., Hwang, E., Nguyen, L.T., Yeom, J., Lee, S.-G., Lee, C., Kim, K.J., Kang, B.S., et al. (2014). The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein. *Nat Commun* *5*, 2958.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Imamoto, Y., Tamura, C., Kamikubo, H., and Kataoka, M. (2003). Concentration-dependent tetramerization of bovine visual arrestin. *Biophys. J.* *85*, 1186–1195.
- Insall, R.H. (1996). Cyclic GMP and the big squeeze. *Osmoregulation. Curr Biol* *6*, 516–518.
- Iwaya, N., Takasu, H., Goda, N., Shirakawa, M., Tanaka, T., Hamada, D., and Hiroaki, H. (2013). MIT domain of Vps4 is a Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphoinositide-binding domain. *J. Biochem.* *153*, 473–481.
- Jackson, L.P., Kelly, B.T., McCoy, A.J., Gaffry, T., James, L.C., Collins, B.M., Höning, S., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* *141*, 1220–1229.
- Jee, C., Choi, T.-W., Kalichamy, K., Yee, J.Z., Song, H.-O., Ji, Y.J., Lee, J., Lee, J.I., L'Etoile, N.D., Ahnn, J., et al. (2012). CNP-1 (ARRD-17), a novel substrate of calcineurin, is critical for modulation of egg-laying and locomotion in response to food and lysine sensation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* *417*, 165–178.

- Jenkins, E.C., Debnath, S., Varriano, S., Gundry, S., and Fata, J.E. (2014). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1) function is necessary for maintaining mammary tissue architecture: NHE1 Regulates Mammary Tissue Architecture. *Developmental Dynamics* 243, 229–242.
- Jungbluth, A., Eckerskorn, C., Gerisch, G., Lottspeich, F., Stocker, S., and Schweiger, A. (1995). Stress-induced tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium cells and localization of the phosphorylation site to tyrosine-53 adjacent to the DNase I binding loop. *FEBS Lett.* 375, 87–90.
- Junn, E., Han, S.H., Im, J.Y., Yang, Y., Cho, E.W., Um, H.D., Kim, D.K., Lee, K.W., Han, P.L., Rhee, S.G., et al. (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J. Immunol.* 164, 6287–6295.
- Kahn, E.S., and Matsumoto, H. (1997). Calcium/calmodulin-dependent kinase II phosphorylates Drosophila visual arrestin. *J. Neurochem.* 68, 169–175.
- K**aibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 459–486.
- Kang, D.S., Kern, R.C., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Williams, J.C., and Benovic, J.L. (2009). Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 284, 29860–29872.
- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., et al. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123, 833–847.
- Kang, R., Kae, H., Ip, H., Spiegelman, G.B., and Weeks, G. (2002). Evidence for a role for the Dictyostelium Rap1 in cell viability and the response to osmotic stress. *J Cell Sci* 115, 3675–3682.
- Kern, R.C., Kang, D.S., and Benovic, J.L. (2009). Arrestin2/clathrin interaction is regulated by key N- and C-terminal regions in arrestin2. *Biochemistry* 48, 7190–7200.
- Khurana, B., Khurana, T., Khaire, N., and Noegel, A.A. (2002). Functions of LIM proteins in cell polarity and chemotactic motility. *EMBO J* 21, 5331–5342.
- Kim, G.-H., and Han, J.-K. (2007). Essential role for beta-arrestin 2 in the regulation of Xenopus convergent extension movements. *EMBO J.* 26, 2513–2526.
- Kim, Y.M., and Benovic, J.L. (2002). Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* 277, 30760–30768.
- Kim, K.S., Park, J.-Y., Jou, I., and Park, S.M. (2010). Regulation of Weibel-Palade body exocytosis by alpha-synuclein in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 285, 21416–21425.
- Kim, Y.-M., Barak, L.S., Caron, M.G., and Benovic, J.L. (2002). Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 277, 16837–16846.
- Kim, Y.J., Hofmann, K.P., Ernst, O.P., Scheerer, P., Choe, H.-W., and Sommer, M.E. (2013). Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* 497, 142–146.
- Kiselev, A., Socolich, M., Vinós, J., Hardy, R.W., Zuker, C.S., and Ranganathan, R. (2000). A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in Drosophila. *Neuron* 28, 139–152.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725–732.

- Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* *63*, 9–18.
- Kortholt, A., Keizer-Gunnink, I., Kataria, R., and Van Haastert, P.J.M. (2013). Ras activation and symmetry breaking during Dictyostelium chemotaxis. *Journal of Cell Science* *126*, 4502–4513.
- Kowal, A.S., and Chisholm, R.L. (2011). Uncovering a role for the tail of the Dictyostelium discoideum SadA protein in cell-substrate adhesion. *Eukaryotic Cell* *10*, 662–671.
- Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *38*, 289–319.
- Krupnick, J.G., Santini, F., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1997a). Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem* *272*, 32507–32512.
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1997b). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* *272*, 15011–15016.
- Kühn, H. (1978). Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* *17*, 4389–4395.
- Kuo, L., and Freed, E.O. (2012). ARRDC1 as a mediator of microvesicle budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 4025–4026.
- Kuwayama, H., and Van Haastert, P.J. (1998). Chemotactic and osmotic signals share a cGMP transduction pathway in Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett* *424*, 248–252.
- Kuwayama, H., Ecke, M., Gerisch, G., and Van Haastert, P.J. (1996). Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation. *Science* *271*, 207–209.
- Lagarrigue, E., Ternent, D., Maciver, S.K., Fattoum, A., Benyamin, Y., and Roustan, C. (2003). The activation of gelsolin by low pH: the calcium latch is sensitive to calcium but not pH. *Eur. J. Biochem.* *270*, 4105–4112.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 3712–3717.
- Laporte, S.A., Miller, W.E., Kim, K.-M., and Caron, M.G. (2002). beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J. Biol. Chem.* *277*, 9247–9254.
- Lee, M.-H., El-Shewy, H.M., Luttrell, D.K., and Luttrell, L.M. (2008). Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription. *J. Biol. Chem.* *283*, 2088–2097.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* *145*, 63–73.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F.J., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* *129*, 1177–1187.

- Lima-Fernandes, E., Enslin, H., Camand, E., Kotelevets, L., Boullaran, C., Achour, L., Benmerah, A., Gibson, L.C.D., Baillie, G.S., Pitcher, J.A., et al. (2011). Distinct functional outputs of PTEN signalling are controlled by dynamic association with  $\beta$ -arrestins. *EMBO J.* 30, 2557–2568.
- Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714–725.
- Lin, F.-T., Chen, W., Shenoy, S., Cong, M., Exum, S.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* 41, 10692–10699.
- Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* 272, 31051–31057.
- Lin, F.T., Daaka, Y., and Lefkowitz, R.J. (1998). beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 31640–31643.
- Lin, F.T., Miller, W.E., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 15971–15974.
- Linhoff, M.W., Harton, J.A., Cressman, D.E., Martin, B.K., and Ting, J.P. (2001). Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3001–3011.
- Lipscomb, E.A., Simpson, K.J., Lyle, S.R., Ring, J.E., Dugan, A.S., and Mercurio, A.M. (2005). The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. *Cancer Res.* 65, 10970–10976.
- Liu, T., Mirschberger, C., Chooback, L., Arana, Q., Dal Sacco, Z., MacWilliams, H., and Clarke, M. (2002). Altered expression of the 100 kDa subunit of the Dictyostelium vacuolar proton pump impairs enzyme assembly, endocytic function and cytosolic pH regulation. *J. Cell. Sci.* 115, 1907–1918.
- Liu, X., Shu, S., Hong, M.-S.S., Levine, R.L., and Korn, E.D. (2006). Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13694–13699.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550.
- Luttrell, L.M., and Miller, W.E. (2013). Arrestins as Regulators of Kinases and Phosphatases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 115–147.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., et al. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655–661.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2449–2454.
- M**a, H., Gamper, M., Parent, C., and Firtel, R.A. (1997). The Dictyostelium MAP kinase kinase DdMEK1 regulates chemotaxis and is essential for chemoattractant-mediated activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* 16, 4317–4332.

- MacGurn, J.A., Hsu, P.-C., Smolka, M.B., and Emr, S.D. (2011). TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* *147*, 1104–1117.
- Macia, E., Partisani, M., Paleotti, O., Luton, F., and Franco, M. (2012). Arf6 negatively controls the rapid recycling of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor. *J. Cell. Sci.* *125*, 4026–4035.
- Mahon, M.J. (2009). The parathyroid hormone 1 receptor directly binds to the FERM domain of ezrin, an interaction that supports apical receptor localization and signaling in LLC-PK1 cells. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1691–1701.
- Malerød, L., Pedersen, N.M., Sem Wegner, C.E., Lobert, V.H., Leithe, E., Brech, A., Rivedal, E., Liestøl, K., and Stenmark, H. (2011). Cargo-dependent degradation of ESCRT-I as a feedback mechanism to modulate endosomal sorting. *Traffic* *12*, 1211–1226.
- Malik, R., and Marchese, A. (2010). Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2529–2541.
- Manahan, C.L., Patnana, M., Blumer, K.J., and Linder, M.E. (2000). Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *11*, 957–968.
- Mancuso, V.P., Parry, J.M., Storer, L., Poggioli, C., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H., and Sundaram, M.V. (2012). Extracellular leucine-rich repeat proteins are required to organize the apical extracellular matrix and maintain epithelial junction integrity in *C. elegans*. *Development* *139*, 979–990.
- Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H., and Benovic, J.L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* *5*, 709–722.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., and Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology* *23*, 607–614.
- Marion, S., Fralish, G.B., Laporte, S., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2007). N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* *282*, 18937–18944.
- Martin, N.P., Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *278*, 45954–45959.
- Masuda, K., Shima, H., Watanabe, M., and Kikuchi, K. (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 39002–39011.
- Matsumoto, H., Kurien, B.T., Takagi, Y., Kahn, E.S., Kinumi, T., Komori, N., Yamada, T., Hayashi, F., Isono, K., and Pak, W.L. (1994). Phosrestin I undergoes the earliest light-induced phosphorylation by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* *12*, 997–1010.
- Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* *121*, 2633–2644.
- Mattei, S., Ryves, W.J., Blot, B., Sadoul, R., Harwood, A.J., Satre, M., Klein, G., and Aubry, L. (2005). Dd-Alix, a conserved endosome-associated protein, controls *Dictyostelium* development. *Dev Biol* *279*, 99–113.

- McDonald, P.H., Cote, N.L., Lin, F.T., Premont, R.T., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1999). Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J. Biol. Chem.* *274*, 10677–10680.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., and Lefkowitz, R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* *290*, 1574–1577.
- McLaughlin, N.J.D., Banerjee, A., Kelher, M.R., Gamboni-Robertson, F., Hamiel, C., Sheppard, F.R., Moore, E.E., and Silliman, C.C. (2006). Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires beta-arrestin-1 recruitment and activation of the p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J. Immunol.* *176*, 7039–7050.
- Meng, J., and McKnight, C.J. (2008). Crystal structure of a pH-stabilized mutant of villin headpiece. *Biochemistry* *47*, 4644–4650.
- Meng, D., Lynch, M.J., Huston, E., Beyermann, M., Eichhorst, J., Adams, D.R., Klusmann, E., Klusmann, E., Houslay, M.D., and Baillie, G.S. (2009). MEK1 binds directly to betaarrestin1, influencing both its phosphorylation by ERK and the timing of its isoprenaline-stimulated internalization. *J. Biol. Chem.* *284*, 11425–11435.
- Merhi, A., and André, B. (2012). Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4510–4522.
- Milano, S.K., Pace, H.C., Kim, Y.M., Brenner, C., and Benovic, J.L. (2002). Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* *41*, 3321–3328.
- Milano, S.K., Kim, Y.M., Stefano, F.P., Benovic, J.L., and Brenner, C. (2006). Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J Biol Chem* *281*, 9812–9823.
- Milasta, S., Evans, N.A., Ormiston, L., Wilson, S., Lefkowitz, R.J., and Milligan, G. (2005). The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem. J.* *387*, 573–584.
- Miller, J.L., Fox, D.A., and Litman, B.J. (1986). Amplification of phosphodiesterase activation is greatly reduced by rhodopsin phosphorylation. *Biochemistry* *25*, 4983–4988.
- Miller, W.E., McDonald, P.H., Cai, S.F., Field, M.E., Davis, R.J., and Lefkowitz, R.J. (2001). Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J. Biol. Chem.* *276*, 27770–27777.
- Min, L., Galet, C., and Ascoli, M. (2002). The association of arrestin-3 with the human lutropin/choriogonadotropin receptor depends mostly on receptor activation rather than on receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *277*, 702–710.
- Moore, D.T., Nygren, P., Jo, H., Boesze-Battaglia, K., Bennett, J.S., and DeGrado, W.F. (2012). Affinity of talin-1 for the  $\beta$ 3-integrin cytosolic domain is modulated by its phospholipid bilayer environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 793–798.
- Moore, R.H., Millman, E.E., Godines, V., Hanania, N.A., Tran, T.M., Peng, H., Dickey, B.F., Knoll, B.J., and Clark, R.B. (2007). Salmeterol stimulation dissociates beta2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *36*, 254–261.

- Morton, W.M., Ayscough, K.R., and McLaughlin, P.J. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat. Cell Biol.* 2, 376–378.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat. Cell Biol.* 7, 1191–1201.
- Mukherjee, S., Gurevich, V.V., Preninger, A., Hamm, H.E., Bader, M.-F., Fazleabas, A.T., Birnbaumer, L., and Hunzicker-Dunn, M. (2002). Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2. *J. Biol. Chem.* 277, 17916–17927.
- Müller-Taubenberger, A., Kastner, P.M., Schleicher, M., Bolourani, P., and Weeks, G. (2014). Regulation of a LATS-homolog by Ras GTPases is important for the control of cell division. *BMC Cell Biology* 15, 25.
- Muramoto, T., Kuwayama, H., Kobayashi, K., and Urushihara, H. (2007). A stress response kinase, KrsA, controls cAMP relay during the early development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 305, 77–89.
- Myhre, K., and Blobel, G.A. (2009). The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8221–8226.
- Na, J., Tunggal, B., and Eichinger, L. (2007). STATc is a key regulator of the transcriptional response to hyperosmotic shock. *BMC Genomics* 8, 123.
- Nabhan, J.F., Pan, H., and Lu, Q. (2010). Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep.* 11, 605–611.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 4146–4151.
- Nelson, C.D., Perry, S.J., Regier, D.S., Prescott, S.M., Topham, M.K., and Lefkowitz, R.J. (2007). Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* 315, 663–666.
- Nelson, C.D., Kovacs, J.J., Nobles, K.N., Whalen, E.J., and Lefkowitz, R.J. (2008). Beta-arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Ialpha promotes agonist-stimulated sequestration of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 21093–21101.
- Neuhaus, E.M., Mashukova, A., Barbour, J., Wolters, D., and Hatt, H. (2006). Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J. Cell. Sci.* 119, 3047–3056.
- Nichols, C.D., and Sanders-Bush, E. (2004). Molecular genetic responses to lysergic acid diethylamide include transcriptional activation of MAP kinase phosphatase-1, C/EBP-beta and ILAD-1, a novel gene with homology to arrestins. *J. Neurochem.* 90, 576–584.
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A., and Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 138, 349–361.
- Nikko, E., and Pelham, H.R.B. (2009). Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10, 1856–1867.

- Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R.B. (2008). Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216–1221.
- Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., and Yodoi, J. (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.* 274, 21645–21650.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.-Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the  $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of  $\beta$ -arrestin. *Sci Signal* 4, ra51.
- O**'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., and Cyert, M.S. (2010). Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3552–3566.
- O'Donnell, A.F., Huang, L., Thorner, J., and Cyert, M.S. (2013). A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of  $\alpha$ -arrestin Aly1/Art6. *J. Biol. Chem.* 288, 24063–24080.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 32248–32257.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201–17210.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J. Biol. Chem.* 276, 19452–19460.
- Oehme, F., and Schuster, S.C. (2001). Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem* 2, 2.
- Orejas, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.
- Oser, M., and Condeelis, J. (2009). The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* 108, 1252–1262.
- Ott, A., Oehme, F., Keller, H., and Schuster, S.C. (2000). Osmotic stress response in *Dictyostelium* is mediated by cAMP. *EMBO J* 19, 5782–5792.
- Oyama, M. (1996). cGMP accumulation induced by hypertonic stress in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 271, 5574–5579.
- Oyama, M., and Kubota, K. (1997). H<sup>+</sup> secretion induced by hypertonic stress in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Biochem* 122, 64–70.
- Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., and Stamler, J.S. (2008). S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol. Cell* 31, 395–405.
- P**admanabhan, M., Cournoyer, P., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular Microbiology* 11, 191–198.

- Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., Kirchhausen, T., and Franco, M. (2005). The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J. Biol. Chem.* *280*, 21661–21666.
- Parikh, H., Carlsson, E., Chutkow, W.A., Johansson, L.E., Storgaard, H., Poulsen, P., Saxena, R., Ladd, C., Schulze, P.C., Mazzini, M.J., et al. (2007). TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* *4*, e158.
- Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D., and De Blasi, A. (1993). Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* *268*, 9753–9761.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *11*, 633–643.
- Patel, H., and Barber, D.L. (2005). A developmentally regulated Na-H exchanger in *Dictyostelium discoideum* is necessary for cell polarity during chemotaxis. *J. Cell Biol.* *169*, 321–329.
- Patel, H., and Brunton, V.G. (2009). Loss of FrmA leads to increased cell-cell adhesion and impaired multi-cellular development of *Dictyostelium* cells. *Cell Mol Life Sci* *66*, 145–155.
- Patel, H., Konig, I., Tsujioka, M., Frame, M.C., Anderson, K.I., and Brunton, V.G. (2008). The multi-FERM-domain-containing protein FrmA is required for turnover of paxillin-adhesion sites during cell migration of *Dictyostelium*. *J Cell Sci* *121*, 1159–1164.
- Patwari, P., Higgins, L.J., Chutkow, W.A., Yoshioka, J., and Lee, R.T. (2006). The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* *281*, 21884–21891.
- Patwari, P., Chutkow, W.A., Cummings, K., Verstraeten, V.L.R.M., Lammerding, J., Schreiter, E.R., and Lee, R.T. (2009). Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins. *J. Biol. Chem.* *284*, 24996–25003.
- Patwari, P., Emilsson, V., Schadt, E.E., Chutkow, W.A., Lee, S., Marsili, A., Zhang, Y., Dobrin, R., Cohen, D.E., Larsen, P.R., et al. (2011). The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab.* *14*, 671–683.
- Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P.A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* *101*, 259–270.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* *58*, 425–451.
- Peñas, M.M., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M.A., Arst, H.N., and Tilburn, J. (2007). Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryotic Cell* *6*, 960–970.
- Perroy, J., Pontier, S., Charest, P.G., Aubry, M., and Bouvier, M. (2004). Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods* *1*, 203–208.
- Perry, S.J., Baillie, G.S., Kohout, T.A., McPhee, I., Magiera, M.M., Ang, K.L., Miller, W.E., McLean, A.J., Conti, M., Houslay, M.D., et al. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* *298*, 834–836.

- Pestonjamas, K., Amieva, M.R., Strassel, C.P., Nauseef, W.M., Furthmayr, H., and Luna, E.J. (1995). Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Molecular Biology of the Cell* 6, 247–259.
- Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V.V., De Kozak, Y., Faure, J.P., and Kuhn, H. (1985). Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228, 891–893.
- Pintsch, T., Satre, M., Klein, G., Martin, J.B., and Schuster, S.C. (2001). Cytosolic acidification as a signal mediating hyperosmotic stress responses in *Dictyostelium discoideum*. *BMC Cell Biol* 2, 9.
- Pintsch, T., Zischka, H., and Schuster, S.C. (2002). Hisactophilin is involved in osmoprotection in *Dictyostelium*. *BMC Biochem* 3, 10.
- Polekhina, G., Ascher, D.B., Kok, S.F., Beckham, S., Wilce, M., and Waltham, M. (2013). Structure of the N-terminal domain of human thioredoxin-interacting protein. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 333–344.
- Poupart, M.-E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S.A., and Claing, A. (2007). ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. *Cell. Signal.* 19, 2370–2378.
- Povsic, T.J., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 51334–51339.
- Prabhu, Y., Mondal, S., Eichinger, L., and Noegel, A.A. (2007). A GPCR involved in post aggregation events in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* 312, 29–43.
- Puca, L., Chastagner, P., Meas-Yedid, V., Israël, A., and Brou, C. (2013). A-arrestin 1 (ARRDC1) and  $\beta$ -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J. Cell. Sci.* 126, 4457–4468.
- Puckerin, A., Liu, L., Permaul, N., Carman, P., Lee, J., and Diversé-Pierluissi, M.A. (2006). Arrestin is required for agonist-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J. Biol. Chem.* 281, 31131–31141.
- Pufall, M.A., and Graves, B.J. (2002). Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 421–462.
- Pujol-Carrion, N., Petkova, M.I., Serrano, L., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2013). The MAP Kinase Slt2 Is Involved in Vacuolar Function and Actin Remodeling in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Affected by Endogenous Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6459–6471.
- Pulvermüller, A., Schroder, K., Fischer, T., and Hofmann, K.P. (2000). Interactions of metarhodopsin II. Arrestin peptides compete with arrestin and transducin. *J. Biol. Chem.* 275, 37679–37685.
- Qi, S., O'Hayre, M., Gutkind, J.S., and Hurley, J.H. (2014). Structural and biochemical basis for ubiquitin ligase recruitment by arrestin-related domain-containing protein-3 (ARRDC3). *J. Biol. Chem.* 289, 4743–4752.
- Quack, I., Rump, L.C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T., and Sellin, L. (2006). beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14110–14115.

- R**akhit, S., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2001). Nerve growth factor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells: role of G(i/o), G protein-coupled receptor kinase 2, beta-arrestin I, and endocytic processing. *Mol. Pharmacol.* *60*, 63–70.
- Rauch, S., and Martin-Serrano, J. (2011). Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *J. Virol.* *85*, 3546–3556.
- Ravel, K., de Chasse, B., Cornillon, S., Benghezal, M., Zulianello, L., Gebbie, L., Letourneur, F., and Cosson, P. (2001). Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* *80*, 754–764.
- Reczek, D. (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing Phosphoprotein that Associates with Members of the Ezrin-Radixin-Moesin Family. *The Journal of Cell Biology* *139*, 169–179.
- Reinders, Y., Schulz, I., Gräf, R., and Sickmann, A. (2006). Identification of novel centrosomal proteins in *Dictyostelium discoideum* by comparative proteomic approaches. *J. Proteome Res.* *5*, 589–598.
- Rivero, F., Koppel, B., Peracino, B., Bozzaro, S., Siegert, F., Weijer, C.J., Schleicher, M., Albrecht, R., and Noegel, A.A. (1996). The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci* *109 ( Pt 11)*, 2679–2691.
- Riyahi, T.Y., Frese, F., Steinert, M., Omosigho, N.N., Glöckner, G., Eichinger, L., Orabi, B., Williams, R.S.B., and Noegel, A.A. (2011). RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain, has a role in phagocytosis and anti-bacterial defense. *PLoS ONE* *6*, e27311.
- Robertson, M.A., Woodside, M., Foskett, J.K., Orlowski, J., and Grinstein, S. (1997). Muscarinic agonists induce phosphorylation-independent activation of the NHE-1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in salivary acinar cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 287–294.
- Rodríguez-Galán, O., Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (2009). Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* *284*, 4404–4412.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* *196*, 801–810.
- Roy, C., Martin, M., and Mangeat, P. (1997). A Dual Involvement of the Amino-terminal Domain of Ezrin in F- and G-actin Binding. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 20088–20095.
- S**aito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* *192*, 289–318.
- Salah, Z., Alian, A., and Aqeilan, R.I. (2012). WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Front Biosci (Landmark Ed)* *17*, 331–348.
- Sasaki, A.T., Janetopoulos, C., Lee, S., Charest, P.G., Takeda, K., Sundheimer, L.W., Meili, R., Devreotes, P.N., and Firtel, R.A. (2007). G protein-independent Ras/PI3K/F-actin circuit regulates basic cell motility. *J. Cell Biol.* *178*, 185–191.
- Schandel, K.A., and Jenness, D.D. (1994). Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7245–7255.

- Schmid, E.M., Ford, M.G.J., Burtey, A., Praefcke, G.J.K., Peak-Chew, S.-Y., Mills, I.G., Benmerah, A., and McMahon, H.T. (2006). Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol.* *4*, e262.
- Schönichen, A., Webb, B.A., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2013). Considering protonation as a posttranslational modification regulating protein structure and function. *Annu Rev Biophys* *42*, 289–314.
- Schubert, C., Hirsch, J.A., Gurevich, V.V., Engelman, D.M., Sigler, P.B., and Fleming, K.G. (1999). Visual arrestin activity may be regulated by self-association. *J. Biol. Chem.* *274*, 21186–21190.
- Schulze, P.C., Yoshioka, J., Takahashi, T., He, Z., King, G.L., and Lee, R.T. (2004). Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 30369–30374.
- Schuster, S.C., Noegel, A.A., Oehme, F., Gerisch, G., and Simon, M.I. (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *EMBO J* *15*, 3880–3889.
- Scott, M.G.H., Le Rouzic, E., Périanin, A., Pierotti, V., Enslin, H., Benichou, S., Marullo, S., and Benmerah, A. (2002). Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J. Biol. Chem.* *277*, 37693–37701.
- Scott, M.G.H., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbé-Jullié, C., Pitcher, J.A., and Marullo, S. (2006). Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 3432–3445.
- Shea, F.F., Rowell, J.L., Li, Y., Chang, T.H., and Alvarez, C.E. (2012). Mammalian alpha arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with beta arrestins. *PLoS One* *7*, e50557.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* *278*, 14498–14506.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* *280*, 15315–15324.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* *294*, 1307–1313.
- Shenoy, S.K., Drake, M.T., Nelson, C.D., Houtz, D.A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R.T., Lichtarge, O., and Lefkowitz, R.J. (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *281*, 1261–1273.
- Shenoy, S.K., Barak, L.S., Xiao, K., Ahn, S., Berthouze, M., Shukla, A.K., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2007). Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J. Biol. Chem.* *282*, 29549–29562.
- Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J., and Weissman, A.M. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *283*, 22166–22176.
- Shenoy, S.K., Modi, A.S., Shukla, A.K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K.D., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-

- transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 6650–6655.
- Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2006). The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 540–548.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., and Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 6975–6979.
- Shukla, A.K., Kim, J., Ahn, S., Xiao, K., Shenoy, S.K., Liedtke, W., and Lefkowitz, R.J. (2010). Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *J. Biol. Chem.* *285*, 30115–30125.
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.-C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.-Y., et al. (2013). Structure of active  $\beta$ -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* *497*, 137–141.
- Simonin, A., and Fuster, D. (2010). Nedd4-1 and beta-arrestin-1 are key regulators of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function. *J. Biol. Chem.* *285*, 38293–38303.
- Slessareva, J.E., and Dohlman, H.G. (2006). G protein signaling in yeast: new components, new connections, new compartments. *Science* *314*, 1412–1413.
- Smith, E.W., Lima, W.C., Charette, S.J., and Cosson, P. (2010a). Effect of starvation on the endocytic pathway in Dictyostelium cells. *Eukaryotic Cell* *9*, 387–392.
- Smith, M.T.J., Meissner, J., Esmonde, S., Wong, H.J., and Meiering, E.M. (2010b). Energetics and mechanisms of folding and flipping the myristoyl switch in the -trefoil protein, hisactophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 20952–20957.
- Smith, W.C., Milam, A.H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P.A., and Palczewski, K. (1994). A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *J. Biol. Chem.* *269*, 15407–15410.
- Song, X., Coffa, S., Fu, H., and Gurevich, V.V. (2009). How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J. Biol. Chem.* *284*, 685–695.
- Song, X., Yang, J., Hirbawi, J., Ye, S., Perera, H.D., Goksoy, E., Dwivedi, P., Plow, E.F., Zhang, R., and Qin, J. (2012). A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res.* *22*, 1533–1545.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., and Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* *219*, 493–495.
- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* *13*, 127–144.
- Srivastava, J., Barreiro, G., Groscurth, S., Gingras, A.R., Goult, B.T., Critchley, D.R., Kelly, M.J.S., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2008). Structural model and functional significance of pH-dependent talin-actin binding for focal adhesion remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 14436–14441.

- Steinert, M. (2011). Pathogen-host interactions in Dictyostelium, Legionella, Mycobacterium and other pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 70–76.
- Sterne-Marr, R., Gurevich, V.V., Goldsmith, P., Bodine, R.C., Sanders, C., Donoso, L.A., and Benovic, J.L. (1993). Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J Biol Chem* *268*, 15640–15648.
- Storez, H., Scott, M.G.H., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisand, M., Bouvier, M., et al. (2005). Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 40210–40215.
- Subramanian, S., Woolford, C.A., Desai, J.V., Lanni, F., and Mitchell, A.P. (2012). cis- and trans-acting localization determinants of pH response regulator Rim13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* *11*, 1201–1209.
- Sun, B., Ma, H., and Firtel, R.A. (2003). Dictyostelium stress-activated protein kinase alpha, a novel stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase-like kinase, is important for the proper regulation of the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* *14*, 4526–4540.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* *277*, 49212–49219.
- Sutton, R.B., Vishnivetskiy, S.A., Robert, J., Hanson, S.M., Raman, D., Knox, B.E., Kono, M., Navarro, J., and Gurevich, V.V. (2005). Crystal structure of cone arrestin at 2.3Å: evolution of receptor specificity. *J. Mol. Biol.* *354*, 1069–1080.
- Suzuki, K., and Namiki, H. (2007). Cytoplasmic pH-dependent spreading of polymorphonuclear leukocytes: regulation by pH of PKC subcellular distribution and F-actin assembly. *Cell Biol. Int.* *31*, 279–288.
- Szabó, E.Z., Numata, M., Lukashova, V., Iannuzzi, P., and Orłowski, J. (2005). beta-Arrestins bind and decrease cell-surface abundance of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE5 isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2790–2795.
- T**an, C.M., Brady, A.E., Nickols, H.H., Wang, Q., and Limbird, L.E. (2004). Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 559–609.
- Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., and Nishida, E. (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J. Biol. Chem.* *276*, 26629–26639.
- Tepass, U. (2009). FERM proteins in animal morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* *19*, 357–367.
- Thathiah, A., Horré, K., Snellinx, A., Vandeweyer, E., Huang, Y., Ciesielska, M., De Kloe, G., Munck, S., and De Strooper, B. (2013). β-arrestin 2 regulates Aβ generation and γ-secretase activity in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* *19*, 43–49.
- Thomason, P.A., Traynor, D., Stock, J.B., and Kay, R.R. (1999). The RdeA-RegA system, a eukaryotic phospho-relay controlling cAMP breakdown. *J. Biol. Chem.* *274*, 27379–27384.
- Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* *277*, 9429–9436.

- Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 6258–6267.
- Tsujioka, M., Yoshida, K., and Inouye, K. (2004). Talin B is required for force transmission in morphogenesis of *Dictyostelium*. *EMBO J.* *23*, 2216–2225.
- Tsujioka, M., Yumura, S., Inouye, K., Patel, H., Ueda, M., and Yonemura, S. (2012). Talin couples the actomyosin cortex to the plasma membrane during rear retraction and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 12992–12997.
- Tulipano, G., Stumm, R., Pfeiffer, M., Kreienkamp, H.-J., Höllt, V., and Schulz, S. (2004). Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* *279*, 21374–21382.
- Turunen, O., Wahlström, T., and Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J. Cell Biol.* *126*, 1445–1453.
- Tuxworth, R.I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G.C., Soll, D.R., Gerisch, G., and Titus, M.A. (2001). A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* *11*, 318–329.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J. Cell. Sci.* *122*, 199–206.
- Vishnivetskiy, S.A., Schubert, C., Climaco, G.C., Gurevich, Y.V., Velez, M.G., and Gurevich, V.V. (2000). An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 41049–41057.
- Vishnivetskiy, S.A., Hirsch, J.A., Velez, M.-G., Gurevich, Y.V., and Gurevich, V.V. (2002). Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J. Biol. Chem.* *277*, 43961–43967.
- Vishnivetskiy, S.A., Hosey, M.M., Benovic, J.L., and Gurevich, V.V. (2004). Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J Biol Chem* *279*, 1262–1268.
- Vishnivetskiy, S.A., Francis, D., Van Eps, N., Kim, M., Hanson, S.M., Klug, C.S., Hubbell, W.L., and Gurevich, V.V. (2010). The role of arrestin alpha-helix I in receptor binding. *J. Mol. Biol.* *395*, 42–54.
- Vishnivetskiy, S.A., Gimenez, L.E., Francis, D.J., Hanson, S.M., Hubbell, W.L., Klug, C.S., and Gurevich, V.V. (2011). Few residues within an extensive binding interface drive receptor interaction and determine the specificity of arrestin proteins. *J. Biol. Chem.* *286*, 24288–24299.
- Wacker, W.B. (1972). Autoimmune uveitis (choroiditis) in the guinea pig sensitized with homologous uvea and its differentiation from that following sensitization with homologous retina. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* *43*, 39–52.
- Wacker, W.B., and Kalsow, C.M. (1976). The role of uveal and retinal antigens in experimental autoimmune ocular pathology. *Mod Probl Ophthalmol* *16*, 12–20.
- Wacker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeelov, J.A., and Organisciak, D.T. (1977). Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.* *119*, 1949–1958.

- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Physiol. Rev.* *77*, 51–74.
- Walther, C., and Ferguson, S.S.G. (2013). Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci* *118*, 93–113.
- Wang, P., and DeFea, K.A. (2006). Protease-activated receptor-2 simultaneously directs beta-arrestin-1-dependent inhibition and G $\alpha$ q-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemistry* *45*, 9374–9385.
- Wang, P., Wu, Y., Ge, X., Ma, L., and Pei, G. (2003a). Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J. Biol. Chem.* *278*, 11648–11653.
- Wang, P., Gao, H., Ni, Y., Wang, B., Wu, Y., Ji, L., Qin, L., Ma, L., and Pei, G. (2003b). Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J. Biol. Chem.* *278*, 6363–6370.
- Wang, P., Kumar, P., Wang, C., and Defea, K.A. (2007a). Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 alpha and beta by protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *Biochem. J.* *408*, 221–230.
- Wang, P., Kumar, P., Wang, C., and Defea, K.A. (2007b). Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 alpha and beta by protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *Biochem. J.* *408*, 221–230.
- Wang, W., Eddy, R., and Condeelis, J. (2007c). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 429–440.
- Wang, Y., Tang, Y., Teng, L., Wu, Y., Zhao, X., and Pei, G. (2006). Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* *7*, 139–147.
- Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* *21*, 3919–3926.
- Wilden, U., Hall, S.W., and Kühn, H. (1986a). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 1174–1178.
- Wilden, U., Wüst, E., Weyand, I., and Kühn, H. (1986b). Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett.* *207*, 292–295.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S.H.M., and Sonnenberg, A. (2006). Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2877–2886.
- Wilkin, M.B., Carbery, A.-M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S.L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D.A.P., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr. Biol.* *14*, 2237–2244.
- Willoughby, E.A., and Collins, M.K. (2005). Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* *280*, 25651–25658.

- De Wit, J., Hong, W., Luo, L., and Ghosh, A. (2011). Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 697–729.
- Witherow, D.S., Garrison, T.R., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2004). beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 8603–8607.
- Wu, N., Hanson, S.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Thibonnier, M., Klug, C.S., Shoham, M., and Gurevich, V.V. (2006). Arrestin binding to calmodulin: a direct interaction between two ubiquitous signaling proteins. *J. Mol. Biol.* *364*, 955–963.
- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., et al. (2013). AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol. Cell* *49*, 1167–1175.
- Wyatt, D., Malik, R., Vesecky, A.C., and Marchese, A. (2011). Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *286*, 3884–3893.
- Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R., and Lefkowitz, R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12011–12016.
- Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villén, J., Haas, W., Kovacs, J.J., Shukla, A.K., Hara, M.R., et al. (2010). Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 15299–15304.
- Xu, T.-R., Baillie, G.S., Bhari, N., Houslay, T.M., Pitt, A.M., Adams, D.R., Kolch, W., Houslay, M.D., and Milligan, G. (2008). Mutations of beta-arrestin 2 that limit self-association also interfere with interactions with the beta2-adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: implications for beta2-adrenoceptor signalling via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem. J.* *413*, 51–60.
- Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S., and Matsubara, K. (1987). Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *142*, 904–910.
- Yamaki, K., Tsuda, M., Kikuchi, T., Chen, K.H., Huang, K.P., and Shinohara, T. (1990). Structural organization of the human S-antigen gene. cDNA, amino acid, intron, exon, promoter, in vitro transcription, retina, and pineal gland. *J. Biol. Chem.* *265*, 20757–20762.
- Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Fujii, G., Kanetaka, K., Asaka, M., and Hirohashi, S. (2001). Cloning and characterization of a novel gene, DRH1, down-regulated in advanced human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *7*, 297–303.
- Yates, L.A., Lumb, C.N., Brahma, N.N., Zalyte, R., Bird, L.E., De Colibus, L., Owens, R.J., Calderwood, D.A., Sansom, M.S.P., and Gilbert, R.J.C. (2012). Structural and Functional Characterization of the Kindlin-1 Pleckstrin Homology Domain. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 43246–43261.
- Ye, F., Snider, A.K., and Ginsberg, M.H. (2014). Talin and kindlin: the one-two punch in integrin activation. *Frontiers of Medicine* *8*, 6–16.
- Yonemura, S. (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of Cell Biology* *140*, 885–895.

- Zhan, X., Gimenez, L.E., Gurevich, V.V., and Spiller, B.W. (2011). Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J. Mol. Biol.* *406*, 467–478.
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Ferguson, S.S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* *274*, 10999–11006.
- Zhang, P., Wang, C., Gao, K., Wang, D., Mao, J., An, J., Xu, C., Wu, D., Yu, H., Liu, J.O., et al. (2010). The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* *285*, 8869–8879.
- Zischka, H., Oehme, F., Pintsch, T., Ott, A., Keller, H., Kellermann, J., and Schuster, S.C. (1999). Rearrangement of cortex proteins constitutes an osmoprotective mechanism in *Dictyostelium*. *EMBO J* *18*, 4241–4249.
- Zoncu, R., Perera, R.M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D., and De Camilli, P.V. (2007). Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 3793–3798.
- Zoudilova, M., Kumar, P., Ge, L., Wang, P., Bokoch, G.M., and DeFea, K.A. (2007). Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.* *282*, 20634–20646.
- Zoudilova, M., Min, J., Richards, H.L., Carter, D., Huang, T., and DeFea, K.A. (2010). beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of protease-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.* *285*, 14318–14329.
- Zuckerman, R., and Cheasty, J.E. (1986). A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett.* *207*, 35–41.



## ANNEXES

---



**Annexe 1 : Séquence de la protéine AdcA**

1/1  
 ATG AAT TAC CAA GTA ACT GTT TCA GGT GAT CCA GAA CTT GCA CAA GAA AGT GTT GAT TTC GTA TCA AGT GGA TTT GGT AAT ATG TCA ATG  
 M N Y Q V T V S G D P E L A Q E S V D F V S S G F G N M S M

31/11  
 61/21

91/31  
 AAT GTA AAT ACC ACC TCA AGT CAT CAT CAT CAT CAT AGC AAT AGT GGT AAT GCT GAA GTT TCA TTC AAT GGT GGA TTT GGT ATG CCA AAT  
 N V N T T S S H H H H H S N S G N A E V S F N G G F G M P N

121/41  
 151/51

181/61  
 ATG ACT ATG GAA GTC AAA GAA ACT CAT AGT GGT CAC CAT CAC CAC CAT AGT AAT GGT GGT AAT GCA GAA ATC TCA ATT AAC AGT GGA TTT  
 M T M E V K E T H S G H H H H H S N G G N A E I S I N S G F

211/71  
 241/81

271/91  
 GGT ATG CCA TCT ATG ACA ATG TCA GTC ACA GAT AGT AAT AGT GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT AAA GAA AGT GCA TCA GTT AAT TTA TCA  
 G M P S M T M S V T D S N S G H H H H H H K E S A S V N L S

301/101  
 331/111

361/121  
 TTA GGT GGT ATT GTT GGA GCA GTT GTT GGT GCA GTT ACT GGT GGT GTT ATG ATT GAT GGT CGT AAT CGT ATT TGG GTG CAA TTG AAT CAA  
 L G G I V G A V V G A V T G G V M I D G R N R I W V Q L N Q

391/131  
 421/141

451/151 **NdeI** **EcoRV**  
 TCA TCA TAT GTC GGT GGT GAT ATC ATT AGT GGT ACA ATT GAA ATG GAC TGT ATA GTG CCA TTC TTT GCC AAA GGT GTC ATT GTC AAA GTT  
 S S Y V G G D I I S G T I E M D C I V P F F A K G V I V K V

481/161  
 511/171

541/181  
 AAA GGT TTT GAA AGA TTA TGG CTT CAA GAA CTT CGT ACT GAA ACT GAA GGT GAG GGC TCA AAC AAA CGT ACA GTT TAT AAA ACC ATT GAT  
 K G F E R L W L Q E L R T E T E G E G S N K R T V Y K T I D

571/191  
 601/201

631/211  
 CAT AAA GAA AAT AAA GAA TTT TTC AAA TCA ACA ATT GTT GTT TAT CCA CAA GCA GGT ACA GTT AAT TGT GGA CAT TAT AGT TTC CCA TTT  
 H K E N K E F F K S T I V V Y P Q A G T V N C G H Y S F P F

661/221  
 691/231

721/241  
 TCA TAT CAA TTA CCA TCA GAT TTA CCA GGC ACA TTT TGT CAT GAT GGT AAG GAT GCA ATG GGA GCA TAT TCA GCA AAG ATT TTA TAT AAA  
 S Y Q L P S D L P G T F C H D G K D A M G A Y S A K I L Y K

751/251  
 781/261

811/271  
 TGT AAA GCA ACC GTT GAT GTT GCA CAT AAA CAC GAT TTG AAA TCA ACT ACT AAA TTA ATT ATC AAT GAG AAA TGT GGT GAA TTG GTT CAA  
 C K A T V D V A H K H D L K S T T K L I I N E K C G E L V Q

841/281  
 871/291

901/301  
 CCA AGT TTT GCA GAG AAT AAG AAA TCA TTC ATG TTG ACC AAA GGT AAA TTG CAT GTA AAG ACA TGG TTG AAT AAG AAT GCC TAT TTC CCA  
 P S F A E N K K S F M L T K G K L H V K T W L N K N A Y F P

991/331  
 GGC GAG ACA TTG GTT GCC AAA ATG AAG GCA AAC AAT ACC TCA ATT AAA CCA ACT AGA **AAG ATC TCA** TTG GTG GTA CAC CAT ACA ATG CAA  
 G E T L V A K M K A N N T S I K P T R K I S L V V H H T M Q

1081/361  
 TTG AAG ACA CGT CTT TAT CAT CGT TGT ATC ACC AAT GCA ATT TAT AAA CAG CAA TAC GAC GGC TTC CAA CCA TGC TTC TAT GGC AAG CGT  
 L K T R L Y H R C I T N A I Y K Q Q Y D G F Q P C F Y G K R

1171/391  
 TAT CTC CCA TTC TCA ATA CCA GTG GAT TTG AAA CCA TCA TCT TCC TTG GGT AAA CAT ATC ACA AGT AGC TAT CTA TTG GAG TTG GAG TGC  
 Y L P F S I P V D L K P S S S L G K H I T S S Y L L E L E C

1261/421 **EcoRV**      **ClaI**  
**GAT ATC** CCA ATG GCA **ATC GAT** TTA TCT GTA ACC TTG CCA TTG ACC TTA TTC GCC CCA CAA TTC CTC TAC AGC ACT GTA CCA TCT CAA CCA  
 D I P M A I D L S V T L P L T L F A P Q F L Y S T V P S Q P

1351/451  
 CCA GGT ACT CCA TTA CCA CCT GAT GTC TCA TAT CGT CAT **CCA TGG** GAA GGT GAT GAA CAT GCT ACC GCT TGT CGT AAA TGT AAT AAA GGA  
 P G T P L P P D V S Y R H P W E G D E H A T A C R K C N K G

1441/481  
 TTT AGT TTG TTT GCT CGT AAA CAT CAT TGT CGT CAT TGT ATG AAG ATT TTC TGT GAT AAA TGT ACC TCA ACC AAA ACT ACA ATC ACT AAA  
 F S L F A R K H H C R H C M K I F C D K C T S T K T T I T K

1531/511  
 TTA GCT TAT CCA AAA CCA GTT CGT GTT TGT GAA GAA TGT TAT CCA ATC GCA ACT CAA GGT GGT AAC AAA TAT CAA TCA GCT AAA TTA ATG  
 L A Y P K P V R V C E E C Y P I A T Q G G N K Y Q S A K L M

1621/541  
 GCT GCT CAA TAT CAA GCA AGT TTA AAT GCT TAT TAT GCT CAA TAT GCT TCT TTA TAT CCA CAA ATT TAT CCA GAT CAA CAA CAA CAA CAA  
 A A Q Y Q A S L N A Y Y A Q Y A S L Y P Q I Y P D Q Q Q Q Q

1711/571  
 CAA CAA CCA TCT GCT CCA CCA CAA CAA TAT TAA  
 Q Q P S A P P Q Q Y \*

931/311  
 ATG TTG ACC AAA GGT AAA TTG CAT GTA AAG ACA TGG TTG AAT AAG AAT GCC TAT TTC CCA  
 M L T K G K L H V K T W L N K N A Y F P

1021/341  
 AAC AAT ACC TCA ATT AAA CCA ACT AGA **AAG ATC TCA** TTG GTG GTA CAC CAT ACA ATG CAA  
 N N T S I K P T R K I S L V V H H T M Q

1111/371  
 ACC AAT GCA ATT TAT AAA CAG CAA TAC GAC GGC TTC CAA CCA TGC TTC TAT GGC AAG CGT  
 T N A I Y K Q Q Y D G F Q P C F Y G K R

1141/381  
 GGC TTC CAA CCA TGC TTC TAT GGC AAG CGT  
 G F Q P C F Y G K R

1201/401  
 AAA CCA TCA TCT TCC TTG GGT AAA CAT ATC ACA AGT AGC TAT CTA TTG GAG TTG GAG TGC  
 K P S S S L G K H I T S S Y L L E L E C

1231/411  
 ACA AGT AGC TAT CTA TTG GAG TTG GAG TGC  
 T S S Y L L E L E C

1291/431  
 ACC TTG CCA TTG ACC TTA TTC GCC CCA CAA TTC CTC TAC AGC ACT GTA CCA TCT CAA CCA  
 T L P L T L F A P Q F L Y S T V P S Q P

1321/441  
 TTC CTC TAC AGC ACT GTA CCA TCT CAA CCA  
 F L Y S T V P S Q P

1381/461      **NcoI**  
**CCA TGG** GAA GGT GAT GAA CAT GCT ACC GCT TGT CGT AAA TGT AAT AAA GGA  
 P W E G D E H A T A C R K C N K G

1411/471  
 ACC GCT TGT CGT AAA TGT AAT AAA GGA  
 T A C R K C N K G

1471/491  
 CGT CAT TGT ATG AAG ATT TTC TGT GAT AAA TGT ACC TCA ACC AAA ACT ACA ATC ACT AAA  
 R H C M K I F C D K C T S T K T T I T K

1501/501  
 TGT ACC TCA ACC AAA ACT ACA ATC ACT AAA  
 C T S T K T T I T K

1561/521  
 GAA GAA TGT TAT CCA ATC GCA ACT CAA GGT GGT AAC AAA TAT CAA TCA GCT AAA TTA ATG  
 E E C Y P I A T Q G G N K Y Q S A K L M

1591/531  
 GGT AAC AAA TAT CAA TCA GCT AAA TTA ATG  
 G N K Y Q S A K L M

1651/551  
 TAT TAT GCT CAA TAT GCT TCT TTA TAT CCA CAA ATT TAT CCA GAT CAA CAA CAA CAA CAA  
 Y Y A Q Y A S L Y P Q I Y P D Q Q Q Q Q

1681/561  
 CAA ATT TAT CCA GAT CAA CAA CAA CAA CAA  
 Q I Y P D Q Q Q Q Q

1741/581  
 TAT TAA  
 Y \*

**Annexe 2 : Séquence de la protéine FrmC**

```

1/1                               31/11                               61/21
|                                 |                                 |
ATG GAA GGT GTG GAA GAT GAT TTA TCA AAA TTA TTA GAA GAA TTA TCA TCA GGT GTT GTT TTA AAT AAT ATT CAA GAG AAA TTG AAT CAA
M E G V E D D L S K L L E E L S S G V V L N N I Q E K L N Q

91/31                             121/41                             151/51
|                                 |                                 |
TCA TCA CCA AAG TTA CAA AGT TTT ATT GAT GAT GAA ACT GGA AGT AAT GCA GAA GAT GTT AGA AGA GTG TTA GAT GCA GCA ACA GAT ACA
S S P K L Q S F I D D E T G S N A E D V R R V L D A A T D T

181/61                           211/71                           241/81
|                                 |                                 |
GAG TCA AAC TAT GGT GGT GGA GCC AAC TCA ATT ACA AAT ACA CCA AAT TTT AAT TCT CAT AGG GGA CAT CAA CAT CTT CAG CTT CAT ACA
E S N Y G G G A N S I T N T P N F N S H R G H Q H L Q L H T

271/91                           301/101                          331/111
|                                 | EcoRI |                                 |
GAG TTA TCA TTA GAT GCA CTT AGA CCA GTA TCA GAG AAT TCA CCA TTA CAC AAA AGT GCA ACA AGA CCA ATC TCA ACT TCT ATT AGA TTA
E L S L D A L R P V S E N S P L H K S A T R P I S T S I R L

361/121                          391/131                          421/141
|                                 |                                 |
CCA AGA TTA AGT GTT TGT GAG GAT GAT AGT TCA TCA TCT TCT TCT TCA TCC GAT GGT GAC TCT AAT AGC TCA TCA GAT TCA TCT GAT AAT
P R L S V C E D D S S S S S S S S D G D S N S S S D S S D N

451/151                          481/161                          511/171
|                                 |                                 |
TCA TCA GAA CAA TCA GAT GAT GAT GAT GTT CAT CTT CAT CTT CAT CTT CAT CGT CAT CAT AGA AAA GTG AAA GAA GAT GAA GGA GAT TCA
S S E Q S D D D D V H L H L H L H R H H R K V K E D E G D S

541/181                          571/191                          601/201
|                                 |                                 | HindIII
TTT GAA TCA TCA TCA GAA TCA TCA GAA CAA TAT GGA TCT CCA AGT ACT TTA AGA AGA CAA GAA GCT TTA AAA CTT GAA AAA ATA ATG CAA
F E S S S E S S E Q Y G S P S T L R R Q E A L K L E K I M Q

631/211                          661/221                          691/231
|                                 |                                 |
ATT CAA GAG AAA AAG AAA TTA TTA AAA GAG AAA TTA AAA GAA CAA GAT GAA TTA GAA TTA AAA GAA AAA CAA GAA TTA AAT GAA ATT ACA
I Q E K K K L L K E K L K E Q D E L E L K E K Q E L N E I T

```

721/241   GTT CAA AAA GAA ATA AAA TTA AAA GAT AAG V Q K E I K L K D K	751/251   TCA AAT TCA GTT CAA AAT GAT ATT GTT GAT S N S V Q N D I V D	781/261   AGT GAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT S D N N N N N N N N N
811/271   AAT TCA ATA <b>MfeI</b> GAA GAA CAA CAA CAA N S I T I E E Q Q Q	841/281   GAA AAA CAA CAA CAA CAA CAA CAC CAC E K Q Q Q Q Q Q H H	871/291   CAC CAC CAT TCA ACA CCA AAT AAA CCA CCA H H H S T P N K P P
901/301   AAA <b>XbaI</b> TCT AGA TCA GTT TCA ATA TCT ACA CCA K S R S V S I S T P	931/311   GAT TCA AAT ATT GTT GTT GCA GGT GGC AAT D S N I V V A G G N	961/321   GTA ATT AGT AAA GAG AGA AAG AGA TCA ATT V I S K E R K R S I
991/331   TTA GCA TCA TTT GAA GAG GGT TCA CCA ATG L A S F E E G S P M	1021/341   AGA TCA TCT TCA AGA TTA CCA TCA <b>XbaI</b> R S S S R L P S S R	1051/351   GGT GGT TCA ATT AAA ATC AAA GTT TCA AAG G G S I K I K V S K
1081/361   GTT TTA GAA GAA GAA ATG CAA CTT CAA CAA V L E E E M Q L Q Q	1111/371   GAA TTT GAA AAA CAA GAA CAA CTT AGA CAC E F E K Q E Q L R H	1141/381   TCT GCT AGA TTA AGT CAA TTA ATT AGA GAT S A R L S Q L I R D
1171/391   TTA AAT ATG TCT TCA AAT TTA CAA GAT CAA L N M S S N L Q D Q	1201/401   CAA GAT CAA CAA TTA AGA AAA AAT GAA AAT Q D Q Q L R K N E N	1231/411   AGT AAT AAC AAC GAG GGT GAT GAT AAC AAT S N N N E G D D N N
1261/421   GAA AAT GTT TCA AAT GAT AAT AGT AGT GAT E N V S N D N S S D	1291/431   AAT GAA AAT CAA AAT ATT AAT GGT TCA ATT N E N Q N I N G S I	1321/441   TTA ATT AAA GAA GAA CAA CAA GAA AAG ATA L I K E E Q Q E K I
1351/451   GAA ATA ACT ACA ACC ATA ACA ACT GTA ATA E I T T T I T T V I	1381/461   ACA CCA CCA CCA CCA GCA CAA GAA CCA CAA T P P P P A Q E P Q	1411/471   CAC CAA CAA CAA CCA AAA ATA TTA ACA CCA H Q Q Q P K I L T P

1441/481		1471/491		1501/501
GAA GAA GTA GAA GAA GAA AGA ATT AGA GTA TTA AGA ATT GAA AGA ATG AAA GAT CAA GTA TTT TCA <b>MfeI</b> GAT GAA TTA GAG <b>BamHI</b>		TTA AGA ATT GAA AGA ATG AAA GAT CAA GTA TTT TCA <b>CAA TTG</b> GAT GAA TTA GAG <b>GAT CCA</b>		TTT TCA <b>CAA TTG</b> GAT GAA TTA GAG <b>GAT CCA</b>
E E V E E E R I R V L R I E R M K D Q V F S Q L D E L E D P		L R I E R M K D Q V F S Q L D E L E D P		Q L D E L E D P
1531/511		1561/521		1591/531
TTA TAT TCA AAT GGA AGT AGA CAA CGT AAT GGT GGT GGT GGT GGC GCA TCA ACA AGT GCA GAA CCA TCA ATG ATG CAA ATT CCA TTG ACA		GGT GGT GGT GGT GGC GCA TCA ACA AGT GCA GAA CCA TCA ATG ATG CAA ATT CCA TTG ACA		GAA CCA TCA ATG ATG CAA ATT CCA TTG ACA
L Y S N G S R Q R N G G G G G G A S T S A E P S M M Q I P L T		G G G G G A S T S A E P S M M Q I P L T		E P S M M Q I P L T
1621/541		1651/551		1681/561
AGA TTA GAG GAT ACT GCA TCA TCA TCA TCA TCA CCA ACA TTA CAA GCA ACC AAA ACA ACT ACA ACC ACT ACA ACT ACA ACC ACT ACA ACC		TCA CCA ACA TTA CAA GCA ACC AAA ACA ACT ACA ACC ACT ACA ACT ACA ACC ACT ACA ACC		ACA ACC ACT ACA ACT ACA ACC ACT ACA ACC
R L E D T A S S S S S S P T L Q A T K T T T T T T T T T T T T T T T		C C A T T A C A A C C A A C A C T A C C A C T A C C A C T A C C		A C C A C T A C C A C C
1711/571		1741/581		1771/591
ACA ACA GCA ACA TTA CCA ATA AAT AAT AAA AAT TTA AAT ATT CAA GGT AGA CCA AGA AAA GAT TCA ATT TCA GAT CAT TGG GAT ATT GGT		AAT TTA AAT ATT CAA GGT AGA CCA AGA AAA GAT TCA ATT TCA GAT CAT TGG GAT ATT GGT		GAT TCA ATT TCA GAT CAT TGG GAT ATT GGT
T T A T L P I N N K N L N I Q G R P R K D S I S D H W D I G		N L N I Q G R P R K D S I S D H W D I G		D S I S D H W D I G
1801/601		1831/611		1861/621
AGA AAA GAA CAA CCA CGT CGT TCA ATG ACA TTG AAT ATT CAA AGA GTT GGT GAG GAC TTT TCA GTA AAG AAA GCA GAG GCA AAG AAA GTT		TTG AAT ATT CAA AGA GTT GGT GAG GAC TTT TCA GTA AAG AAA GCA GAG GCA AAG AAA GTT		TCA GTA AAG AAA GCA GAG GCA AAG AAA GTT
R K E Q P R R S M T L N I Q R V G E D F S V K K A E A K K V		L N I Q R V G E D F S V K K A E A K K V		S V K K A E A K K V
1891/631		1921/641		1951/651
AAT CCT GAT CTT GAA AAG ATA TTG GTA CAC AAT TCA TTG GTT GAT CAA TCT CAC AAG GTT AAT TGT ATC ACA GAG GAT TTT ACA GTT AAA		AAT TCA TTG GTT GAT CAA TCT CAC AAG GTT AAT TGT ATC ACA GAG GAT TTT ACA GTT AAA		AAT TGT ATC ACA GAG GAT TTT ACA GTT AAA
N P D L E K I L V H I S L V D Q S H K V I C I T E D F T V K		I S L V D Q S H K V I C I T E D F T V K		I C I T E D F T V K
1981/661		2011/671		2041/681
GAT GTT ATC GAC CTC TTT TCC GAG AAA TTA GGG TTA GTT CAA ACT <b>EcoRI</b> TTT TCA TTG GCA GAG GTT ACA TCG GAT GGC TAT GAT AGA		GGG TTA GTT CAA ACT <b>GAA TTC</b> TTT TCA TTG GCA GAG GTT ACA TCG GAT GGC TAT GAT AGA		GCA GAG GTT ACA TCG GAT GGC TAT GAT AGA
D V I D L F S E K L G L V Q T E F F S L A E V T S D G Y D R		L V Q T E F F S L A E V T S D G Y D R		A E V T S D G Y D R
2071/691		2101/701		2131/711
TGG <b>BamHI</b> <b>GAT CCA</b> AAT AGA GCG GTT AAA GAA GCT GGT ATT AAA AAC CTA TCA AAG TTA ACA TTT AAA ATC AAA TAT TTC AAA CAA CCA AAG		GCT GGT ATT AAA AAC CTA TCA AAG TTA ACA TTT AAA ATC AAA TAT TTC AAA CAA CCA AAG		TTT AAA ATC AAA TAT TTC AAA CAA CCA AAG
W L D P N R A V K E A G I K N L S K L T F K I K Y F K Q P K		A G I K N L S K L T F K I K Y F K Q P K		F K I K Y F K Q P K
2161/721		2191/731		2221/741
AAG CTA TCT GAT AGT AAA GCA GTT CAT TTA TAC TAT TTA CAA ATT CAA CAA TCC GTT GTA AAT GGT ACA TAC CCA TGT TCA GAG GCA ATG		TAC TAT TTA CAA ATT CAA CAA TCC GTT GTA AAT GGT ACA TAC CCA TGT TCA GAG GCA ATG		AAT GGT ACA TAC CCA TGT TCA GAG GCA ATG

K L S D S K A V H L Y Y L Q I Q Q S V V N G T Y P C S E A M  
 2251/751 | 2281/761 | 2311/771  
 TCC TAC AGA TTA AGT GCA CTT CAA TTC TAC ATT ACA TTT GGT GCA TTC GAT AAG GAT AAA CAT ATA GCA GGC TTC CTT GAT CAT GGT TCA  
 S Y R L S A L Q F Y I T F G A F D K D K H I A G F L D H G S  
 2341/781 | 2371/791 | 2401/801  
 TTA TCA GAG TTT ATA CCT TCA AAC TTT TTC TTT GAA CTC ACT GAT GAG GTC ATT CAA AAA CGT CTT TTC CAT TTA CAT TCT CAA ATT AAA  
 L S E F I P S N F F F E L T D E V I Q K R L F H L H S Q I K  
 2431/811 | 2461/821 | 2491/831  
 TGT AGT TCA AGT ATT GAA GCA AAA CTT AGA TAT TTA GAT TTG GCA AAT AAA ATT CCA ACC TTT GGT GTC ACA TCT TTC CAA GTT TTC GAT  
 C S S S I E A K L R Y L D L A N K I P T F G V T S F Q V F D  
 2521/841 | 2551/851 | 2581/861  
 GGT ATT CGT GAA TCA TCA ATC GTT AGA CAA AAA CGA CAT CTT TGT GTA GCT GAA GAT GGT ATC TTA ATC **XbaI**  
 G I R E S S I V R Q K R H L C V A E D G I L I S R K D R A G **TCT AGA** AAA GAT AGA GCA GGT  
 2611/871 | 2641/881 | 2671/891  
 TAT GAT TTC TTT AGT TAT AAA GAA ATT ATA TCT TAT CAA GTT ACA ACT AGA GGT TTA AAA ATT CAA ATT CCA CAT TCT TCA ATA ACT CCA  
 Y D F F S Y K E I I S Y Q V T T R G L K I Q I P H S S I T P  
 2701/901 | 2731/911 | 2761/921  
 AAT ACA TCA GAA ACA ATG AGT TTT GAT ACA TCA **NdeI** TCA **TCA TAT** GAT CAA TCG AAT AAT ATT ATA GAT TTA ATG ATG GGA TAT AAA TAT TTC ATT  
 N T S E T M S F D T S S Y D Q S N N I I D L M M G Y K Y F I  
 2791/931 | 2821/941 | 2851/951  
 CAA CAT GAT GAA TTT ATA AGA GGT ATT GGT GCA CCA GTT GAA CAA GTT GAT TTA AAT ATT TCT TTA TTG TTA CCA TTA TTT CAA CCA CCA  
 Q H D E F I R G I G A P V E Q V D L N I S L L L P L F Q P P  
 2881/961 | 2911/971 | 2941/981  
 AAA ATT AGA ACA AAG AGT GAT CCA CTT CGT AGT CGT TTA GAG TTA TTC AAA TTG AAT TAT CTT GGA CTC TGT CAA AAT TTC CAT ACA AAA  
 K I R T K S D P L R S R L E L F K L N Y L G L C Q N F H T K  
 2971/991 | 3001/1001 | 3031/1011  
 | | **XbaI** |

CCA ATC TCA AAA TTA ATT GAT CAA ATT GAT TAC ATT **CTA GAT** AAA GAA GGT TCA TTT AGA AAT CGT TTA GCA TTT GAA AAA GTT GAA TTA  
 P I S K L I D Q I D Y I L D K E G S F R N R L A F E K V E L

3061/1021 3091/1031 3121/1041  
 | | |  
 CCA TCT TTA AAT TTA AGA GGT TCT GAT TTA TCT TTT ATT GCT GAT GCT TTA AAA GAT ACT TTA AAT TTA ATA ATT GAA GAA GGT GAA AGT  
 P S L N L R G S D L S F I A D A L K D T L N L I I E E G E S

3151/1051 3181/1061 3211/1071  
 | | |  
 ATT GTT GAA AAT TTA AAT ATT TTA TCA TTA GAT TTA TCA AAT AAT CCA TTA TTG GCA ACT **GAT GCA TTT** GAA CCA TTA AAA ATT ATT ATG  
 I V E N L N I L S L D L S N N P L L A T D A F E P L K I I M

3241/1081 3271/1091 3301/1101  
 | | |  
 ACT TGT AAT ACA ATT ATT CAC TTA AAT TTA AAG AAT ATA GGT TTA TCA AAT AAA GGT GTT ATG CCG TTA GTA ACA ATT ATT GAA AAA TAT  
 T C N T I I H L N L K N I G L S N K G V M P L V T I I E K Y

3331/1111 3361/1121 3391/1131  
 | | |  
 CCA AAT ATT GAA ACA TTA CAA ATT GGT AAG AAT AGA GTT AAT GAA TCA GGT GTC AGA GTT ATT TTA AGA GCA ATT AAG AAT TTT AAT GTA  
 P N I E T L Q I G K N R V N E S G V R V I L R A I K N F N V

3421/1141 3451/1151 3481/1161  
 | | |  
 AAG ATT GAA ACA CTT GGA TTT GAA GAA ACC AAT TTA ACC GAT TCA GGT TGT TTA ATT ATT GAT AAA CTT TTA TCA AAT AAT AAA ACC ATA  
 K I E T L G F E E T N L T D S G C L I I D K L L S N N K T I

3511/1171 3541/1181 3571/1191  
 | | |  
 AAG AAT TTA AAT ATT TCT AAA AAT CTT ATC ACT GAA GAA GGT TTT CAT CAT ATA TTC GAA GGT ATT AAA AGA AAT AGT CTT AGT TTA **CAA**  
 K N L N I S K N L I T E E G F H H I F E G I K R N S L S L Q

3601/1201 3631/1211 3661/1221  
 | | |  
**BglII**  
**GAT CTC** AAT ATA AGT GGT AAT AAA ATC AAT AGT AAA CTT ATG ATT AAA TTC ATT AAA TGG TTA GCT TCA AGT GAA ACT TCA ATC ATA ACT  
 D L N I S G N K I N S K L M I K F I K W L A S S E T S I I T

3691/1231 3721/1241 3751/1251  
 | | |  
 TTA AAT ATT GCT AAA ACT GGT TTA GAA TCT TCA TTT GGT GCT GAA CTC CAA AAA TTC TTG GTT GGT AAT AGT TGT CAT ATT AAA TCT TTG  
 L N I A K T G L E S S F G A E L Q K F L V G N S C H I K S L

3781/1261 3811/1271 3841/1281

	GAT ACT TCT TAT AAT GAT TTG GGT ACT TCT		GGT ACT AAA AAT GTT ATC AAA GGT ATT ATC		AAT AAT CAA ACC ATT ACA GAG TTA TCA CTT	
D	T S Y N D L G T S	G	T K N V I K G I I	N	N Q T I T E L S L	
3871/1291		3901/1301		3931/1311		
	TGT GCT AAT AAA ATT AGT TCA AGT GGT TGT		AAT GAT TTA TGT CAA TCT TTG GAA TTA GCT		TCT GCA ACT TGT TCA AAA TTA TAT TTA CGT	
C	A N K I S S S G C	N	D L C Q S L E L A	S	A T C S K L Y L R	
3961/1321		3991/1331		4021/1341		
	CAT TGT GGT TTA GGT TCA AGT TCA TTA GTT		AGA ATT GCA AAT ATG TTA GAA CTA AAT AAA		ACT ATT ACA ACT TTA GAT TTA TCA ATG AAT	
H	C G L G S S S L V	R	I A N M L E L N K	T	I T T L D L S M N	
4051/1351		4081/1361		4111/1371		
	GAA TTT TCT AAA TCT TCA TCA AGT	<b>MfeI</b>		GGA ACA ATG TTA GAA AAA AAT GAA ACA CTT		CAA GAG TTT TAT TTA GCA GAT TCA AGT TTA
E	F S K S S S S A I	G	T M L E K N E T L	Q	E F Y L A D S S L	
4141/1381		4171/1391		4201/1401		
	GGT GCA AGA GAA GTT GAA TCT ATT TTG AAT		GGT TTA AAG AAT AAT TCA ACA ATT AAA AAA		ATA TTT TTA GAT ACC AAT CCG ATT GGT AAA	
G	A R E V E S I L N	G	L K N N S T I K K	I	F L D T N P I G K	
4231/1411		4261/1421		4291/1431		
	AAA GGT ATT TCA TCA CTT GCA AAT ATG TTA		AAT ACA AAT ACA GGA TTG GAA GTA ATA ACA		TTA AGA CAC ACA AAC TTA AAT GGA AAA GAT	
K	G I S S L A N M L	N	T N T G L E V I T	L	R H T N L N G K D	
4321/1441		4351/1451		4381/1461		
	ATT TTA GAA TTA TTA AAA CAA TTA TCT ACA		AAT ATC CCA ATT AAA ATC ATT AAT TTA ACT		GAA AAT ACT TTA GAT AAA ATC ACT CCA CAA	
I	L E L L K Q L S T	N	I P I K I I N L T	E	N T L D K I T P Q	
4411/1471		4441/1481				
	ATT AAA AAT GCA ATT AAT GAT CAA ATT AAA		AGA CTT CAT ACA ATC AAT ATT CAA TAT TAA			
I	K N A I N D Q I K	R	L H T I N I Q Y *			

RESEARCH

Open Access

# The arrestin-domain containing protein AdcA is a response element to stress

Clémence Habourdin<sup>1,2,3</sup>, Gérard Klein<sup>1,2,3</sup>, Tsuyoshi Araki<sup>4</sup>, Jeffrey G Williams<sup>4</sup> and Laurence Aubry<sup>1,2,3,5\*</sup>

## Abstract

**Background:** Cell behaviour is tightly determined by sensing and integration of extracellular changes through membrane detectors such as receptors and transporters and activation of downstream signalling cascades. Arrestin proteins act as scaffolds at the plasma membrane and along the endocytic pathway, where they regulate the activity and the fate of some of these detectors. Members of the arrestin clan are widely present from unicellular to metazoa, with roles in signal transduction and metabolism. As a soil amoeba, *Dictyostelium* is frequently confronted with environmental changes likely to compromise survival. Here, we investigated whether the recently described arrestin-related protein AdcA is part of the cell response to stresses.

**Results:** Our data provide evidence that AdcA responds to a variety of stresses including hyperosmolarity by a transient phosphorylation. Analysis in different mutant backgrounds revealed that AdcA phosphorylation involves pathways other than the DokA and cGMP-dependent osmopressure pathways, respectively known to regulate PKA and STATc, key actors in the cellular response to conditions of hyperosmolarity. Interestingly, however, both AdcA and STATc are sensitive to changes in the F-actin polymerization status, suggesting a common primary sensor/trigger and linking the stress-sensitive kinase responsive for AdcA phosphorylation to the actin cytoskeleton. We also show that STATc-dependent transcriptional activity is involved for the timely dephosphorylation of AdcA in cells under stress.

**Conclusion:** Under osmotic stress, AdcA undergoes a phosphorylation-dephosphorylation cycle involving a stress-sensitive kinase and the transcription regulator STATc. This transient post-transcriptional modification may allow a regulation of AdcA function possibly to optimize the cellular stress response.

**Keywords:** Arrestin, Stress, STAT transcription factor, Hyperosmolarity, *Dictyostelium*, Phosphorylation

## Background

Cells are continuously subjected to environmental cues that determine their behaviour in terms of motility, adhesion, growth and differentiation. Their capacity to sense and respond to external stimuli largely relies on membrane proteins including receptors, adhesion molecules, channels and transporters that function as sensors and signal transducers. In the cytoplasm, adaptor proteins from the arrestin clan play key roles in the signal relay, acting downstream of transmembrane spanning proteins at the plasma membrane or/and along the endocytic pathway. A well-characterized system is the coupling of  $\beta$ -arrestins to ligand-activated G-protein coupled receptors

(GPCRs) allowing their temporal desensitization, their trafficking to specific endocytic compartments and the activation of secondary signalling cascades [1-5]. Over the past few years, a family of arrestin-related proteins have been identified in mammals (Arrdcs) as well as in lower organisms such as fungi (ARTs) and amoebae (Adcs) [6-9]. Recent data indicated that ART adaptor proteins regulate the fate of plasma membrane permeases through a conserved ubiquitination-dependent pathway in response to changes in nutritive or pH conditions. ARTs allow the recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase to the vicinity of membrane targets, leading to their ubiquitination and subsequent degradation [8,10-13]. The functions of Arrdcs are still under investigation but recent studies indicate that these proteins could similarly behave as ubiquitin ligase adaptors allowing the regulated ubiquitination of plasma

\* Correspondence: laubry@cea.fr

<sup>1</sup>CEA, iRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France

<sup>2</sup>Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France

Full list of author information is available at the end of the article

membrane targets and their ensuing downregulation [14,15].

The social amoeba *Dictyostelium* harbours 6 arrestin-domain containing proteins (AdcA to F). Their expression is highly regulated during the developmental cycle but the role of the Adcs at the different stages of the developmental program is completely enigmatic. In contrast to canonical visual and  $\beta$ -arrestins, the *Dictyostelium* Adcs contain additional functional domains besides the arrestin core, including lipid binding- and protein-protein interaction domains [7]. The AdcA protein is extended on both sides of the arrestin core by an N-terminal histidine-rich domain and a C-terminal FYVE domain. This latter domain contributes to the constitutive association of AdcA to the endocytic pathway [16]. The AdcA protein is most highly expressed during the unicellular growth phase of *Dictyostelium*. At this stage, cells are faced with a broad range of environmental changes, ranging from hypo- or hyperosmotic conditions to nutrient deprivation and their survival in such conditions relies on multiple and complex strategies. Hyperosmotic challenge activates an intricate transcriptionally regulated osmotic stress response [17].

Our data presented here provide evidence that AdcA undergoes a massive phosphorylation in response to a variety of stresses, including hypertonicity, and that AdcA dephosphorylation is partly dependent on a STATc pathway and correlates with cell recovery, raising the question of a possible role of AdcA in stress response.

## Results

### AdcA is multiphosphorylated in response to sorbitol-induced hyperosmotic stress

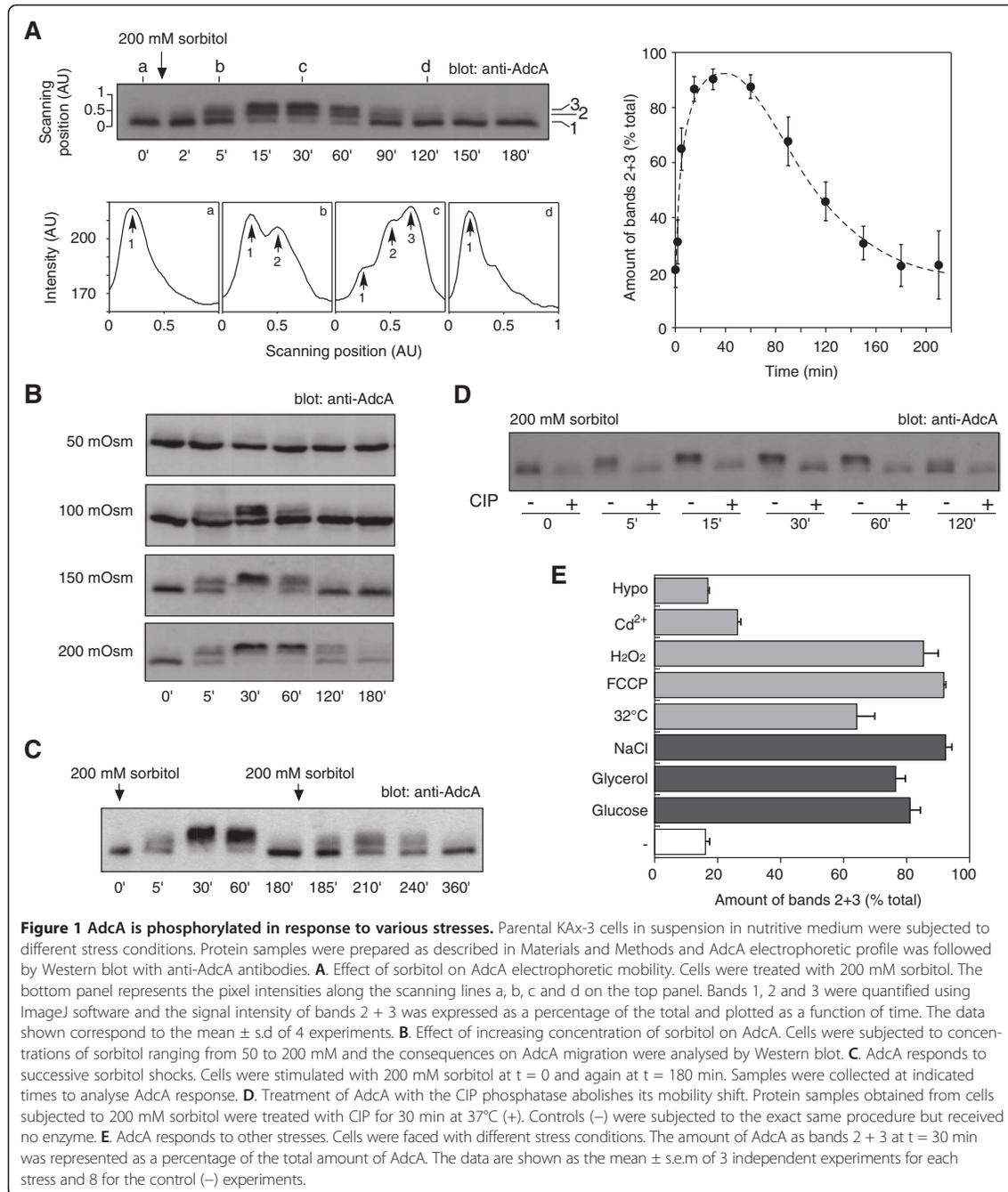
In preliminary experiments, we observed that changes of external medium (12 mM Na,K-Pi buffer vs HL5 axenic medium) affected the electrophoretic pattern of the AdcA protein. We therefore examined the impact of various cellular stresses especially osmotic stress to determine the signal(s) responsible for this modification. In our assays, exponentially growing cells were centrifuged, resuspended in fresh nutritive medium and left to recover in shaking suspension for at least 1 h 30 prior to stress application. This protocol avoided, thereafter, any possible stress due to centrifugation (transient anaerobiosis, mechanical constraints, temperature shift) and nutrient depletion. In these conditions, in KAx-3 cells, AdcA was detected as a major higher mobility form and occasionally a minor slower form (Figure 1A, bands 1 and 2). Addition of 200 mM sorbitol to the medium led to a massive and transient modification of the protein. Within minutes after sorbitol addition, the electrophoretic mobility of AdcA gradually decreased with the accumulation of band 2 and the appearance of a slow migrating third band (Figure 1A, band 3). A similar mobility change was observed with the C-terminally tagged

versions of AdcA, AdcA<sub>GFP</sub> (Figure 2) and AdcA<sub>myc</sub> (not shown) indicating that the tagged and overexpressed proteins behave as the endogenous AdcA. Maximal amount of band 3 occurred past 30 min post stress application (Figure 1A, right panel). Within the next hour, bands 2 and 3 of AdcA progressively disappeared in favour of the fast migrating band, leading to a migration pattern at 120 min after stimulation comparable to that observed in untreated cells. The extent and duration of each phase was dose-dependent as illustrated on Figure 1B on KAx-3 subjected to increasing concentrations of sorbitol (50 to 200 mM). Treatment of the cells with a second sorbitol-mediated osmotic challenge 180 min after the first shock resulted in a new round of AdcA response (yet not as efficient), indicating that the cells were able to reactivate the pathway(s) governing AdcA response and therefore, at least partially, recover from stress (Figure 1C).

To identify the type of modification(s) responsible for AdcA shift, protein samples were treated with calf intestine phosphatase (CIP) to test the possibility of phosphorylation. As shown in Figure 1D, CIP treatment of protein samples from sorbitol-stressed cells harbouring bands 2 and 3 restored the band 1-migration pattern of unstimulated cells (fast migrating species) while buffer alone had no effect. Similar results were obtained with  $\lambda$ -phosphatase (not shown). These data strongly suggest that AdcA is modified by multiple phosphorylations when subjected to hyperosmotic stress. The dephosphorylation protocol we used includes a step of sample concentration by precipitation in trichloroacetic acid. Such conditions are unlikely to maintain the acid-labile phosphorylation of residues such as histidine and aspartate. Because the use of several phospho-tyrosine specific antibodies failed to detect any phospho-AdcA in an AdcA immunoprecipitate, we currently favor the hypothesis of a phosphorylation on serine/threonine residues.

### AdcA is modified in response to various stresses

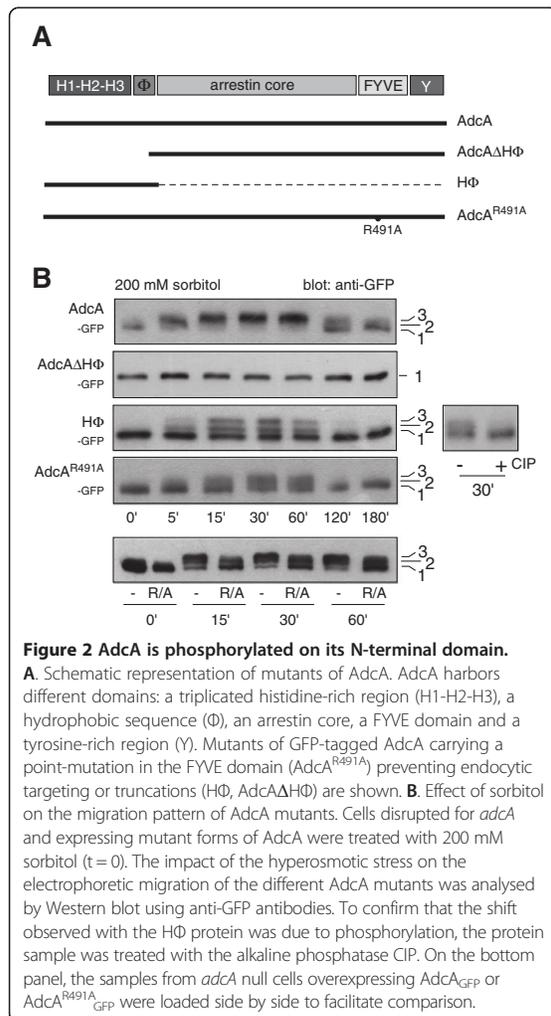
To determine whether AdcA response to sorbitol reflected a general sensitivity to osmotic stresses, other hyperosmotic agents were tested. As shown on Figure 1E, 200 mOsm concentrations of glucose, glycerol or NaCl were all capable of triggering AdcA phosphorylation. As observed for sorbitol, the effect of NaCl is similarly dose-dependent (not shown). Conversely, a hyposmotic shock obtained by shifting the cells from axenic medium to 5-fold diluted medium (130 mOsm to 26 mOsm) did not affect AdcA behaviour (Figure 1E, Hypo). To evaluate whether AdcA phosphorylation is part of a general stress response, cells were subjected to non-osmotically active stresses. AdcA responded equally well to heat shock (32°C), mitochondrial uncoupler (10  $\mu$ M FCCP), oxidative stress (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) but only weakly to a 50  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup> treatment, indicating that AdcA is sensitive to a large variety of cell stresses



**Figure 1 AdcA is phosphorylated in response to various stresses.** Parental KAx-3 cells in suspension in nutritive medium were subjected to different stress conditions. Protein samples were prepared as described in Materials and Methods and AdcA electrophoretic profile was followed by Western blot with anti-AdcA antibodies. **A.** Effect of sorbitol on AdcA electrophoretic mobility. Cells were treated with 200 mM sorbitol. The bottom panel represents the pixel intensities along the scanning lines a, b, c and d on the top panel. Bands 1, 2 and 3 were quantified using ImageJ software and the signal intensity of bands 2 + 3 was expressed as a percentage of the total and plotted as a function of time. The data shown correspond to the mean  $\pm$  s.d of 4 experiments. **B.** Effect of increasing concentration of sorbitol on AdcA. Cells were subjected to concentrations of sorbitol ranging from 50 to 200 mM and the consequences on AdcA migration were analysed by Western blot. **C.** AdcA responds to successive sorbitol shocks. Cells were stimulated with 200 mM sorbitol at t = 0 and again at t = 180 min. Samples were collected at indicated times to analyse AdcA response. **D.** Treatment of AdcA with the CIP phosphatase abolishes its mobility shift. Protein samples obtained from cells subjected to 200 mM sorbitol were treated with CIP for 30 min at 37°C (+). Controls (-) were subjected to the exact same procedure but received no enzyme. **E.** AdcA responds to other stresses. Cells were faced with different stress conditions. The amount of AdcA as bands 2 + 3 at t = 30 min was represented as a percentage of the total amount of AdcA. The data are shown as the mean  $\pm$  s.e.m of 3 independent experiments for each stress and 8 for the control (-) experiments.

(Figure 1E). The pathways activated in response to heat shock, energetic and oxidative stresses have not been characterized in details but given our results, it is possible that they all share an effector, common to the osmolarity cascade leading to AdcA phosphorylation.

**AdcA is phosphorylated on the N-terminal H $\Phi$  domain**  
 Besides its central arrestin core, the adaptor protein AdcA contains a PI(3)P-binding FYVE domain in the C-terminal part and a histidine-rich triplicated region that extends the protein N-terminally. To localize the site(s)



of phosphorylation, the effect of 200 mM sorbitol was measured on truncated forms of AdcA,  $\text{AdcA}\Delta\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  and the  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  expressed in both a KAx-3 and *adcA* null background to exclude a possible interference of the endogenous AdcA (Figure 2A). The construct  $\text{AdcA}_{\text{GFP}}$  was used as a control. A mobility shift induced by sorbitol with the appearance of two slower migrating forms and reversed by CIP treatment was observed for the  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  construct in both cell backgrounds but was completely lost in  $\text{AdcA}\Delta\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  indicating that the N-terminal domain of AdcA contains the phosphorylation sites critical for the shift and the appropriate context for the recruitment of the required kinase and phosphatase (Figure 2B, not shown for the KAx-3 background). Nevertheless, even though the kinetics of phosphorylation

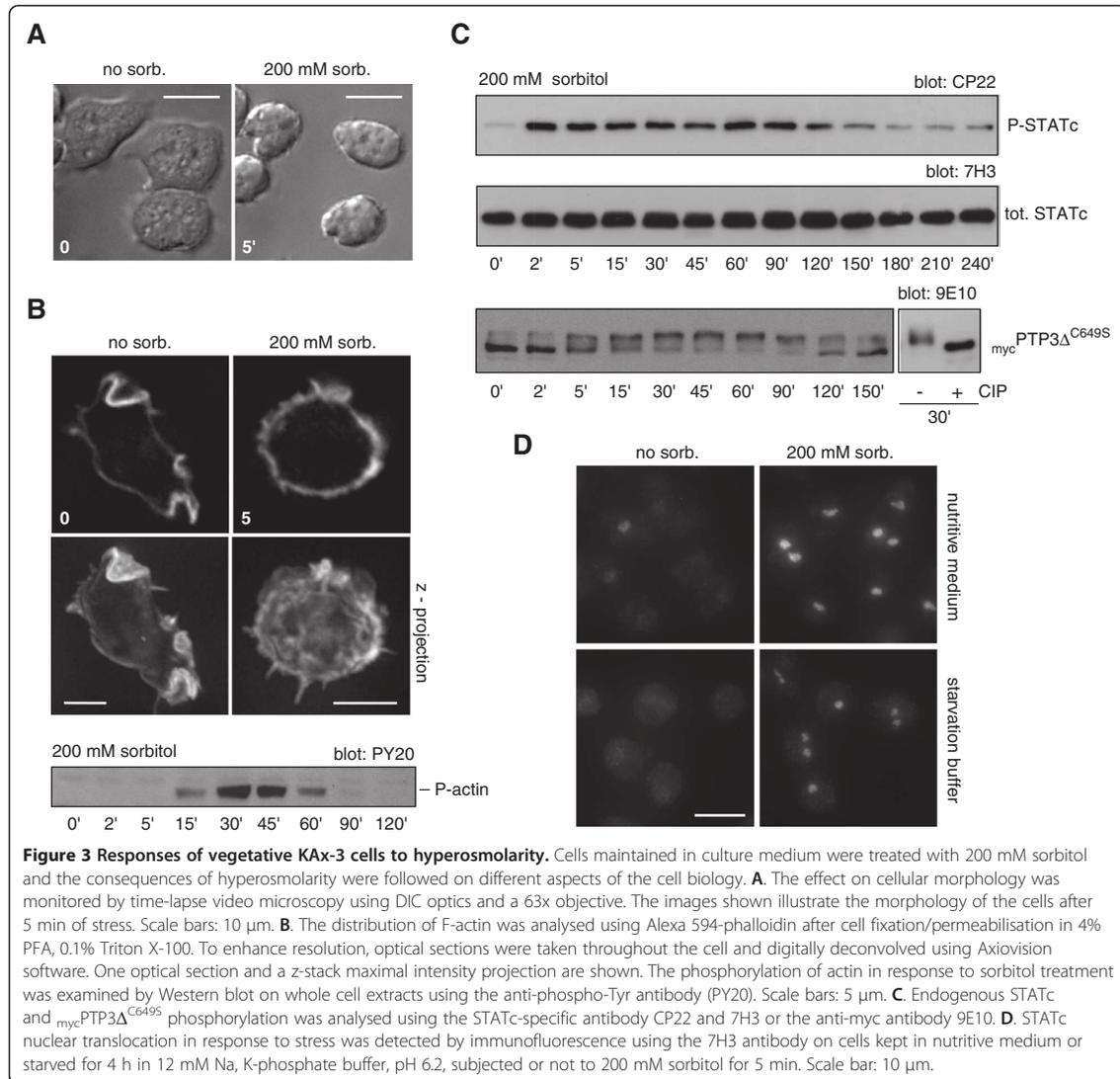
of the  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  protein is the same as that of endogenous AdcA and  $\text{AdcA}_{\text{GFP}}$ , the extent of phosphorylation is different with roughly  $50 \pm 4\%$  ( $n = 3$ ) of total  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  in the bands 2 + 3 at 30 min post-shock versus  $81 \pm 8\%$  ( $n = 3$ ) for the full-length  $\text{AdcA}_{\text{GFP}}$  protein. This difference could possibly be attributed to the higher level of expression of  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  and a limiting level of kinase activity. Alternatively, if the subcellular localisation of  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  were distinct from that of AdcA, this could also interfere with the phosphorylation efficiency. Indeed, while AdcA is massively associated with the endocytic apparatus, the  $\text{H}\Phi$  construct is mostly found in the cytosol [16]. Another mutant of AdcA,  $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$  that is unable to bind  $\text{PI}(3)\text{P}$ , fails to localize to the endocytic compartments [16]. Similarly to  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$   $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$  phosphorylation is partial, despite an expression level comparable to that of  $\text{AdcA}_{\text{GFP}}$  supporting a correlation between the endocytic localization and the phosphorylation level of the protein rather than a phosphorylation level mirroring the expression level of the constructs (Figure 2A, B).

The  $\text{H}\Phi$  domain of AdcA contains 31 serines/threonines (and 2 tyrosine residues), precluding a systematic point-mutation approach to test their relative contribution to the phosphorylation pattern. Attempts to map the phosphorylated site(s) by mass spectrometry on the immunoprecipitated  $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$  protein were so far unsuccessful.

#### Vegetative cells and starved cells confronted by hypertonicity share common features

In nutritive conditions, *Dictyostelium* cells multiply actively as single cells (vegetative state) and nutrient depletion triggers a developmental program leading to a multicellular structure containing starvation-resistant spores. In *Dictyostelium*, the consequences of a hyperosmotic stress have been well characterized on cells starved for a 1–4 h period of time and several effectors of the osmoresponse have been identified [18–26]. Hyperosmotic conditions trigger a variety of responses, such as cell shrinkage, cytoskeleton rearrangement and actin/myosin phosphorylation. High osmolarity responses include a rapid and transient accumulation of intracellular cAMP and of intracellular cGMP that functions, in parallel to  $\text{Ca}^{2+}$ -based pathways, to activate the stress-activated transcription factor STATc [19,21,26,27].

To position AdcA in the osmoresponse signaling network, we first compared the stress response of growing KAx-3 cells to that of starving cells. When treated with 200 mM sorbitol, vegetative cells rounded up and shrunk rapidly, stopped their random motility and detached progressively from the substratum (Figure 3A, Additional file 1: Movie 1). Actin redistributed uniformly around the cell periphery as observed for starving cells, within a few minutes after sorbitol addition (Figure 3B). A transient Tyr-phosphorylation of actin was also detectable 15 min



**Figure 3 Responses of vegetative KAx-3 cells to hyperosmolarity.** Cells maintained in culture medium were treated with 200 mM sorbitol and the consequences of hyperosmolarity were followed on different aspects of the cell biology. **A.** The effect on cellular morphology was monitored by time-lapse video microscopy using DIC optics and a 63x objective. The images shown illustrate the morphology of the cells after 5 min of stress. Scale bars: 10  $\mu$ m. **B.** The distribution of F-actin was analysed using Alexa 594-phalloidin after cell fixation/permeabilisation in 4% PFA, 0.1% Triton X-100. To enhance resolution, optical sections were taken throughout the cell and digitally deconvolved using Axiovision software. One optical section and a z-stack maximal intensity projection are shown. The phosphorylation of actin in response to sorbitol treatment was examined by Western blot on whole cell extracts using the anti-phospho-Tyr antibody (PY20). Scale bars: 5  $\mu$ m. **C.** Endogenous STATc and myc<sup>PTP3Δ</sup>C649S phosphorylation was analysed using the STATc-specific antibody CP22 and 7H3 or the anti-myc antibody 9E10. **D.** STATc nuclear translocation in response to stress was detected by immunofluorescence using the 7H3 antibody on cells kept in nutritive medium or starved for 4 h in 12 mM Na, K-phosphate buffer, pH 6.2, subjected or not to 200 mM sorbitol for 5 min. Scale bar: 10  $\mu$ m.

after the shock with a peak around 30 min (Figure 3B). One participant in the osmstress response in starving cells, STATc, was also Tyr<sup>922</sup> phosphorylated in our conditions within minutes following application of the osmotic stress (Figure 3C). As observed for AdcA and actin, this phosphorylation is transitory as a slow dephosphorylation proceeded past 90 min post-shock. The osmstress activation of the transcription factor STATc was shown to depend on a dual regulation involving a not yet identified tyrosine-kinase and the tyrosine-phosphatase PTP3, the activity of which is inhibited by phosphorylation on Ser/Thr residues [19,28]. As shown on Figure 3C, the

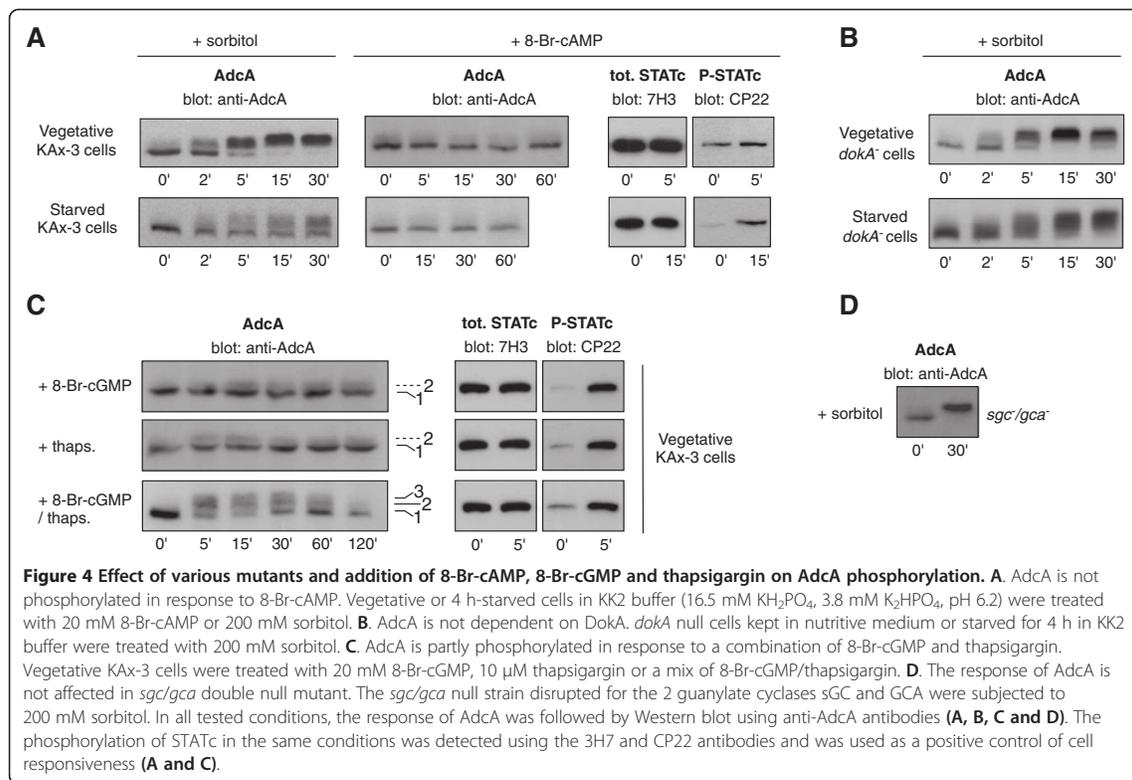
protein myc<sup>PTP3Δ</sup>C649S, used as a reporter of PTP3 behaviour [27], was also transiently phosphorylated (as validated by the CIP effect), thereby likely contributing to STATc activation. STATc phosphorylation was accompanied by its translocation into the nucleus (Figure 3D). Noteworthy, while STATc is massively cytosolic in early developing cells, we could detect some staining in the nucleus of growing cells suggesting a basal level of activation of the transcription factor in vegetative conditions. This is supported by the low but detectable basal level of phospho-STATc observed in growing cells (Figure 3C).

### Efficient AdcA phosphorylation requires pathways other than the DokA and cGMP-dependent osmopressure pathways

We next examined whether some of the secondary messengers described to function in the osmoresponse of starving cells (i.e.  $Ca^{2+}$  and cyclic nucleotides) operate to trigger AdcA stress-induced response. In hyperosmotically-stressed starving cells, a peak of cAMP is detected, due to the activation of the histidine kinase DokA and the subsequent transient inhibition of the cytosolic cAMP phosphodiesterase RegA [21,24]. The addition of the membrane-permeable analogue 8-Br-cAMP, used to mimic an increase in the cAMP cytosolic concentration, failed to activate AdcA in growing cells (Figure 4A). As such treatment only triggered a low level of STATc phosphorylation (used as a control), the effect of 8-Br-cAMP was also tested on 4 h starved cells, conditions known to induce a substantial response of the transcriptional factor ([18], Figure 4A). While sorbitol treatment also triggered the phosphorylation of AdcA in starved cells (yet not as efficiently as in vegetative cells), no activation of the AdcA response was observed with 8-Br-cAMP (Figure 4A). In agreement with these data, the *dokA* null mutation maintained the sorbitol-inducible phosphorylation of AdcA (Figure 4B). DokA being poorly expressed

in vegetative cells, the experiments were also conducted on starved cells showing that the absence of *dokA* did not alter AdcA phosphorylation profile (Figure 4B). A DokA-cAMP pathway is therefore unlikely to participate to AdcA phosphorylation.

We next tested the possible contribution of cGMP- and calcium-dependent pathways. While treatment of cells with 8-Br-cGMP efficiently activated STATc in vegetative cells, its effect on AdcA was very weak (Figure 4C). *Dicystostelium* encodes two characterized guanylate cyclases, the soluble hyperosmotic stress-inducible protein sGC and the membrane-associated GCA protein [23]. The deletion of *gca/sgc* has been shown to result in a complete loss of detectable guanylate cyclase activity in 1 h-starved cells subjected to 300 mOsm challenge. Disruption of both *gca* and *sgc* (*gca/sgc*) did not interfere with the full phosphorylation of AdcA in response to sorbitol (Figure 4D). In parallel, thapsigargin was used to induce an elevation of intracytosolic calcium. Again, this treatment caused an accumulation of phosphorylated STATc but barely induced a response from AdcA (Figure 4C). However, the addition of both thapsigargin and 8-Br-cGMP together was able to produce the appearance of band 3 (Figure 4C). The response was partial compared to the sorbitol effect, suggesting that these conditions did



not completely mimic those generated by sorbitol. The doses used and their simultaneous addition may not be the most effective combination to trigger AdcA phosphorylation. An alternative hypothesis is that, in conditions of hyperosmotic stress, cGMP and Ca<sup>2+</sup>- dependent pathways function in parallel to additional pathways to elicit a full AdcA response.

**AdcA phosphorylation is induced by a destabilization of the actin network**

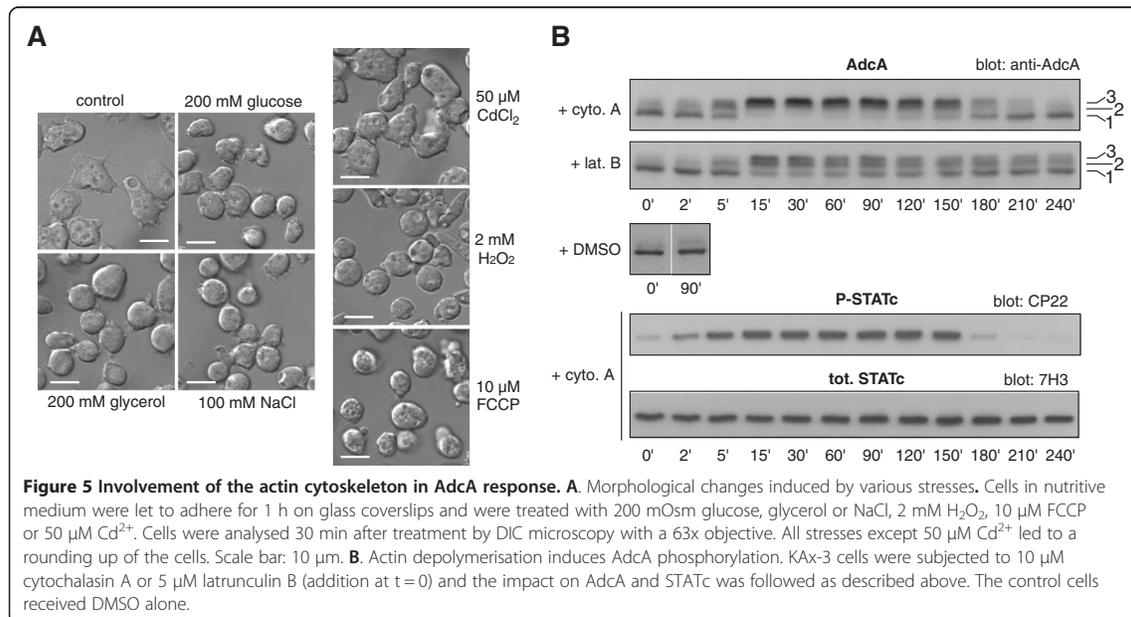
All the treatments driving AdcA phosphorylation led to a rounding up of the cells, likely involving a reorganisation of the actin cytoskeleton (Figure 5A). In the case of hyperosmotic stress, a protective cortical shell of F-actin is built through a massive restructuring of the actin network (Figure 3A, [25]). This led us to test whether the sole destabilization of the actin network could trigger AdcA phosphorylation. Cells were treated with two structurally and functionally distinct actin cytoskeleton disrupting agents, cytochalasin A (10 μM) or latrunculin B (5 μM). As shown on Figure 5B, these two drugs led to the activation of STATc as previously described by Araki and Williams on starved cells [29]. Cytochalasin A also induced a robust and rapid response of AdcA with the massive accumulation of band 3, comparable to that obtained in sorbitol treated cells. Latrunculin B (Figure 5B) as well as latrunculin A (not shown) were also able to trigger AdcA phosphorylation, yet not as efficiently. Thus, actin depolymerisation is sufficient to elicit AdcA phosphorylation. Both drug families induced a delay in the dephosphorylation of AdcA, a full dephosphorylation of

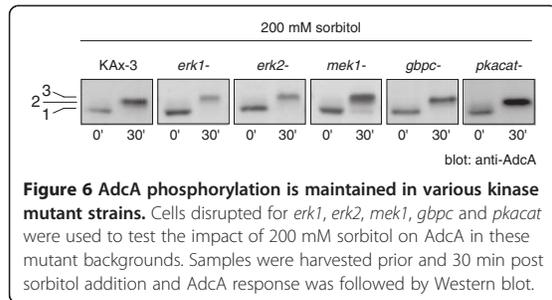
AdcA being eventually obtained only with cytochalasin A. This difference between the impacts of the drugs may be due to their distinct mode of action and the consequences of the chemicals on the cell physiology. *Dictyostelium* cells may be able to expel cytochalasin A through multidrug resistance pumps of the plasma membrane, allowing the cell to restore the basal parameters including a dephosphorylated AdcA.

**AdcA phosphorylation is not dependent on ERK proteins, PKA or GbpC**

To determine the kinase(s) responsible for AdcA phosphorylation, we tested AdcA response to sorbitol in strains disrupted in candidate kinases. As expected from the absence of AdcA response upon 8-Br-cAMP addition, a deletion mutant in the PKA catalytic subunit (*pkacat*) was still responsive to sorbitol treatment, excluding a role for this Ser/Thr kinase (Figure 6). The small effect of 8-Br-cGMP prompted us to test the cGMP-binding kinase GbpC, an intermediate in the osmstress signaling cascade leading to STATc phosphorylation. Disruption of *gbpC* did not alter AdcA phosphorylation kinetics (Figure 6).

In yeast and mammals, MAP kinases are key actors in the signaling pathways activated in conditions of hyperosmotic stress. In *Dictyostelium*, the involvement of the two MAP kinases Erk1 and Erk2 in the osmstress response has not been addressed in detail but Na and colleagues [17] suggested the implication of a MAPK dependent pathway. Interestingly, the MAP kinase kinase MEK1 is hyperphosphorylated in developing cells subjected to high osmolarity conditions, with kinetics similar to that of

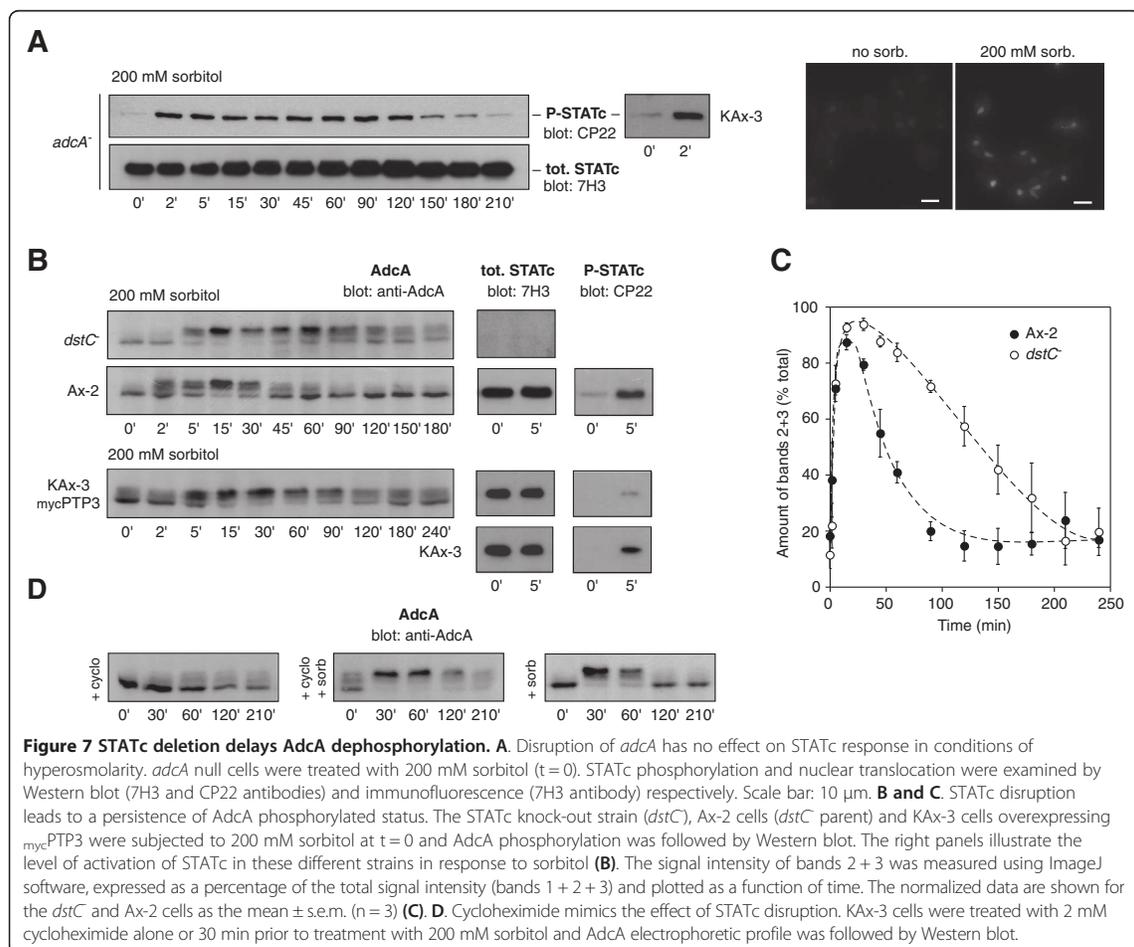




STATc [30]. Therefore, the phosphorylation status of AdcA was analysed in *erk1*, *erk2* and *mek1* null mutants (Figure 6). None of the mutations affected AdcA phosphorylation, an observation not in favor of a role for these kinases in the AdcA response.

### AdcA dephosphorylation is under the partial control of STATc

Given that both AdcA and STATc responded to similar stresses (our present data; [18]), we examined the possibility of any functional link between these two targets of the osmstress. In a previous work, an *adcA* null strain was generated by interruption of the coding sequence by a blasticidine resistance cassette [16]. The deletion of *adcA* has no noticeable effect on growth and endocytosis (as measured by uptake of FITC-dextran or latex beads) (D. Guetta, GK and LA, unpublished observations). We first tested the impact of this disruption on STATc activation. As shown in Figure 7A, the absence of *adcA* did not affect STATc's tyrosine phosphorylation/dephosphorylation when compared to KAx-3 or its translocation to the nucleus, indicating that AdcA is not an essential intermediate in the pathway controlling STATc response.



Conversely, the *dstC* deletion (*statc* null strain, Ax-2 background) affected the phosphorylation status of AdcA. In the two *dstC* and Ax-2 strains, the phosphorylation peak was similarly attained around 30 min post sorbitol stimulation but then, in the *dstC* mutant, the protein remained phosphorylated for an extended period of time as evidenced by the massive amount of band 3 still present at 150 min ( $42 \pm 9\%$  in *dstC* vs  $14 \pm 6\%$  in Ax-2) (Figure 7B and C). To further investigate a role for STATc in AdcA dephosphorylation, we repeated the same experiment in KAx-3 cells expressing various forms of PTP3 [31]. The tyrosine phosphatase PTP3 is responsible for the dephosphorylation of STATc [28]. Accordingly, the constitutive overexpression of PTP3 leads to a reduced STATc activation while overexpression of a dominant negative form of PTP3 mutated in the catalytic cysteine residue ( $\text{mycPTP3}\Delta^{\text{C649S}}$ ) leads to a constitutively active STATc [28]. As shown on Figure 7B, exposing KAx-3 overexpressing  $\text{mycPTP3}$  to 200 mM sorbitol led to a response of AdcA that resembles that observed in the *dstC* null strain with a persistence of AdcA phosphorylation, several hours after shock (Figure 7B). Such result suggests a role for STATc transcriptional activity in AdcA dephosphorylation. This was further supported by experiments using cycloheximide, a general protein synthesis inhibitor. While 2 mM cycloheximide by itself had only a slight effect on AdcA (possibly due to the generation of a situation of stress after long exposure to the inhibitor), pre-treatment of KAx-3 cells with cycloheximide, for 30 min prior sorbitol addition significantly slowed down AdcA dephosphorylation with persistence of band 3 for the next 180 min (Figure 7D), suggesting the requirement of protein neosynthesis for dephosphorylation to occur. In KAx-3 cells overexpressing  $\text{mycPTP3}\Delta^{\text{C649S}}$  however, the phosphorylation of AdcA was not noticeably affected despite a constitutive activation of STATc (not shown). Taken together, the data support a functional link between STATc activity and AdcA dephosphorylation. However, while STATc could very well control the expression of a component of the AdcA dephosphorylation pathway, an additional level of regulation possibly acting on the balance between the activity of the AdcA-specific kinase and that of its phosphatase must be invoked to account for the absence of effect of constitutively activated STATc.

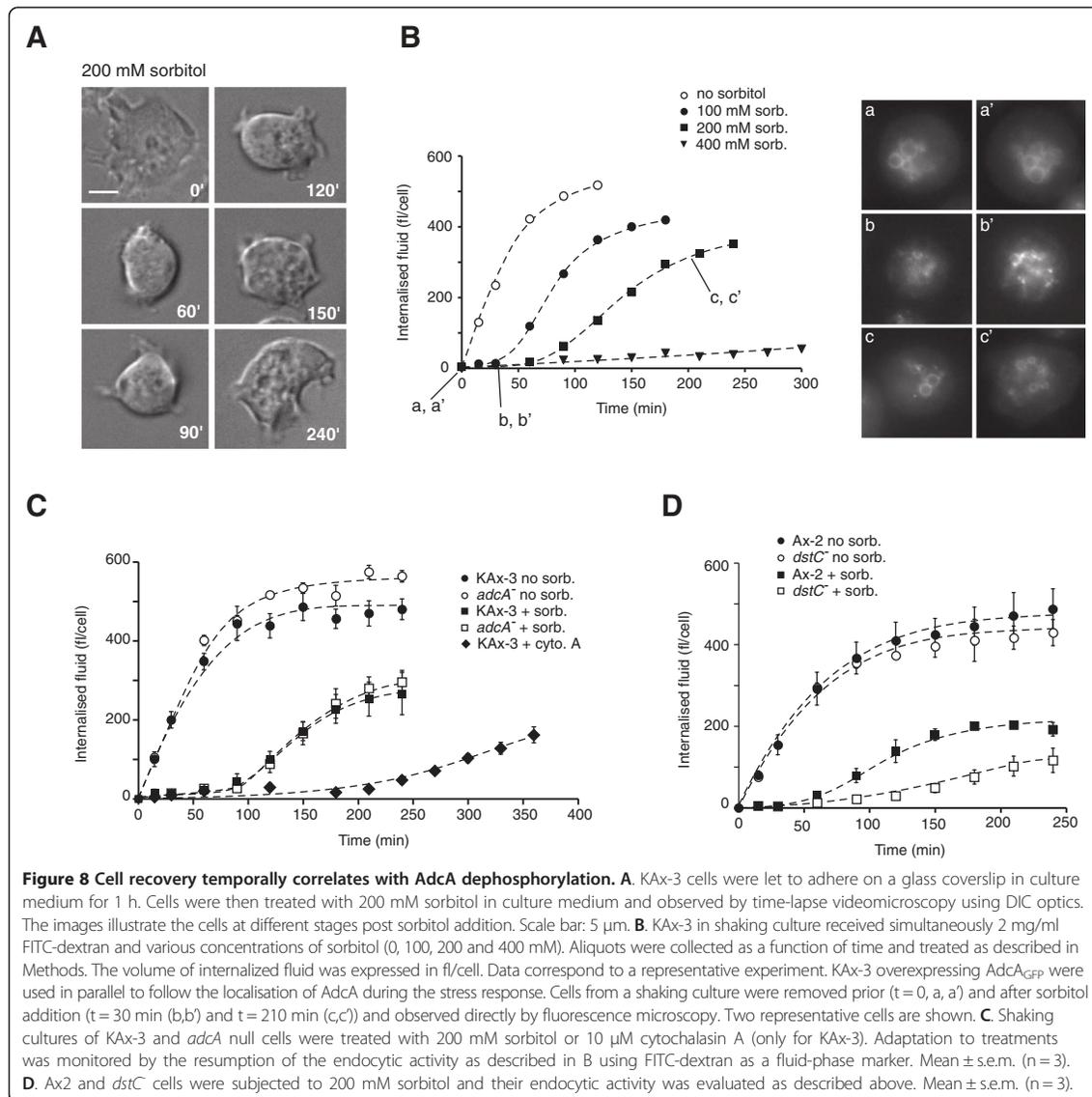
#### Impact of *dstC* and *adcA* disruption on cell resistance to stress

We next undertook a characterization of the cell behaviour at the time of AdcA dephosphorylation. When subjected to a stress of 200 mM sorbitol, the cell rounding and actin rearrangement induced within the first minutes after shock were transitory. As illustrated on Figure 8A, cells adapted progressively to their new environment and

regained a partly adherent and motile behaviour around 90 min following the onset of osmotic stress. Pintsch and colleagues described that hyperosmolarity rapidly blocked vesicular trafficking and macropinocytosis with a fragmentation of the endocytic pathway [22]. In agreement with that observation, while localized on large size macropinosomes in the absence of stress, AdcA was found associated to small size structures compatible with a partially fragmented endocytic network in sorbitol-treated cells (Figure 8B, [16]). Our data also confirmed the arrest of the endocytic activity as shown by the inhibition of the internalization of the fluid-phase marker FITC-dextran within the first minutes following the addition of 200 mM sorbitol (Figure 8B). However, this arrest is transient. Indeed, past 90 min of stress and in parallel to cell spreading and recovery of motility, KAx-3 cells had resumed some macropinocytic activity (Figure 8B, 200 mM sorb.). Past the adaptation phase, AdcA localization on large size endocytic vesicles was again visible (Figure 8B, c and c'). Lower concentrations of sorbitol (100 mM) allowed a faster cell recovery assessed by endocytosis measurements while higher, yet not lethal, concentrations (400 mM) prohibited adaptation at least during a 5 h time window. In all cases, recovery of the cells temporally correlated with AdcA dephosphorylation (Figure 1A, B and Figure 8B). We reported above that a dephosphorylation of AdcA also occurred in cells maintained in the presence of cytochalasin A. In these conditions, an endocytic activity was eventually restored by 180 min post cytochalasin A addition, possibly due to the pumping of cytochalasin A outside of the cells via MDRs and the subsequent restructuring of a functional actin cytoskeleton. In such cells, the regain of endocytic activity also paralleled AdcA dephosphorylation (Figures 5B, 8C).

We next asked whether *adcA* disruption modified cell resistance to stress and recovery. To test a possible contribution of AdcA to the osmoresponse, parental KAx-3 and *adcA* null cells were first subjected to increasing concentrations of sorbitol (100 to 400 mM) and cell growth was followed on a 96 h period of time. Addition of sorbitol affected cellular growth in a dose-dependent manner but similarly in *adcA* null and control cells suggesting that *adcA* deletion had no significant consequences on survival in hyperosmotic conditions (not shown). Analysis of the *adcA* null cell response in greater detail within the first four hours following a 200 mM sorbitol treatment confirmed that the absence of AdcA has no impact on cell recovery as indicated by the macroscopic morphological changes (not shown) and restoration of endocytosis within the same time frame as for KAx-3 cells (Figure 7C).

Given the impact of the *dstC* null mutation on AdcA dephosphorylation, we analysed the effect of the absence of STATc activity on cell adaptation to stress. Data from Araki and colleagues [18] established that STATc is not



essential for stress resistance as assayed by regrowth on *Klebsiella* after 2 h-exposure to 200 mM sorbitol. We tested here, by a less stringent discriminator, the capacity of the *dstC* null cells to restore some endocytic activity within the first hours after the onset of shock. As shown in Figure 8D, while Ax-2 cells regained an endocytic behaviour within 50–60 min post shock, the absence of STATc led to a delay in recovery, comparable to the delay observed in the kinetics of AdcA dephosphorylation.

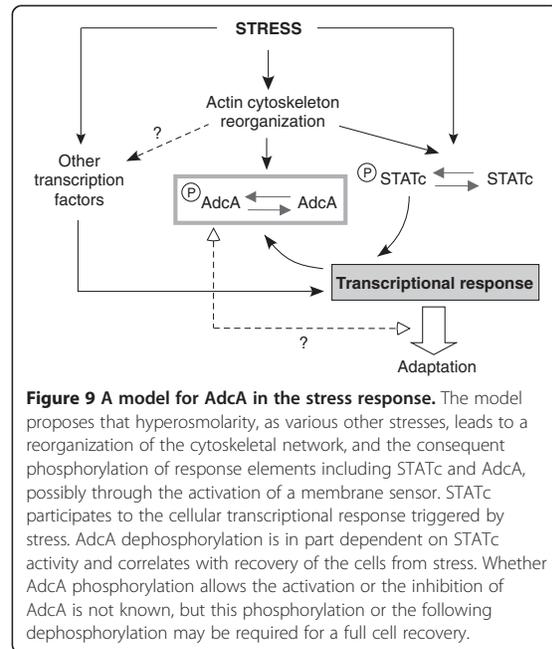
## Discussion

In the present study, we provide evidence that AdcA, one of the amoebal arrestin-related proteins, is a response element to a number of stresses in growing cells. Using a hyperosmotic shock induced by sorbitol as a paradigm, we showed that the sensing of the shock by vegetative amoebae is accompanied not only by the phosphorylation of the known actors of the osmotic stress response, the tyrosine phosphatase PTP3 and the transcription factor STATc but also by a multi-

phosphorylation of AdcA, most probably on serines/threonines. Adaptation of the cells to the osmotic stress situation temporally correlates with the dephosphorylation of AdcA.

Given that hyperosmolarity evokes AdcA phosphorylation, we tried to position AdcA relatively to known mediators of the osmotic response. In response to the osmotic shock, vegetative cells like starving cells shrink rapidly and modify their cortical actin. In starving cells, distinct pathways have been described that contribute to the cell response in conditions of high osmolarity: i) cGMP- and Ca<sup>2+</sup>-dependent pathways involved in the cytoskeletal remodelling and the activation of the transcription factor STATc [19,26,32] and ii) a two-component system dependent pathway including the histidine kinase DokA, the intermediate histidine phosphotransfer protein RdeA and the cAMP phosphodiesterase RegA [21,24]. Whether a signaling cascade involving MAPKs is also active as described in yeast and mammals is still unclear but has been suggested by Na and colleagues [17]. Using known inducers of these signaling cascades or null mutants in some of their respective effectors, our data indicate that AdcA phosphorylation results from the integration of signals arising from multiple pathways including cGMP and Ca<sup>2+</sup>-dependent ones. Interestingly, remodelling of the actin cytoskeleton by F-actin disrupting drugs is an efficient inducer of AdcA phosphorylation. Though AdcA and STATc responses are both elicited by common stresses including F-actin destabilization (this work, [18,29]), an early branching off of the pathways leading to the phosphorylation of AdcA and STATc is therefore likely to occur (Figure 9). In the case of STATc, the cGMP effect is mediated by the Roco kinase GbpC, a regulator of the cytoskeletal network. This pathway is not essential for AdcA response. The partial effect of the concomitant increase of cGMP and Ca<sup>2+</sup> on AdcA phosphorylation therefore needs to imply other targets for the secondary messenger cGMP as well as other intermediates, possibly involved in the remodelling of the actin network.

The identification of the kinase responsible for AdcA's phosphorylation would clearly help positioning AdcA in the signaling cascade. In addition to GbpC, our data disqualified PKA, Erk1, Erk2 and MEK1 as key kinases in AdcA phosphorylation. The amoebal kinome includes 255 kinases, with 155 putative Ser/Thr-directed kinases [33]. As AdcA is associated with the PI(3)P-enriched endosomal membrane, we could expect its kinase to be membrane-associated, all the more as soluble mutants of AdcA, e.g. the HΦ domain or the AdcA<sup>R491A</sup> construct, were less efficiently phosphorylated than AdcA. Alternatively, the hypothesis that folding of the soluble domains of AdcA and of AdcA<sup>R491A</sup> are different enough from that of AdcA to decrease the affinity for the kinase would perfectly accommodate a soluble kinase. It is thus



impossible at this stage to make an informed guess as to which kinase is responsible for AdcA's phosphorylation. In mild conditions of stress (100–200 mM sorbitol), AdcA phosphorylation is transient and its dephosphorylation is partly dependent on STATc. Given the transcriptional activity of STATc, a simple hypothesis is that STATc regulates the expression of a mediator of AdcA dephosphorylation such as the phosphatase itself or a regulator of the enzyme. Na and colleagues established by means of DNA microarray profiling the transcriptional profile of vegetative cells challenged with high sorbitol, and, among the differentially regulated genes, those that were dependent on the presence of STATc [17]. The list of osmotic stress-induced STATc-regulated genes contains only one protein phosphatase, DDB\_G0274153. DDB\_G0274153 encodes a putative serine-threonine protein phosphatase 2C expressed in vegetative conditions. This phosphatase may regulate AdcA phosphorylation and will receive a particular attention. However, AdcA is phosphorylated on multiple sites, STATc inactive mutants permit a partial dephosphorylation of AdcA and the constitutive activation of STATc is mostly silent while a reduction of the extent of AdcA phosphorylation would be expected. The regulation of AdcA response is thus likely to be more complex and involve parallel and complementary pathways in both the phosphorylation and the dephosphorylation steps.

In higher eukaryotes, β-arrestins are recruited to GPCRs stimulated by ligand binding. This leads to the

uncoupling of the receptors from their associated G proteins, the arrest of downstream signaling and the internalization of some of these GPCRs in clathrin-coated vesicles through the interaction of the arrestins with components of the endocytic machinery and the activation of signaling cascades from the endosomal platform [4,34]. In yeast, more recent data have established that  $\alpha$ -arrestin-dependent pathways are activated in response to stresses and changes in nutritive conditions or ambient pH, triggering the trafficking of plasma membrane permeases. Targets include the general amino acid permease Gap1 (and the  $\alpha$ -arrestins Bul1, Bul2), the arginine transporter Can1 (ART1), the lactate permease Jen1 (Rod1), the manganese transporter Smf1 (ART2, ART8) or the 7-transmembrane pH sensor Rim21 (ART9/Rim8) [8-13,35]. Arrestins and arrestin-like proteins are regulated by phosphorylation. In the absence of ligand stimulation,  $\beta$ -arrestins are cytosolic in an inactive, phosphorylated oligomeric form and their recruitment to a phosphorylated GPCR requires their dephosphorylation [36-39]. When the nutrient source is restricted, the phosphorylated forms of  $\alpha$ -arrestins are maintained in a complex with the scaffolding protein 14-3-3 [10,12]. The provision of nutrients activates their dephosphorylation, allowing them to target the E3 ubiquitin ligase Rsp5 on specific cargoes, thereby promoting cargo downregulation [8,10,12]. How does the phosphorylation/dephosphorylation response of AdcA to stress compare to that experienced by  $\alpha$ - and  $\beta$ -arrestins? We have shown that hyperosmotic stresses, as well as oxidative or heat shock conditions trigger a massive phosphorylation of the pool of AdcA. Whether this phosphorylation leads to the activation or the inactivation of AdcA is not yet established as the exact role of AdcA is currently unknown and none of AdcA membrane targets has been identified. The limited consequences of *adcA* deletion on cell response to hyperosmolarity would rather argue against a role for AdcA as an actor of the osmotic stress response. However, to provide a definite conclusion on the significance of AdcA phosphorylation in the stress context, identification of the phospho-sites and the subsequent construction of phospho-mimicking and non-phosphorylatable mutants of the protein will be essential. We showed that, in various contexts of stress affecting cell morphology and endocytic activity, AdcA response consistently correlates with cell behaviour. AdcA being a protagonist of the endocytic pathway, its phosphorylation could modify its function and interfere with the regulation and fate of some key membrane targets (e.g. ion transporters) involved in the stress response. While the absence of AdcA may be silent, its phosphorylated and/or dephosphorylated form could be necessary intermediates for an optimal response and reaching of a novel homeostasis (Figure 9) if one of these forms was to act as an inhibitor in the response.

The responsiveness of AdcA to various types of stress raises the question of the nature of the cellular trigger common to all the stresses, and able to elicit AdcA phosphorylation. In eukaryotes, defects of the cytoskeleton are one of the major damages observed in response to stress conditions. In *Dictyostelium*, two observations support a role for the cytoskeleton as a “stress transducer”, common to all stress conditions: (i) stressors described to trigger AdcA phosphorylation all alter the cellular morphology and (ii) cytochalasin A as well as latrunculin are able to induce AdcA response in the absence of any other stressor. Given the intricate network of interactions between cytoskeletal elements and transmembrane or membrane-associated proteins, remodelling of the actin cytoskeleton could directly contribute to the activation/inhibition of signaling cascades and the transmission of signals to downstream stress-response effectors, among which AdcA kinase.

## Conclusions

In the telluric amoebae *Dictyostelium*, hypertonicity triggers immediate morphological changes with remodelling of the cytoskeleton and activation of a transcriptional response affecting the expression of hundreds genes. Our data identified a novel target of the osmotic stress response, the arrestin-related protein AdcA, the regulation of which by a phosphorylation/dephosphorylation cycle might allow an optimal response of cells under stress.

## Methods

### Strains and cell culture conditions

Except when mentioned, the experiments were conducted on the *Dictyostelium discoideum* parental strain KAx-3. The null cells *gbpC* (DBS0302680), *mek1* (DBS0236541), *pkacat* (DBS0236783) and *gca*/*sgc* (DBS0236000) were obtained from the Dicty Stock Center. The *erk1* and *erk2* null cells were kindly provided by J. Hadwiger and the *doka* mutant was obtained from S. Schuster. The *adcA* (parent KAx-3, *bs*<sup>R</sup>) and strains overexpressing AdcA constructs (G418<sup>R</sup>) (KAx-3/*AdcA*<sub>myc</sub>, KAx-3/*AdcA*<sub>GFP</sub>, KAx-3/*AdcA* $\Delta$ H $\Phi$ <sub>GFP</sub>, KAx-3/H $\Phi$ <sub>GFP</sub>, KAx-3/*AdcA*<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub>, *adcA*<sup>R491A</sup>/*AdcA*<sub>GFP</sub>, *adcA*<sup>R491A</sup>/*AdcA* $\Delta$ H $\Phi$ <sub>GFP</sub>, *adcA*<sup>R491A</sup>/H $\Phi$ <sub>GFP</sub>, *adcA*<sup>R491A</sup>/*AdcA*<sup>R491A</sup><sub>GFP</sub>) were described previously [16]. The *dstC* (parent Ax-2, *hyg*<sup>R</sup>) was described earlier [18]. KAx-3/*myc*-PTP3 and KAx-3/*myc*-PTP3 $\Delta$ <sup>C649S</sup> were obtained by electroporation in KAx-3 cells of the *myc*-PTP3 and *myc*-PTP3 $\Delta$ <sup>C649S</sup> overexpressing constructs (G418<sup>R</sup>) derived from the work of the Firtel laboratory [27]. All *Dictyostelium* strains were grown in Petri dishes or in shaking culture at 21°C in the presence of appropriate antibiotics in maltose-containing axenic medium [40] except for Ax-2 and *dstC* that were

grown in HL5 medium (Formedium, UK) supplemented with 14 g/l glucose.

#### Stress response activation

Cells were harvested in log-phase from shaking cultures and resuspended in nutritive medium at  $10^7$  cells/ml. After 1 h 30-recovery in shaking suspension at 21°C, cells were subjected to different stress conditions: heat shock at 32°C or sorbitol, NaCl, glucose, glycerol, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine (FCCP, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), CdCl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) at concentrations indicated in the text. For treatment with sorbitol, glucose, NaCl and glycerol, 10× stocks diluted in appropriate medium depending on the experiment (nutritive medium or phosphate buffer) were used. For heat shock experiments, cells were transferred to a 32°C shaking water bath. Samples of 200 µl were removed just prior (t<sub>0</sub>) and during stress application as a function of time. Cells were rapidly centrifuged, resuspended in denaturing buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 6% glycerol, 2% SDS plus traces of bromophenol blue) and boiled for 3 min at 94°C. To test the contribution of the cytoskeleton, cells were treated with 5 µM latrunculin B (Sigma-Aldrich) or 10 µM cytochalasin A (Sigma-Aldrich) and DMSO was used as control. 8-Br-cAMP (20 mM) (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), 8-Br-cGMP (20 mM) (Enzo) and thapsigargin (10 µM) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) were used to test the impact of an increase in cAMP, cGMP and an elevation of intracellular calcium respectively. For experiments performed on adherent cells, stress was applied after 1 h 30 of recovery, by removal of the nutritive medium and addition of fresh medium containing the appropriate concentration of stressor.

#### Western blot

Protein samples corresponding to  $2 \times 10^5$  cells were separated by SDS-PAGE and transferred on PVDF membranes. AdcA was detected using the guinea-pig anti-AdcA antibody (COB25) [16] in TBS-0.05% Tween-20 containing 1% BSA. STATc phosphorylation status was followed using the monoclonal phospho-specific (CP22) or non phospho-specific (7H3) antibodies as described [41]. The anti-phosphoTyr antibody PY20 used to detect Tyr53-phosphorylated actin was from SantaCruz (Clini Sciences, Nanterre, France). The anti-GFP (clones 7.1 and 13.1) and the anti-myc 9E10 antibodies were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Line scans and blot analyses were done with ImageJ software.

#### Fluid-phase endocytosis assay

Cells were resuspended at the concentration of  $10^7$  cells/ml in axenic medium. FITC-dextran (2 mg/ml final) and

sorbitol (100, 200 and 400 mM final) or cytochalasin A (10 µM) were added simultaneously to the suspension. Samples of  $10^7$  cells were removed as a function of time and transferred in ice-cold axenic medium containing the same concentration of sorbitol. After 3 washes, cells were resuspended in 1 ml of 40 mM Mes-Na pH 6.5, counted rapidly and lysed by addition of 2 ml of 100 mM NaPi-0.25% (v/v) Triton X-100, pH 10. The fluorescence intensity was measured at  $\lambda_{ex}$  470 nm and  $\lambda_{em}$  520 nm. Data were converted into an equivalent volume of internalized fluid using a calibration curve [42].

#### Live cell imaging and immunofluorescence

Cells were let to adhere on glass coverslips for 1 h 30 in axenic medium and subjected to stress treatment as indicated. For live cell imaging, cells were observed directly by DIC or fluorescence microscopy. In that latter case, LOFLO nutritive medium (Formedium) was used because of a reduced autofluorescence compared to the original medium. For immunostaining, cells were fixed in axenic medium containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.1% Triton X-100 for 10 min. After washes in PBS and 1 h incubation in PBS-0.5% BSA, cells were then incubated with the anti-STATc (7H3) antibodies in PBS-0.5% BSA at room temperature for 1 h, washed three times in PBS-0.1% Tween 20 and incubated with Alexa 488-coupled secondary antibodies (Molecular Probes/Life technologies, Saint-Aubin, France) for an additional hour. Actin was stained using Alexa 594-phalloidin (Molecular Probes). Cells were observed directly after three washes in PBS-Tween. Images were acquired on an Axiovert 200 M Zeiss microscope equipped with a Piezo unit. The Axiovision software was used for image acquisition, deconvolution of z-stacks and maximal intensity z-projections.

#### Phosphatase treatment

Dephosphorylation assays using the CIP phosphatase (Promega, Charbonnières, France) were performed on SDS denatured samples. An aliquot corresponding to  $2 \times 10^5$  cells was diluted 20-fold in 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.66 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> and 1 mM spermidine. About 15 units of CIP were added and dephosphorylation was performed at 37°C for 30 min. For each time-point, an aliquot receiving no enzyme was treated in parallel as a control. Proteins were precipitated by a 1 h-incubation on ice after the addition of 10% trichloroacetic acid (TCA), centrifuged at  $16\ 000 \times g$  and resuspended in denaturing buffer containing 200 mM Tris base. Dephosphorylation was assessed by the abolition of the electrophoretic mobility shift on 8% SDS-PAGE gels.

## Additional file

**Additional file 1: Movie 1.** KAX-3 cells response to 200 mM sorbitol. KAX-3 cells were let to adhere on a glass coverslip in nutritive medium and subjected ( $t=30$  sec) to 200 mM sorbitol. The movie was taken by time-lapse video microscopy using DIC optics and a 63x objective. The time frame of the movie corresponds to approximately 9 min, with images taken every 10 seconds.

### Abbreviations

GPCR: G-protein coupled receptor; ART: Arrestin-related trafficking adaptor; Adc: Amoebal arrestin-domain containing protein; Arrdc: Mammalian arrestin-domain containing protein; CIP: Calf intestine phosphatase; PFA: Paraformaldehyde.

### Competing interests

The authors declare no conflict of interests.

### Authors' contributions

CH, GK and LA designed the study. CH, GK and LA conducted the experiments. CH, GK, TA, JGW and LA drafted the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

### Acknowledgements

We thank R.A. Firtel, S. Schuster, J. Hadwiger and the DictyStock Center for providing us with various null strains and DNA constructs. We thank Ludwig Eichinger and Sébastien Léon for constructive discussions and advices. This work was supported by the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA-France), the Université Joseph Fourier (UJF-Grenoble, France), the Centre National pour la Recherche Scientifique (FR3425) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-12-BSV6-0016-01 DYNOTEP) to the OdyCell team (LA) and by the Wellcome Trust Program Grant 082579/Z (JGW). C. Habourdin is the recipient of a PhD fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

### Author details

<sup>1</sup>CEA, IRTS, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France. <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France. <sup>3</sup>INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France. <sup>4</sup>College of Life Sciences, Wellcome Trust Biocentre, University of Dundee, DD1 5EH, Dundee, United Kingdom. <sup>5</sup>CEA-Grenoble, Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Biologie à Grande Echelle, Equipe OdyCell, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France.

Received: 26 June 2013 Accepted: 6 November 2013

Published: 22 November 2013

### References

- Gurevich VV, Gurevich EV, Cleghorn WM: **Arrestins as multi-functional signaling adaptors.** *Handb Exp Pharmacol* 2008, **186**:15–37.
- Luttrell LM, Gesty-Palmer D: **Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling.** *Pharmacol Rev* 2010, **62**:305–330.
- Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS: **Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins.** *British J Pharmacol* 2012, **165**:1717–1736.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ: **beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction.** *Trends Pharmacol Sci* 2011, **32**:521–533.
- Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ: **Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling.** *Trends Biochem Sci* 2011, **36**:457–469.
- Alvarez CE: **On the origins of arrestin and rhodopsin.** *BMC Evol Biol* 2008, **8**:222.
- Aubry L, Guetta D, Klein G: **The arrestin fold: variations on a theme.** *Curr Genomics* 2009, **10**:133–142.
- Lin CH, MacGunn JA, Chu T, Stefan CJ, Emr SD: **Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface.** *Cell* 2008, **135**:714–725.
- Herranz S, Rodriguez JM, Bussink HJ, Sanchez-Ferrero JC, Arst HN Jr, Penalva MA, Vincent O: **Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:12141–12146.
- Becuwe M, Vieira N, Lara D, Gomes-Rezende J, Soares-Cunha C, Casal M, Haguenaer-Tsapis R, Vincent O, Paiva S, Leon S: **A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis.** *J Cell Biol* 2012, **196**:247–259.
- Hatakeyama R, Kamiya M, Takahara T, Maeda T: **Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**:5598–5607.
- Merhi A, Andre B: **Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors.** *Mol Cell Biol* 2012, **32**:4510–4522.
- Nikko E, Pelham HR: **Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters.** *Traffic* 2009, **10**:1856–1867.
- Nabhan JF, Pan H, Lu Q: **Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor.** *EMBO Rep* 2010, **11**:605–611.
- Shea FF, Rowell JL, Li Y, Chang TH, Alvarez CE: **Mammalian alpha arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family E3 ubiquitin ligases and interact with beta arrestins.** *PLoS One* 2012, **7**:e50557.
- Guetta D, Langou K, Grunwald D, Klein G, Aubry L: **FYVE-dependent endosomal targeting of an arrestin-related protein in amoeba.** *PLoS One* 2010, **5**:e15249.
- Na J, Tunggal B, Eichinger L: **STATc is a key regulator of the transcriptional response to hyperosmotic shock.** *BMC Genomics* 2007, **8**:123.
- Araki T, Tsujioaka M, Abe T, Fukuzawa M, Meima M, Schaap P, Morio T, Urushihara H, Katoh M, Maeda M, et al: **A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in Dictyostelium.** *J Cell Sci* 2003, **116**:2907–2915.
- Araki T, van Egmond WN, van Haastert PJ, Williams JG: **Dual regulation of a Dictyostelium STAT by cGMP and Ca<sup>2+</sup> signalling.** *J Cell Sci* 2010, **123**:837–841.
- Howard PK, Sefton BM, Firtel RA: **Tyrosine phosphorylation of actin in Dictyostelium associated with cell-shape changes.** *Science* 1993, **259**:241–244.
- Ott A, Oehme F, Keller H, Schuster SC: **Osmotic stress response in Dictyostelium is mediated by cAMP.** *EMBO J* 2000, **19**:5782–5792.
- Pintsch T, Satre M, Klein G, Martin JB, Schuster SC: **Cytosolic acidification as a signal mediating hyperosmotic stress responses in Dictyostelium discoideum.** *BMC Cell Biol* 2001, **2**:9.
- Roelofs J, Van Haastert PJ: **Characterization of two unusual guanylyl cyclases from Dictyostelium.** *J Biol Chem* 2002, **277**:9167–9174.
- Schuster SC, Noegel AA, Oehme F, Gerisch G, Simon MI: **The hybrid histidine kinase Doka is part of the osmotic response system of Dictyostelium.** *EMBO J* 1996, **15**:3880–3889.
- Kuwayama H, Ecke M, Gerisch G, Van Haastert PJ: **Protection against osmotic stress by cGMP-mediated myosin phosphorylation.** *Science* 1996, **271**:207–209.
- Oyama M: **cGMP accumulation induced by hypertonic stress in Dictyostelium discoideum.** *J Biol Chem* 1996, **271**:5574–5579.
- Gamper M, Howard PK, Hunter T, Firtel RA: **Multiple roles of the novel protein tyrosine phosphatase PTP3 during Dictyostelium growth and development.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:2431–2444.
- Araki T, Langenick J, Gamper M, Firtel RA, Williams JG: **Evidence that DIF-1 and hyper-osmotic stress activate a Dictyostelium STAT by inhibiting a specific protein tyrosine phosphatase.** *Development* 2008, **135**:1347–1353.
- Araki T, Williams JG: **Perturbations of the actin cytoskeleton activate a Dictyostelium STAT signalling pathway.** *Eur J Cell Biol* 2012, **91**:420–425.
- Ma H, Gamper M, Parent C, Firtel RA: **The Dictyostelium MAP kinase kinase DdMEK1 regulates chemotaxis and is essential for chemoattractant-mediated activation of guanylyl cyclase.** *EMBO J* 1997, **16**:4317–4332.
- Gamper M, Kim E, Howard PK, Ma H, Hunter T, Firtel RA: **Regulation of Dictyostelium protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP3) through osmotic shock and stress stimulation and identification of pp 130 as a PTP3 substrate.** *J Biol Chem* 1999, **274**:12129–12138.
- Kortholt A, van Egmond WN, Plak K, Bosgraaf L, Keizer-Gunnink I, van Haastert PJ: **Multiple regulatory mechanisms for the Dictyostelium Roco protein GbpC.** *J Biol Chem* 2012, **287**:2749–2758.

33. Goldberg JM, Manning G, Liu A, Fey P, Pilcher KE, Xu Y, Smith JL: **The Dictyostelium kinome - analysis of the protein kinases from a simple model organism.** *PLoS Genet* 2006, **2**:e38.
34. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ: **New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors.** *Mol Cell* 2006, **24**:643-652.
35. Nikko E, Sullivan JA, Pelham HR: **Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1.** *EMBO Rep* 2008, **9**:1216-1221.
36. Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ: **Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors.** *Biochemistry* 2002, **41**:10692-10699.
37. Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ: **Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1.** *J Biol Chem* 1997, **272**:31051-31057.
38. Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: **Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases.** *J Biol Chem* 1999, **274**:15971-15974.
39. Kim YM, Barak LS, Caron MG, Benovic JL: **Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II.** *J Biol Chem* 2002, **277**:16837-16846.
40. Watts DJ, Ashworth JM: **Growth of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture.** *Biochem J* 1970, **119**:171-174.
41. Fukuzawa M, Araki T, Adrian I, Williams JG: **Tyrosine phosphorylation-independent nuclear translocation of a Dictyostelium STAT in response to DIF signaling.** *Mol Cell* 2001, **7**:779-788.
42. Aubry L, Klein G, Martiel JL, Satre M: **Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy.** *J Cell Sci* 1993, **105**:861-866.

doi:10.1186/1478-811X-11-91

**Cite this article as:** Habourdin *et al.*: The arrestin-domain containing protein AdcA is a response element to stress. *Cell Communication and Signaling* 2013 **11**:91.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)







Le clan « arrestine » est une superfamille de protéines adaptatrices regroupant les arrestines conventionnelles ( $\beta$ -arrestines et arrestines visuelles), bien décrites pour leur rôle dans la régulation des récepteurs membranaires couplés aux protéines G hétéro-trimériques et la signalisation associée et des protéines de type *arrestin-like* identifiées plus récemment, qui semblent partager des fonctions communes dans la régulation et le trafic de cargos membranaires. Ce travail de thèse a porté sur l'étude de la protéine *arrestin-like* AdcA de *Dictyostelium discoideum* dans l'objectif d'en définir le rôle fonctionnel. En plus de son module arrestine, caractéristique de cette famille de protéines, AdcA possède un domaine FYVE qui permet son association à la voie endocytaire, un domaine C-terminal riche en tyrosines et un domaine N-terminal riche en histidines impliqué dans son oligomérisation. Mes travaux ont permis d'établir que la protéine AdcA répond à des stress de natures diverses dont l'hyper-osmolarité, par une multi-phosphorylation massive, notamment au niveau du domaine N-terminal. La sensibilité d'AdcA à la dépolymérisation du réseau d'actine suggère un lien fonctionnel entre le cytosquelette d'actine et la cascade de signalisation menant à la phosphorylation de la protéine. En conditions de stress modéré, la phosphorylation d'AdcA est transitoire et sa déphosphorylation, en partie dépendante du facteur de transcription STATc, corrèle avec l'adaptation des cellules aux conditions de stress. Cette modification post-traductionnelle transitoire pourrait permettre de contrôler l'activité d'AdcA et d'optimiser la réponse des cellules au stress. Parallèlement, la caractérisation fonctionnelle d'un partenaire d'AdcA, la protéine FrmC, a été entreprise. FrmC est une nouvelle protéine, encore non caractérisée, présentant plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine FERM capable de lier l'actine *in vitro* et un domaine à motifs LRR. Mes travaux ont notamment mis en évidence que FrmC est recrutée à la membrane plasmique et joue un rôle dans l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, l'absence de FrmC affecte l'adaptation des cellules et la réponse d'AdcA en situation de stress hyper-osmotique.

Mots clés : *Dictyostelium*, arrestine, AdcA, stress hyper-osmotique, STATc, protéine à domaine FERM, actine, adhésion.

The arrestin clan represents a large group of adaptor proteins which includes the canonical arrestins -  $\beta$ -arrestins and visual arrestins – well described for their role in the regulation of membrane receptors coupled to heterotrimeric G-proteins and associated signaling as well as *arrestin-like* proteins identified more recently that seem to share functions in the regulation and trafficking of membrane cargoes. This work focused on the study of the *arrestin-like* protein AdcA of *Dictyostelium discoideum*, to determine the functional role of this atypical member. In addition to the arrestin module common to all the members of the arrestin family, AdcA harbors a FYVE domain responsible for its association to the endocytic pathway, a C-terminal tyrosine-rich domain and an N-terminal extension rich in histidine residues mediating its oligomerization. I have established that AdcA responds to a variety of stresses such as hyperosmolarity by a massive multi-phosphorylation of the protein. Sensitivity of AdcA to changes in F-actin polymerization status suggests a link between the signaling cascade leading to AdcA phosphorylation and the actin cytoskeleton. In conditions of moderate stress, AdcA response is transient and its dephosphorylation depends on the transcription factor STATc and correlates with cell adaptation to the stress conditions. This post-translational modification of AdcA could modulate its activity and optimize the cell response to stress. In parallel, the functional characterization of a partner of AdcA, the protein FrmC, has been undertaken. This so-far uncharacterized protein presents a multimodular structure with a FERM domain able to bind F-actin *in vitro* and several leucine-rich repeats (LRR). I have shown that FrmC is recruited to the plasma membrane and is involved in cell-substrate adhesion. In addition, disruption of FrmC affects cell adaptation and AdcA response in conditions of hyperosmotic stress.

Key words: *Dictyostelium*, arrestin, AdcA, hyperosmotic stress, STATc, FERM domain containing protein, actin, adhesion.