



HAL
open science

Etude du mécanisme de polymérisation des protéines du complexe ESCRT-III

Aurélien Dordor

► **To cite this version:**

Aurélien Dordor. Etude du mécanisme de polymérisation des protéines du complexe ESCRT-III. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV047 . tel-01559085

HAL Id: tel-01559085

<https://theses.hal.science/tel-01559085>

Submitted on 10 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 Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aurélien DORDOR

Thèse dirigée par **Winfried WEISSEHORN**

préparée au sein de l'Unité Interactions Virus - Cellules Hôte
dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Etude du mécanisme de polymérisation des protéines du complexe ESCRT-III

Thèse soutenue publiquement le 15 novembre 2012
devant le jury composé de :

Rémy SADOUL

Directeur de recherche, Grenoble (Président)

Patricia BASSEREAU

Directeur de recherche, Paris (Rapporteur)

Yves GAUDIN

Directeur de recherche, Gif-sur-Yvette (Rapporteur)

Delphine MURIAUX

Chargée de recherche, Montpellier (Examinateur)

Guy SCHOEHN

Directeur de recherche, Grenoble (Examinateur)

Winfried WEISSEHORN

Directeur de recherche, Grenoble (Membre)



Table des matières

Abréviations	4
---------------------	----------

1. INTRODUCTION	7
------------------------	----------

1.1. Découverte de la machinerie ESCRT et importance au cours de l'évolution	8
---	----------

1.2. Les acteurs de la machinerie ESCRT	10
--	-----------

1.2.1. ESCRT-0	11
-----------------------	-----------

1.2.1.1. Interactions avec l'ubiquitine	11
--	-----------

1.2.1.2. Importance fonctionnelle de la clathrine	12
--	-----------

1.2.1.3. Interactions avec les cargos, la membrane et ESCRT-I	12
--	-----------

1.2.2. ESCRT-I	13
-----------------------	-----------

1.2.2.1. Interactions avec l'ubiquitine	13
--	-----------

1.2.2.2. Interaction avec les cargos, la membrane et les complexes ESCRT	13
---	-----------

1.2.3. ESCRT-II	14
------------------------	-----------

1.2.3.1. Interactions avec ESCRT-I, la membrane, l'ubiquitine : importance du domaine GLUE	14
---	-----------

1.2.3.2. Redondance structurale du domaine WH	15
--	-----------

1.2.3.3. Implications fonctionnelles de la structure d'ESCRT-II	15
--	-----------

1.2.4. ESCRT-III	16
-------------------------	-----------

1.2.4.1. Formation de polymères et modèle d'interaction avec la membrane	16
---	-----------

1.2.4.2. Régulation de l'assemblage du complexe	17
--	-----------

1.2.4.3. Interactions au sein d'ESCRT-III	19
--	-----------

1.2.4.4. Rôles respectifs des protéines CHMP dans le fonctionnement d'ESCRT-III	19
--	-----------

1.2.5. Les protéines associées	20
---------------------------------------	-----------

1.2.5.1. Le complexe VPS4/VTA1	20
---------------------------------------	-----------

1.2.5.2. ALIX	21
----------------------	-----------

1.2.5.3. AMSH	22
----------------------	-----------

1.3. Rôles de la machinerie ESCRT	22
--	-----------

1.3.1. Tri vers les corps multivésiculaires	24
--	-----------

1.3.2. Cytocinèse	25
--------------------------	-----------

1.3.3.	Autophagie et régulation de la transcription	26
1.3.4.	Bourgeonnement viral	27
1.4.	Article (Review) : Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding.	30
1.5.	Objectifs du travail de thèse	43
2.	MATERIEL ET METHODES	44
2.1.	Structure des polymères CHMP2A/CHMP3 par cryo-microscopie électronique	45
2.2.	Propriétés biochimiques des polymères CHMP2A/CHMP3	46
2.3.	Etude des interactions entre protéines CHMP par SPR	47
2.4.	Sélection d'anticorps de lama contre les polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 par Phage Display	49
2.5.	Obtention d'un sérum polyclonal anti-CHMP4B et purification des anticorps spécifiques	51
2.6.	Test de modèles de polymérisation	53
3.	RESULTATS	55
3.1.	Caractérisation biochimique et structurale des polymères ESCRT-III	56
3.1.1.	Structure des polymères CHMP2A/CHMP3 par cryo-microscopie électronique	56
3.1.1.1.	Introduction	56
3.1.1.2.	Résultats	56
3.1.1.2.1.	Production, purification et optimisation des échantillons de polymères pour la microscopie électronique	56
3.1.1.2.2.	Détermination de la structure	60
3.1.1.3.	Discussion	63
3.1.2.	Propriétés biochimiques des polymères CHMP2A/CHMP3	64
3.1.2.1.	Introduction	64
3.1.2.2.	Résultats	64
3.1.2.2.1.	Stabilité des polymères	64
3.1.2.2.2.	Propriétés optiques	67
3.1.2.2.3.	Remodelage des membranes lipidiques	68
3.1.2.3.	Discussion	70
3.1.3.	Etude des interactions entre protéines CHMP par SPR	72
3.1.3.1.	Introduction	72

3.1.3.2.	Résultats	74
3.1.3.2.1.	Analyse cinétique	75
3.1.3.2.2.	Analyse à l'équilibre	77
3.1.3.3.	Discussion	93
3.2.	Article : ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers <i>in vitro</i> and act synergistically during HIV-1 budding	96
3.3.	Développement d'anticorps spécifiques des polymères ESCRT-III	145
3.3.1.	Sélection d'anticorps de lama contre les polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 par Phage Display	145
3.3.1.1.	Introduction	145
3.3.1.2.	Résultats	147
3.3.1.2.1.	Premier round de sélection	147
3.3.1.2.2.	Deuxième round de sélection	149
3.3.1.2.3.	Isolement et caractérisation des clones	152
3.3.1.3.	Discussion	157
3.3.2.	Obtention d'un sérum polyclonal anti-CHMP4B et purification des anticorps spécifiques	158
3.3.2.1.	Introduction	158
3.3.2.2.	Résultats	159
3.3.2.2.1.	Obtention des polymères CHMP2AΔC purifiés	159
3.3.2.2.2.	Obtention des polymères CHMP4B purifiés	161
3.3.2.2.3.	Purification et caractérisation de l'anticorps anti-CHMP4B	163
3.3.2.3.	Discussion	166
3.4.	Test de modèles de polymérisation	167
3.4.1.1.	Introduction	167
3.4.1.2.	Résultats	168
3.4.1.3.	Discussion	172
4.	Discussion et perspectives	173
5.	Annexes	180
5.1.	Article 2 : CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B.	180
6.	Bibliographie	199

Abréviations :

AAA : ATPase associated with a variety of cellular activities

ALIX : ALG-2-interacting protein X

AMSH : associated molecule with the SH3 domain of STAM

ART : Arrestin-Related Trafficking

BSA : bovine serum albumin

cDNA : ADN complémentaire

CEP55 : Centrosomal Protein of 55 KDa

CHMP : Charged Multivesicular Body Protein

CryoEM : Cryo Electron Microscopy

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DO : densité optique

DUIM : Double Ubiquitin Interaction Motif

EDC : 1-[3-(Diméthylamino)propyl]- 3-éthylcarbodiimide hydrochloride

EGS : Ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate)

EIAV : Equine Infectious Anemia Virus

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

ESCRT : Endosomal Sorting Complex required for Transport

FYVE : Fab1, YGL023, Vps27 and EEA1

GAT : GGA and Tom1

GGA : Golgi-localized, Gamma-adaptin ear-containing, ARF-binding

GLUE : GRAM-Like Ubiquitin in EAP45

GUV : Giant Unilamellar Vesicles

HRP : Horseradish Peroxidase

HRS : Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

IgG : Immunoglobuline de type G

ILV : Intralumenal Vesicles

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MBP : Maltose Binding Protein

MIM : MIT-interacting motif

MIT : microtubule-interacting and transport

MVE : Multivesicular Endosomes (=MVB)

MVB : Multivesicular Body - Corps multivésiculaire

NEDD : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein

NHS : N-Hydroxysuccinimide

NZF: Npl4-type Zinc Finger

pb : paire de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Poly Ethylène Glycol

PEI : Poly Ethylène Imine

PI(3)P : phosphatidyl-inositol-3-phosphate

PRD: Proline Rich Domain - Domaine riche en prolines

rpm : rotations par minute

SAXS: Small Angle X-Ray Scattering

SH3 : SRC Homology 3 Domain

SOUBA: Solenoid of Overlapping Ubiquitin Associated domains

SPR : Surface Plasmon Resonance

STAM : Signal transducing adapter molecule

TBK1 : TANK-Binding Kinase 1

TEV: Tobacco Etch Virus

TOM1 : Target of Myb1

Tsg101 : Tumor susceptibility gene 101

UBAP1 : Ubiquitin Associated Protein 1

UEV : Ubiquitin E2 Variant

UIM : Ubiquitin Interaction Motif

USP8 : Ubiquitin-specific-processing protease 8

VHH: Variable fragment of the Heavy chain from Heavy chain-only antibodies

VHS : Vps27, Hrs and STAM

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLP : Virus-Like Particles

Vps : Vacuolar Protein Sorting

WH : Winged Helix domain

YT : Yeast extract and Tryptone

1. INTRODUCTION

1.1. Découverte de la machinerie ESCRT et importance au cours de l'évolution

Les protéines constituant la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) font partie d'une classe plus large de protéines appelées protéines VPS (*vacuolar protein sorting*). Cette appellation provient d'études génétiques menées chez la levure où le phénotype issu de l'inactivation de ces protéines provoque des déformations de la vacuole qui ont permis de grouper les protéines VPS en différentes classes (de A à F) [1], [2]. Ainsi, la classe E regroupe les mutants présentant des structures endosomales aberrantes larges et multilamellaires regroupées sous le terme « compartiment de classe E » (Figure 1) [3], [4].

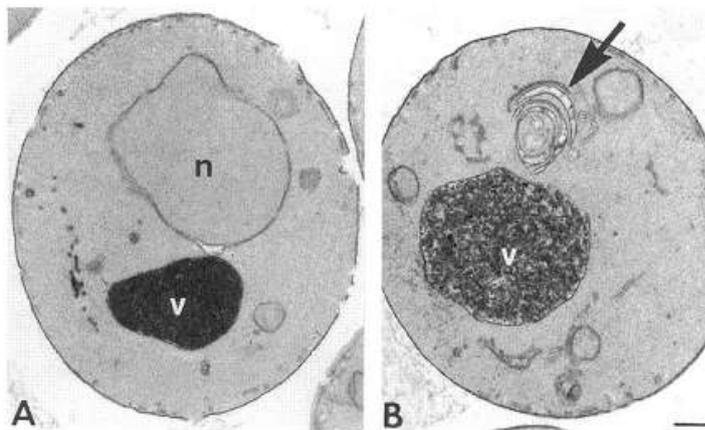


Figure 1 : Comparaison de l'ultrastructure d'une levure sauvage (A) et d'une levure mutante pour la machinerie ESCRT. (B) par microscopie électronique.

(barre d'échelle : 0.5 μm ; v = vacuole ; n = noyau). La flèche met en évidence le compartiment de classe E. Figure d'après [4].

Les protéines de la machinerie ESCRT font partie de la classe E. C'est précisément l'apparition systématique de ce phénotype chez les mutants qui rend l'analyse du rôle respectif de chacune des protéines ESCRT difficile. Chez l'homme comme chez la levure, il existe cinq complexes ESCRT et l'ensemble de la machinerie est très conservé. A l'origine, la machinerie ESCRT a été découverte pour son implication dans l'adressage des protéines membranaires vers le lysosome via une structure endosomale appelée corps multivésiculaire (*multivesicular body* ou MVB) [3], [5], [6], [7], [8], [9]. Toutefois, le rôle de la machinerie ESCRT ne se cantonne pas au tri des cargos membranaires car elle se trouve au cœur de nombreuses autres fonctions cellulaires majeures telles que la division ou la signalisation comme nous le verrons ultérieurement.

Cette particularité explique sans doute la relative conservation des composants d'ESCRT chez un grand nombre d'être vivants (Figure 2). Au sein du domaine Eucaryote, la situation est cependant assez hétérogène compte tenu de la diversité biologique qu'il abrite. Récemment, il a été montré qu'une machinerie ESCRT ancestrale existait au sein de deux règnes du domaine des Archaea (Crenarchaeota et Euryarchaeota) [10], [11]. Chez *Sulfolobus* (Crenarchaeota), il a été montré que cette machinerie était impliquée dans la division cellulaire [12], [13]. L'interaction entre les deux derniers complexes de la machinerie ESCRT (ESCRT-III et VPS4) est conservée chez les Archaea et précède donc la séparation entre Archaea et Eucaryotes [13], [14].

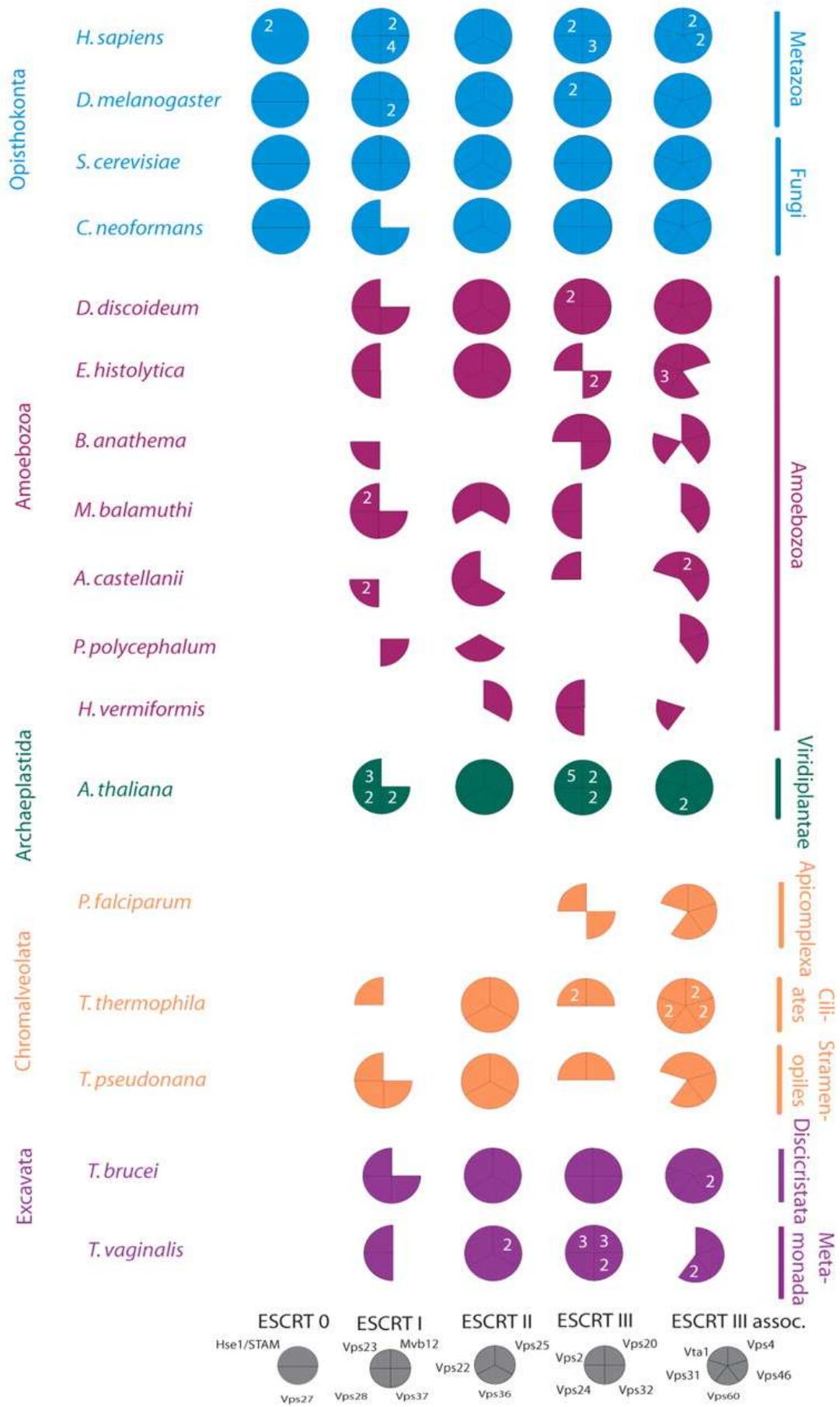


Figure 2 : Diagramme de Coulson illustrant la distribution des complexes ESCRT au sein de cinq des six règnes du domaine des Eucaryotes (selon la classification de Adl et al., 2005 [15]). Un cercle complet indique que toutes les composantes protéiques d'un complexe ESCRT donné ont pu être identifiées. Les sections manquantes indiquent qu'un homologue n'a pu être identifié et n'est donc probablement pas présent chez l'organisme en question. Les numéros en blancs représentent le nombre de paralogues.

La présence d'ESCRT-0 est propre aux opisthochontes, bien que des complexes « alternatifs » assurant la même fonction puissent exister au sein des autres règnes [16]. Chez certains organismes, l'absence du complexe ESCRT-II pourrait éventuellement être expliquée par le fait qu'il soit impliqué dans un moindre nombre de fonctions cellulaires. Il est également intéressant de constater que dans le cas de parasites intracellulaires comme *P. falciparum* (agent du paludisme), la machinerie ESCRT est très réduite. Figure d'après [16].

Qui plus est, le mécanisme d'action générale du système semble être conservé puisque les composants de cette machinerie ESCRT réduite affichent une similarité structurale et fonctionnelle avec ses homologues eucaryotes [13], [17], [18]. La diversité ainsi que la distance évolutive séparant les organismes qui possèdent tout ou partie de la machinerie ESCRT souligne donc son rôle prépondérant et justifie sa très bonne conservation au cours de l'évolution.

1.2. Les acteurs de la machinerie ESCRT

La machinerie ESCRT est composée d'une cascade de cinq complexes protéiques agissant de concert : ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et VPS4/VTA1 [5], [6], [7], [8], [9]. Ils agissent toujours de manière séquentielle dans un ordre bien précis. Selon les situations, certains de ces complexes peuvent être absents mais le fonctionnement global de la machinerie reste toujours le même en assurant le remodelage des membranes biologiques.

Bien qu'il existe beaucoup de données structurales disponibles sur ESCRT, le mécanisme par lequel l'ensemble de la machinerie fonctionne est encore mal compris. Brièvement, en amont de la cascade on trouve ESCRT-0 qui se charge de regrouper les cargos à envoyer vers le lysosome. Il recrute ESCRT-I qui interagit avec ESCRT-II pour former la vésicule lipidique dans laquelle sont séquestrés les cargos. Enfin, ESCRT-II recrute ESCRT-III qui se charge de libérer la vésicule dans le MVB en agissant de concert avec le cinquième complexe de la machinerie : VPS4/VTA1. Cette partie s'attache à décrire la structure et le fonctionnement de chaque complexe dans les grandes lignes afin de donner un aperçu de ce qui est connu à l'heure actuelle sur le sujet.

1.2.1. ESCRT-0

Le complexe ESCRT-0 est composé de deux protéines : HRS et STAM (il existe deux isoformes de STAM chez l'homme) [5]. La formation du complexe est opérée par le biais des domaines GAT qui interagissent de manière antiparallèle pour former un hétérodimère [19], mais des données récentes suggèrent également qu'ESCRT-0 puisse s'associer sous forme d'hétérotétramères [20] et il a aussi été montré qu'HRS pouvait former des hexamères *in vitro* [21].

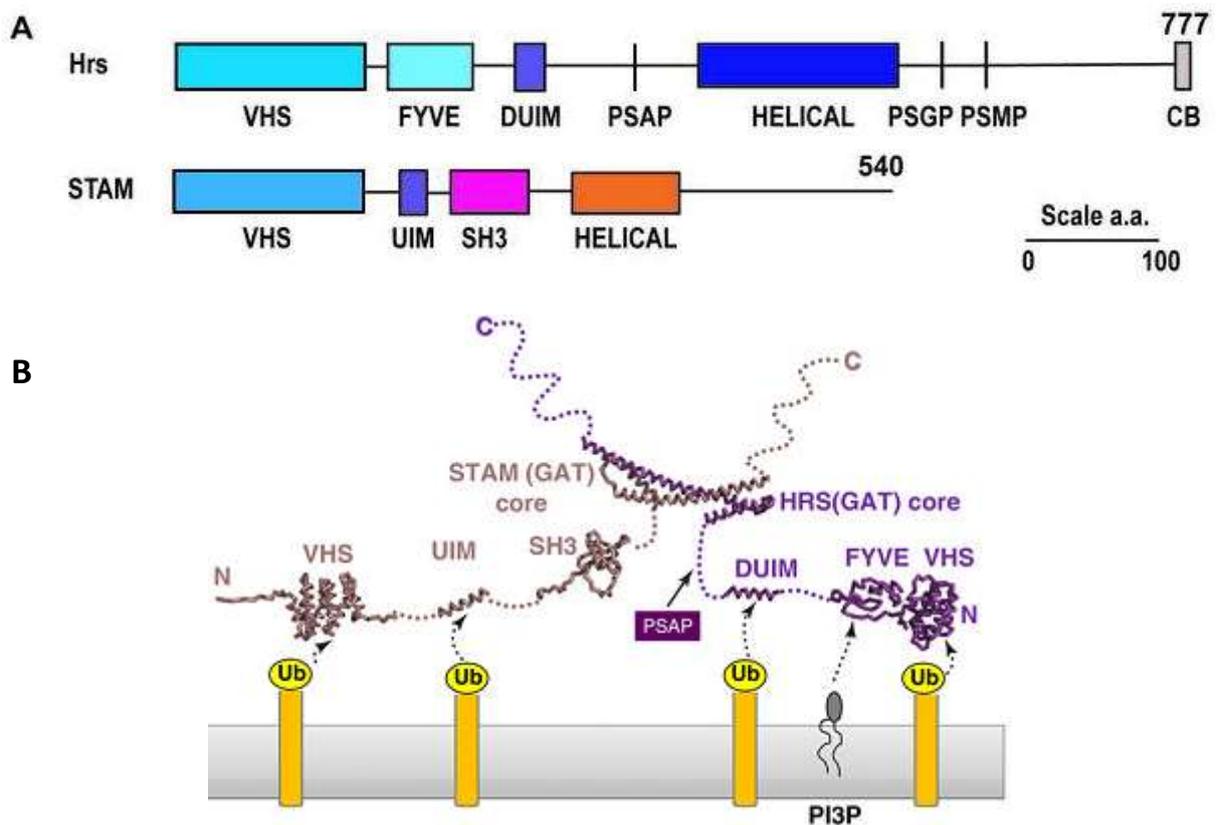


Figure 3 : **A.** Organisation des domaines et motifs présents dans les versions humaines des protéines Hrs et STAM composant le complexe ESCRT-0. **B.** Modèle de la structure tridimensionnelle du complexe ESCRT-0 (basé sur des données cristallographiques). La membrane endosomale est représentée en gris, les cargos marqués à l'ubiquitine sont en jaune. Les régions désordonnées sont représentées en pointillés. Voir le texte pour les détails. Figure **A** d'après [19] ; figure **B** d'après [22].

1.2.1.1. Interactions avec l'ubiquitine

La partie N-terminale de d'HRS et STAM est riche en domaine de liaison à l'ubiquitine (Figure 3). Ainsi, ESCRT-0 possède en tout 5 motifs d'interaction avec l'ubiquitine via les domaines UIM, DUIM et VHS. En pratique, il semble que seules 4 ubiquitines puissent être liées simultanément par un hétérocomplexe HRS/STAM, l'affinité globale du complexe (K_D apparent) étant égale à environ 300 μM [20]. Cette redondance fonctionnelle permet au complexe d'ESCRT-0 de regrouper et séquestrer

les cargos marqués à l'ubiquitine (monoubiquitine, polyubiquitine, liées Lys48 ou Lys 63) très efficacement [20], [23], [24], [25], [26]. Des phénomènes de coopérativité entre domaines ont également pu être mis en évidence [24], [26].

1.2.1.2. Importance fonctionnelle de la clathrine

ESCRT-0 colocalise avec la clathrine qui forme des manteaux plats au niveau des endosomes [5], [27]. En effet, il a été montré que les endosomes précoces sont riches en manteaux de clathrine modifiés [27]. Or, la partie C-terminale d'HRS contient un motif de liaison à la clathrine et cette dernière joue un rôle crucial dans l'assemblage de microdomaines enrichis en complexes ESCRT-0/cargos sur les endosomes [28]. Le recrutement de la clathrine par HRS est donc essentiel pour permettre un tri efficace des cargos vers la voie endo-lysosomale entre autres parce qu'elle contribue indirectement au regroupement des cargos ainsi qu'au recrutement efficace d'ESCRT-I [28].

Les protéines contenant des domaines VHS sont toutes impliquées dans le trafic et le tri intracellulaire. Ainsi, la protéine GGA (qui contient elle aussi un domaine VHS dans sa partie N-terminale) recrute la clathrine au niveau des membranes du réseau trans-golgi [29]. Similairement, la protéine TOM1 semble assurer un lien entre clathrine et chaînes de polyubiquitine [30]. Etant donné qu'ESCRT-0 n'est présent que chez les opisthochontes, il est probable qu'un complexe ESCRT-0 ancestral ait été basé sur les protéines de la famille TOM1 [16].

1.2.1.3. Interactions avec les cargos, la membrane et ESCRT-I

La fonction de reconnaissance des cargos par le complexe ESCRT-0 ne se limite toutefois pas à la présence d'ubiquitine car il a été montré que la région C-terminale d'HRS était capable de reconnaître des patchs hydrophobes sur des cargos et de les cibler vers la voie endosomale en l'absence totale d'ubiquitine [31], [32].

Le domaine FYVE de HRS interagit avec le phospholipide PI(3)P présent au niveau de la membrane lipidique des endosomes précoces et assure vraisemblablement l'ancrage membranaire du complexe [33]. Le domaine SH3 de STAM interagit quand à lui avec les déubiquitinases USP8 et AMSH [34], [35]. Ces enzymes sont probablement requises pour recycler l'ubiquitine des cargos avant leur endocytose mais aussi pour décrocher d'éventuels complexes ESCRT-0 toujours avidement accrochés aux cargos lorsqu'ESCRT-I et II entrent en jeu [36].

Enfin, ESCRT-0 recrute ESCRT-I grâce au motif PSAP présent sur HRS (Figure 3A). Chez la levure, le motif PSAP est absent et il a été montré que c'est le motif PSDP situé en C-terminal du domaine GAT de Vps27 (homologue d'HRS chez la levure) qui permet de recruter ESCRT-I [37].

1.2.2. ESCRT-I

C'est le domaine UEV de la protéine Tsg101 qui reconnaît le motif PSAP d'ESCRT-0 [38], [39]. Tsg101 fait partie intégrante d'ESCRT-I ; le complexe comprenant également les protéines Vps28, Vps37 (3 isoformes : A, B et C) ainsi que Mvb12 (2 isoformes A et B) ou encore UBAP1 dans certains cas [40], [41], [42], [6]. La combinatoire résultant du nombre d'isoformes permet par exemple d'assembler différents types de complexes ESCRT-I spécifiques d'un compartiment [42], [43]. Chacun des partenaires du complexe s'assemble avec les autres dans une stœchiométrie de 1 : 1 : 1 : 1 (chaque protéine est présente en un seul exemplaire par complexe) pour former ESCRT-I [44], [45], [46]. L'ensemble forme une structure en « hochet » avec une tige rigide de 13 nm constituée essentiellement de Vps23 (= Tsg101), Vps37 et Mvb12 ainsi qu'une tête de 5 nm de long occupée par Vps28 (non nécessaire à l'assemblage du complexe [47]) plus des parties flexibles (Figure 4) [45], [48].

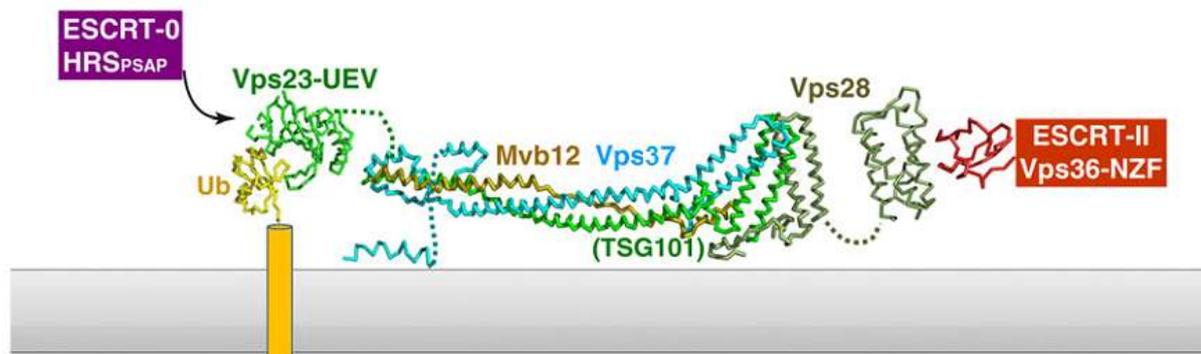


Figure 4 : Modèle de la structure du complexe ESCRT-I (basé sur des données cristallographiques). Voir le texte pour les détails. Figure d'après [22].

1.2.2.1. Interactions avec l'ubiquitine

Le domaine UEV est un variant inactif des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, il est donc également responsable de l'accroche du complexe ESCRT-I aux cargos ubiquitylés [49], [50], [51], [52], [53]. Tsg101 possède un rôle central au sein d'ESCRT-I puisque en plus de contribuer à la formation du complexe, il lui permet d'être recruté par ESCRT-0 et assure enfin un passage de relai en interagissant avec les cargos marqués à l'ubiquitine. La protéine UBAP1, récemment identifiée comme nouveau composant d'ESCRT-I, apporte un deuxième site d'interaction avec l'ubiquitine via son domaine SOUBA en position C-terminale [42], [54]. Il en est d'ailleurs de même de la partie C-terminale de Mvb12 qui peut elle aussi interagir avec l'ubiquitine et ainsi fournir un troisième point d'ancrage d'ESCRT-I aux cargos [55].

1.2.2.2. Interaction avec les cargos, la membrane et les complexes ESCRT

De manière analogue à ESCRT-0 ; ESCRT-I possède un point d'attache à la membrane grâce à la partie N-terminale basique de Vps37 (20 premiers acides aminés) [45]. Pour ce qui est de la protéine Mvb12, elle est nécessaire à la formation d'ESCRT-I ainsi qu'à la conservation de son

intégrité structurale [46], [56], [57], [58]. Mvb12 semble également jouer un rôle dans la reconnaissance de certains cargos [56], [41], [57]. Vps28 assure quand à elle le recrutement de manière directe du complexe ESCRT-II [59], [44]. Des données de pulldown GST indiquent également que Vps28 pourrait recruter ESCRT-III directement (via l'homologue de CHMP6 chez la levure) [60], [47].

1.2.3. ESCRT-II

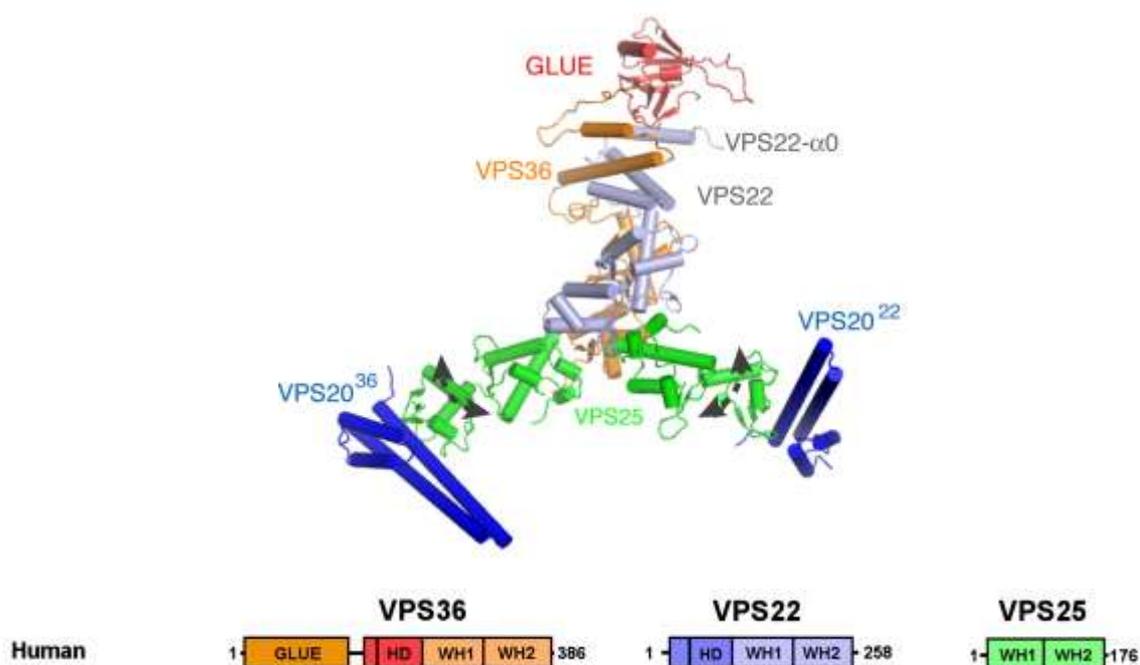


Figure 5 : Structure du complexe ESCRT-II. Voir le texte pour les détails. Figure d'après [61], [62].

1.2.3.1. Interactions avec ESCRT-I, la membrane, l'ubiquitine : importance du domaine GLUE

L'interface entre ESCRT-I et ESCRT-II diffère entre l'homme et la levure. En effet, bien que dans les deux cas l'interaction ait lieu entre Vps28 (ESCRT-I) d'une part et Vps36 (ESCRT-II) d'autre part, les modalités de cette interaction diffèrent. Chez l'homme, Vps28 reconnaît le domaine GLUE situé en N-terminal de Vps36 [63], [61]. Ce domaine reconnaît non seulement ESCRT-I, mais aussi les 3-phosphoinositides (avec une préférence pour le lipide PI(3)P) ainsi que l'ubiquitine [63], [59]. Chez la levure, la situation est plus complexe puisque le domaine GLUE a subi deux insertions de domaines en doigt de zinc (zinc finger) appelés NZF1 et NZF2. NZF1 est responsable de l'interaction avec ESCRT-I alors que NZF2 interagit avec l'ubiquitine [46], [59], [64].

1.2.3.2. Redondance structurale du domaine WH

Vps36 constitue, avec Vps22, ce que l'on peut appeler la « base » du complexe ESCRT-II. En effet, le complexe adopte une forme de « Y » de 12 nm au plus où chacun des deux bras est représenté par un exemplaire de la protéine Vps25 (Figure 5) [65], [61]. Chacune des trois protéines composant le complexe possède deux domaines WH (winged helix) collés l'un à l'autre [65], [61]. Vps36 et Vps22 possèdent également un domaine hélicoïdal (helical domain - HD) très flexible vis-à-vis du reste de la structure (au niveau du pied du « Y ») [61]. A l'instar du domaine GLUE de Vps36, les 25 premiers acides aminés de Vps22 peuvent aussi interagir avec les membranes lipidiques [61].

1.2.3.3. Implications fonctionnelles de la structure d'ESCRT-II

Le recrutement d'ESCRT-III s'opère grâce au domaine WH de Vps25 situé en C-terminal qui interagit avec la protéine CHMP6 (Vps20 chez la levure) [7], [66], [62]. Cette dernière reste au plus près de la membrane endosomale en partie grâce à une myristoylation en N-terminal [8]. Il est intéressant de constater que la structure d'ESCRT-II impose que les deux sous unités CHMP6 se retrouvent orientées dans des plans complètement différents (Figure 5) [62]. Qui plus est, il a été montré que les deux bras d'ESCRT-II sont nécessaires pour permettre un fonctionnement correct d'ESCRT-III [67]. Cela suggère que cette contrainte de positionnement des sous unités CHMP6 a une implication directe dans la manière dont ESCRT-III doit s'assembler dans l'espace pour catalyser la scission membranaire.

Bien que l'on ait longtemps supposé que seul ESCRT-III pouvait déformer la membrane lipidique, des données *in vitro* ont récemment montré que l'action du supercomplexe ESCRT-I/ESCRT-II ne se limitait en réalité pas à rassembler les cargos ubiquitylés [23]. Dans cette étude, des concentrations très faibles d'ESCRT-I et ESCRT-II recombinants suffisent à induire la formation de bourgeons membranaires sur des vésicules lipidiques unilamellaires géantes (GUV). De plus, il a été récemment montré qu'ESCRT-II est capable de former des microdomaines lipidiques pouvant potentiellement faciliter la courbure des membranes [68]. Les données structurales disponibles sur les complexes ESCRT-I et ESCRT-II sont très complètes ; mais il reste toutefois difficile de concevoir comment le supercomplexe peut parvenir à déformer la membrane. A l'heure actuelle, il n'existe qu'un modèle basé sur des expériences *in vitro* de déformation de vésicules qui explique de manière très imparfaite comment ce processus puisse être catalysé par le supercomplexe [23].

Enfin, il est intéressant de constater que le complexe ESCRT-II n'est ni nécessaire dans le bourgeonnement viral [69], ni dans la cytokinèse [70], [71] (bien que Vps22 soit présent au niveau de l'équivalent des centrosomes chez la levure [72]). Si l'on suppose que le rôle d'ESCRT-II est d'assurer une invagination de la membrane, alors on comprend aisément que le complexe soit dispensable dans ces deux processus. En effet, la membrane est déformée par la capsid dans le bourgeonnement viral et par l'anneau contractile d'actomyosine dans la cytokinèse. Cette constatation semble donc appuyer un tel rôle pour ESCRT-II.

1.2.4. ESCRT-III

L'étape finale du processus, consiste à libérer le bourgeon membranaire. Cette opération nécessite un assemblage ordonné des protéines CHMP (Charged Multivesicular Body Proteins) qui composent le complexe au niveau de la membrane lipidique.

1.2.4.1. Formation de polymères et modèle d'interaction avec la membrane

Les protéines CHMP ont la faculté de s'assembler en polymères *in vitro* [73], [74], [75], [76]. Ces polymères peuvent également s'assembler sur les membranes lipidiques afin de les déformer [77], [78], [79]. Chez l'homme, il existe 12 protéines CHMP différentes (7 chez la levure). On considère cependant que le complexe minimal actif est constitué de deux sous-complexes : CHMP6-CHMP4 dans un premier temps, puis CHMP3-CHM2a [8], [79], [80], [78], [73]. Dans le modèle actuel, CHMP6 assure le lien entre ESCRT-II et le reste d'ESCRT-III en recrutant CHMP4 [8], [77], [23], [7]. L'interaction avec CHMP6 au niveau de la membrane endosomale permet d'activer CHMP4 [77] qui polymérise et déforme la membrane (Figure 6A) [78], [23]. Cette première étape a pour but de rétrécir considérablement le diamètre du col membranaire qui relie la vésicule au reste de la membrane ainsi que de permettre l'assemblage du deuxième sous complexe : CHMP3-CHMP2 [8]. En effet, il a été démontré que ces deux protéines étaient capables de former des structures coniques plus ou moins étendues (Figure 6B) [73]. La protéine CHMP2B est également capable de former le même type de structures [81]. Des simulations ont permis de montrer que la courbure des dômes ainsi formés pouvait induire des contraintes mécaniques suffisantes pour générer un clivage spontané de la membrane [82].

Il existe d'autres modèles pouvant expliquer la fission membranaire mais tous reposent globalement sur le même principe de base : les protéines composant ESCRT-III polymérisent sur la membrane et la déforment afin de permettre le clivage [22]. Ce processus est notamment rendu possible par la forte interaction qui existe entre les protéine CHMP et les lipides membranaires, comme cela a été démontré pour CHMP3 et CHMP4 [83], [84].

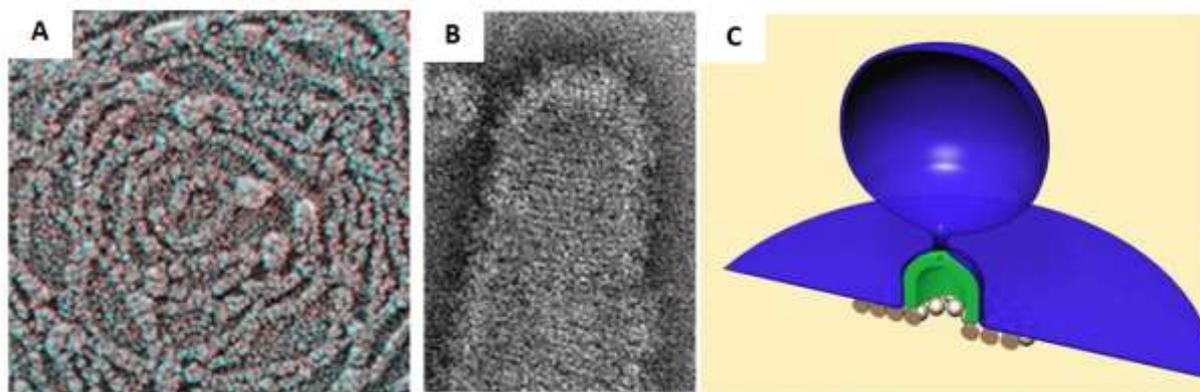


Figure 6 : Modèle d'assemblage séquentiel des polymères ESCRT-III. Images de microscopie électronique : **A.** Polymères de la protéine CHMP4 visionnés sur la membrane plasmique de cellules (diamètre extérieur ~200 nm). **B.** Hétéropolymères CHMP2A/CHMP3 obtenus *in vitro* (diamètre ~50 nm). **C.** Dans le modèle actuel,

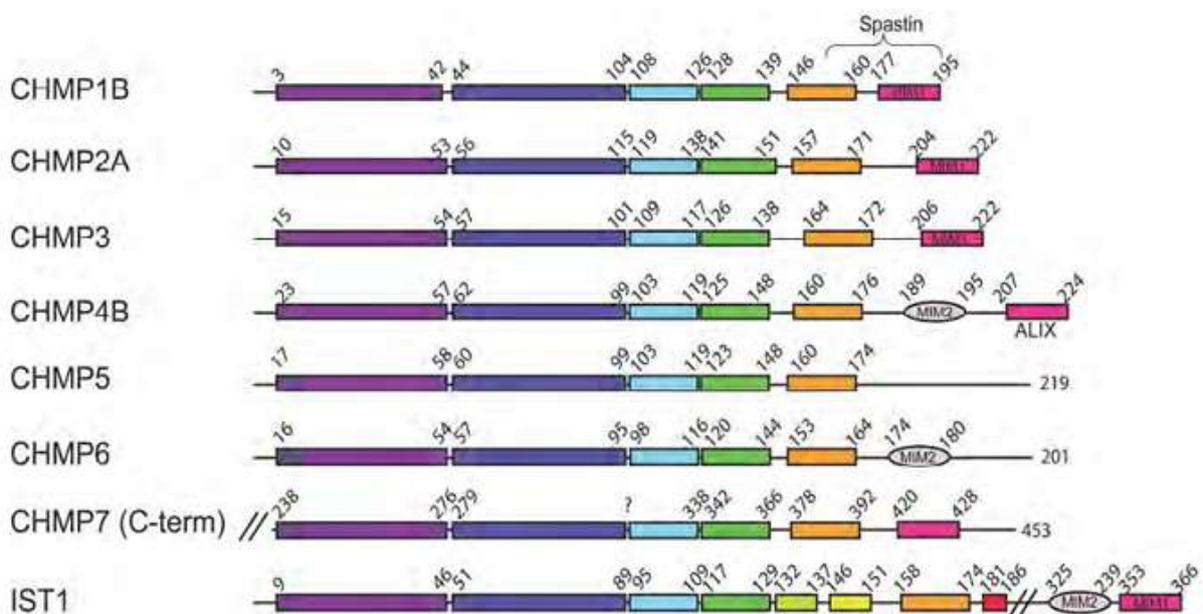
CHMP4 sert de base à l'assemblage de la structure en dôme CHMP2a/CHMP3 qui « ferme » le col membranaire et libère la vésicule lipidique. Figures A d'après [78] et B, C d'après [82].

1.2.4.2. Régulation de l'assemblage du complexe

La polymérisation des protéines CHMP doit nécessairement être un événement très régulé dans la cellule. Bien que l'on comprenne encore mal comment l'activation des protéines CHMP ait lieu, il a été montré que leur queue C-terminale joue un rôle d'autoinhibition en interagissant avec la partie N-terminale (Figure 7C) [85], [80], [86], [76]. Une étude systématique menée sur le rôle de la partie C-terminale de CHMP6, 4, 3 et 2 a montré que la délétion de la queue C-terminale entraînait une relocalisation des protéines (normalement distribuées partout dans la cellule) vers les compartiments membranaires et le noyau [80].

La partie N-terminale des protéines CHMP est riche en acides aminés basiques (interaction avec les phospholipides). Elle est responsable de l'activité de la protéine (polymérisation). Bien qu'ayant une structure primaire assez différente, les protéines CHMP partagent toutes la même structure tridimensionnelle globale (Figure 7A, B) [87], [76]. Les résidus impliqués dans l'activation des homologues de levure des protéines CHMP4 et CHMP3 confirment la participation de l'hélice $\alpha 5$, située dans la queue C-terminale (Figure 7D).

A



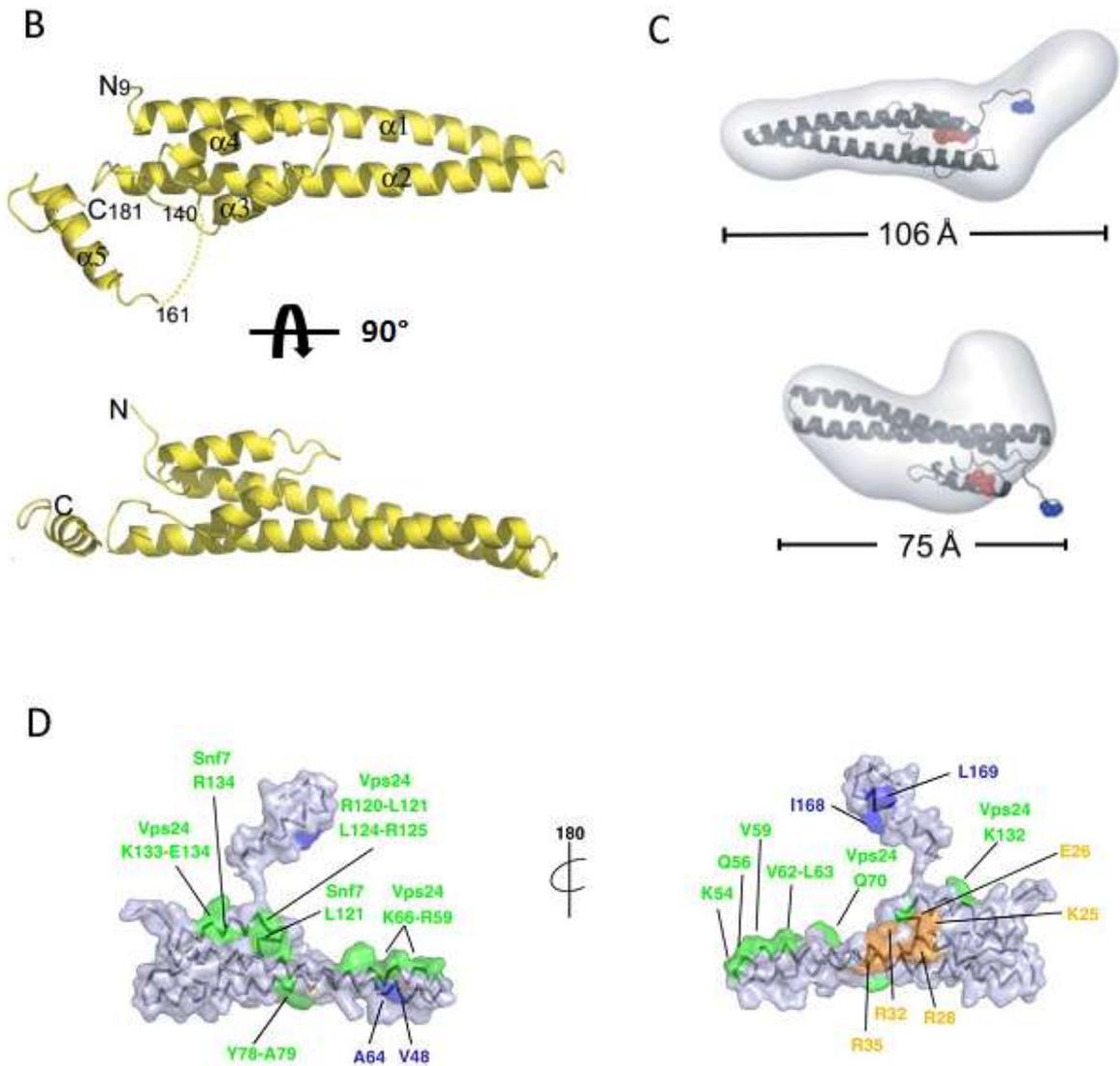


Figure 7 : Structure et mécanisme d'activation des protéines CHMP. **A**. Structures secondaires prédites de quelques protéines CHMP. Chaque protéine possède un cœur N-terminal composé de deux longues hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) suivies de deux autres hélices plus courtes ($\alpha 3$ et $\alpha 4$). La queue C-terminale, impliquée dans l'autoinhibition ainsi que dans le recrutement d'autres protéines, est généralement composée de deux hélices α . **B**. Structure tridimensionnelle de la protéine CHMP3. Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une structure en épingle à cheveu (hairpin) sur laquelle reposent les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$. **C**. Mise en évidence au niveau structural du phénomène d'autoinhibition de la protéine CHMP3. Les enveloppes SAXS montrent nettement que selon la concentration en sel du tampon, CHMP3 peut adopter une conformation ouverte (0.5 M NaCl - active) ou fermée (0 M NaCl - inactive) lorsque la queue C-terminale, riche en résidus acides, se replie sur le cœur basique de la protéine. **D**. Répartition des résidus impliqués dans la polymérisation (marqués en vert), dans l'activation (en bleu) et le ciblage à la membrane (en orange) pour les homologues de CHMP3 (Vps24) et de CHMP4 (Snf7) chez la levure. Figure **A** d'après [76] ; figure **B** adaptée de [87] ; figure **C** et **D** adaptées de [86] et [22] respectivement.

1.2.4.3. Interactions au sein d'ESCRT-III

Il a été montré que CHMP6 interagit avec CHMP4 d'une part et que CHMP3 et CHMP2a forment un hétéropolymère d'autre part [8], [73]. En revanche, il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus sur la manière dont les protéines CHMP interagissent entre elles pour former un polymère sur le plan structural. Plusieurs zones d'interaction ont pu être identifiées notamment au niveau des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 4$ (Figure 7D) mais elles ne permettent pas de comprendre comment le polymère peut être formé. Les tronçons de la queue C-terminale de CHMP3 sont capables de dimériser en solution et les structures cristallographiques de CHMP3 révèlent la présence d'une interface de dimérisation à la pointe de l'épingle formé par $\alpha 1$ et $\alpha 2$ [87], [76]. D'autres patches d'acides aminés ont également été identifiés : CHMP1B reconnaît la jonction entre $\alpha 2$ et $\alpha 5$ dans la conformation fermée d'IST1 [76] ; CHMP4B interagit avec trois arginines situées sur l'hélice $\alpha 1$ de CHMP2a alors que cette dernière s'associe avec CHMP4B au niveau de la boucle située entre $\alpha 2$ et $\alpha 3$ [88]. L'interaction entre CHMP4 et CHMP6 semble elle aussi faire intervenir l'hélice $\alpha 2$ ainsi que la boucle entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sur CHMP4 [77].

De toute évidence, ces données sont incomplètes et ne permettent pas d'établir avec précision la façon dont les protéines CHMP interagissent entre elles. Enfin, il n'est pas exclu que des changements conformationnels majeurs tels que des échanges de domaine soient nécessaires pour construire le polymère ESCRT-III.

1.2.4.4. Rôles respectifs des protéines CHMP dans le fonctionnement d'ESCRT-III

Dans le modèle actuel, CHMP6 n'est présente qu'en amont pour activer la polymérisation de CHMP4 [8], [77]. CHMP4 permet quand à elle de produire la force de constriction nécessaire au rétrécissement du col membranaire [78], [79], [23]. Les isoformes CHMP4A et CHMP4B sont toutes deux capables de former des structures polymériques très semblables [78] alors que CHMP4C semble ralentir la polymérisation d'ESCRT lors de la cytokinèse afin de laisser le temps au chromosomes de migrer dans leurs cellules respectives [89]. La différence existant au niveau fonctionnel entre chacune des isoformes de CHMP4 reste cependant peu décrite.

Toujours selon le modèle, CHMP3 et CHMP2 interviennent en aval de CHMP4 et permettent la formation d'une structure conique qui clos le col de membrane qui retient la vésicule [8], [73], [82]. Des travaux menés sur la protéine CHMP2B ont révélé qu'elle était capable elle aussi de former ce type de structure conique sans la présence de CHMP3 [81]. Ainsi, il semblerait qu'il existe au moins deux systèmes capables de catalyser cet événement.

L'apparition du compartiment de classe E chez les mutants ESCRT-III rend difficile l'analyse du rôle des différents composants d'ESCRT-III. En revanche, des données basées sur l'utilisation de siRNAs lors du bourgeonnement du VIH ont permis d'avoir une compréhension plus fine de l'action de chaque intervenant [88]. Ainsi, des expériences de déplétions sélectives ont permis de montrer que parmi les trois isoformes de CHMP4, CHMP4B était la plus importante pour permettre le bourgeonnement bien que la déplétion de CHM4A puisse, dans une moindre mesure, impacter le processus. CHMP4C en revanche ne semble jouer aucun rôle dans la réaction. Les protéines CHMP2A et CHMP2B sont toutes deux capables de réaliser la réaction, les données indiquent d'ailleurs que leur rôle est au moins partiellement redondant. Ceci est en accord avec les similarités structurales que présentent leurs polymères respectifs [73], [81].

Le mode d'action global d'ESCRT-III lors du bourgeonnement du VIH, de la cytokinèse et de la formation du MVB doit être relativement similaire. Tout comme pour la libération des particules virales, les protéines CHMP4B, CHMP2A et CHMP2B ont été retrouvées au niveau du midbody lors de la division cellulaire [90]. De plus, des structures en anneau ou en spirale correspondant vraisemblablement au polymère ont été observé dans les deux processus [90], [88]. Cependant, il faut noter que dans le cas de la cytokinèse, toutes les protéines ESCRT-III ont été identifiées comme étant requises pour permettre la division des cellules [91]. Le bourgeonnement viral fait donc appel à une machinerie ESCRT-III plus réduite.

Le rôle des autres protéines CHMP reste encore mal compris. Comme dans le cas de CHMP2A et CHMP2B, il doit certainement exister une grande redondance fonctionnelle au sein d'ESCRT-III. C'est ce que suggère l'étonnante similarité structurale existant entre les différents membres du complexe (Figure 7A). Il est possible que le grand nombre de sous unités présent au sein d'ESCRT-III puisse permettre de réguler très finement la cinétique de polymérisation comme avec CHMP4C lors de la cytokinèse. Il paraît également vraisemblable que certaines sous unités ne soient requises que lors de l'accomplissement d'un des nombreux processus cellulaires nécessitant ESCRT-III. Le fait qu'il existe 12 sous unités au sein du complexe montre en tout cas la richesse des interactions pouvant potentiellement avoir lieu dans le polymère. Chacune des sous unité peut recruter des partenaires protéiques différents et cela souligne la complexité des régulations qui doivent exister pour contrôler ESCRT-III chez l'homme.

1.2.5. Les protéines associées

1.2.5.1. Le complexe VPS4/VTA1

VPS4 est une ATPase impliquée dans le désassemblage des complexe ESCRT-III [9]. VPS4 est une ATPase de type AAA (*ATPase associated with a variety of cellular activities*) qui est dimérique en solution mais elle s'oligomérisse sous forme de dodécamère en présence d'ATP [9], [92], [93].

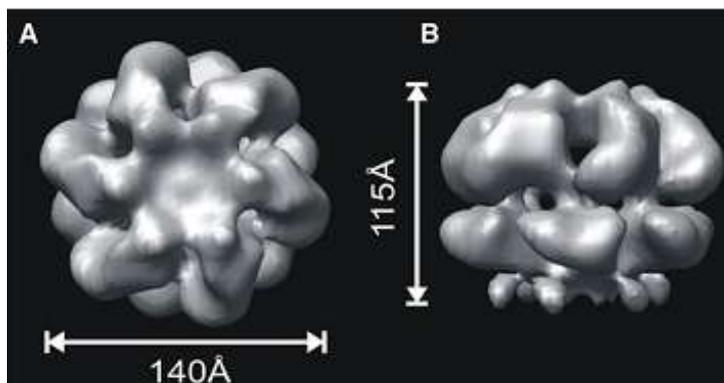


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'ATPase VPS4. La forme active de l'ATPase s'oligomérisse en dodécamère constitué de deux anneaux hexamérique assemblés « dos à dos ». Figure d'après [93].

L'assemblage de VPS4 en deux anneaux hexamériques est stabilisé par la protéine VTA1 [94], [93]. La partie N-terminale de VPS4 contient un domaine MIT (microtubule interacting and transport) qui est capable d'interagir simultanément avec les domaines MIM1 et MIM2 présents dans la queue C-terminale des protéines ESCRT-III (Figure 7A) [84], [95], [96]. VTA1 possède également deux domaines MIT en N-terminal qui sont notamment capables d'interagir avec CHMP5 et CHMP1 [97].

Ainsi, lors de l'assemblage du polymère ESCRT-III, un grand nombre de motifs MIM (MIT interaction motif) devient disponible pour recruter VPS4 et VTA1. Cette concentration locale des deux protéines active la fonction ATPase de VPS4 en favorisant l'assemblage du dodécamère. Il faut toutefois nuancer cette vision car IST1, bien que recrutant VPS4 au niveau des complexes ESCRT-III (grâce à son interaction avec CHMP1), a été identifié comme régulateur négatif de l'assemblage du dodécamère en formant un hétérodimère avec VPS4 [98]. Ces régulations exercées sur VPS4 semblent affecter directement la taille des vésicules délivrées dans le MVB [99].

La contribution exacte de VPS4 est encore mal définie. Selon une première hypothèse, l'ATPase ne jouerait pas un rôle actif dans la libération de la vésicule. Dans ce cas, VPS4 ne servirait qu'à désassembler le polymère au niveau de la membrane afin de permettre le recyclage des sous-unités composant ESCRT-III. Dans une deuxième hypothèse VPS4 serait en revanche nécessaire pour permettre une fission membranaire efficace en augmentant le stress mécanique exercé sur la membrane par le biais du désassemblage du polymère. Certains travaux menés sur la cinétique d'assemblage d'ESCRT-III et VPS4 lors de la cytokinèse et lors du bourgeonnement du VIH semblent toutefois accréditer la deuxième hypothèse qui attribue un rôle actif à VPS4 dans le processus [100], [101], [102], [91], [103].

1.2.5.2. ALIX

La protéine ALIX présente un domaine BRO N-terminal capable d'interagir avec toutes les isoformes de CHMP4 [104], [105], [106], [107], [75] ; un « V domain » central capable de dimériser [75] et un domaine PRD responsable de l'interaction avec TSG101 (ESCRT-I) ainsi que de l'autoinhibition de la protéine [106], [107], [108], [109]. Ainsi, chez l'homme ALIX est capable de créer un lien entre ESCRT-I et ESCRT-III alors que chez la levure, l'homologue de CHMP6 interagit directement avec ESCRT-I [60].

Le dimère ALIX présente une analogie structurale frappante avec le complexe ESCRT-II ; il pourrait donc remplacer ce dernier lors du bourgeonnement viral (où ESCRT-II n'est pas nécessaire) [75], [101], [110]. ALIX joue également un rôle encore mal compris au niveau du corps multivésiculaire et de la cytokinèse [104], [111], [70], [71].

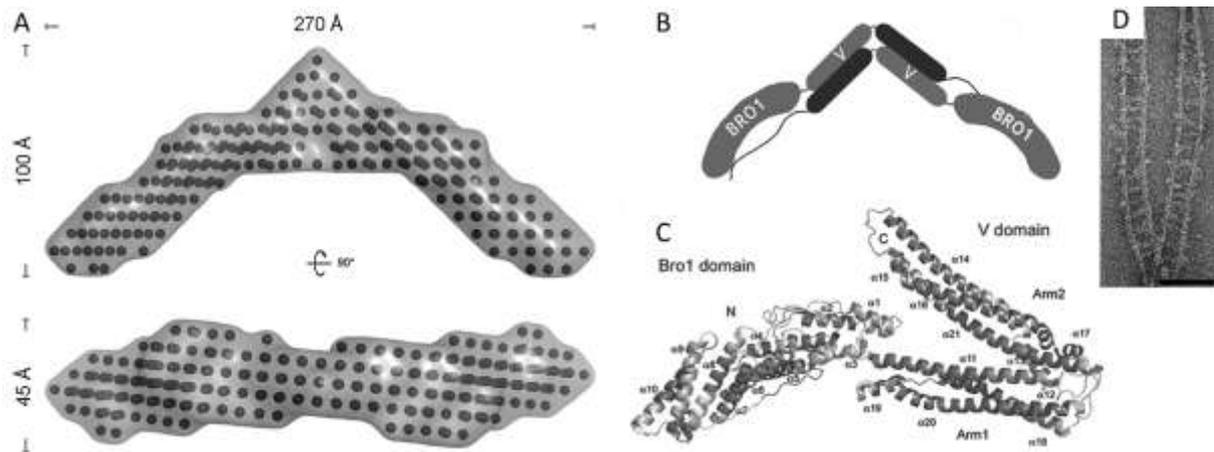


Figure 9 : Structure de la protéine ALIX. **A.** Enveloppes SAXS montrant que le dimère ALIX adopte une forme de croissant par dimérisation du domaine V. **B.** Chaque bras du dimère est terminé par le domaine BRO responsable de l'interaction avec CHMP4. **C.** Structure cristallographique d'ALIX (Bro & V domains). **D.** Polymères de CHMP4B incubés avec ALIX et visualisés par microscopie électronique en coloration négative (barre d'échelle : 100 nm). Les filaments produits par CHMP4B sont interconnectés par deux de manière très nette grâce à ALIX (sur l'image, on peut se représenter la structure comme une échelle dont les montants sont matérialisés par CHMP4B, ALIX en constitue les barreaux). Figures **A**, **B** et **D** d'après [75], figure **C** d'après [112].

1.2.5.3. AMSH

AMSH est une protéine chargée d'éliminer l'ubiquitine des cargos avant qu'ils soient internalisés dans les ILVs (tout comme UBPY), elle est spécifique de l'ubiquitine liée K63 [113]. AMSH est recrutée par STAM (ESCRT-0) et CHMP3 notamment grâce à son domaine MIT [35], [114].

Les protéines associées aux complexes ESCRT permettent d'interconnecter certains complexes de la machinerie et jouent probablement un rôle dans la régulation de l'assemblage d'ESCRT. Certaines protéines comme VPS4 semblent avoir une participation directe dans le processus catalysé par ESCRT-III alors que d'autres comme ALIX semblent avoir un rôle plus spécifique comme pour le bourgeonnement du VIH. Il reste encore probablement de nombreux facteurs protéiques impliqués dans la régulation d'ESCRT à identifier et l'analyse systématique de leur fonction exacte au sein de la machinerie permettra certainement de mieux comprendre comment ESCRT fonctionne.

1.3. Rôles de la machinerie ESCRT

En fonction du contexte dans la cellule, la machinerie ESCRT peut être responsable ou non de la vésiculation des membranes biologique mais son but principal est l'activation des complexes ESCRT-III et VPS4 qui permettent de libérer une vésicule lipidique en formation (Figure 10 - iii-vi).

Cette fonction requiert la formation d'une structure spirale qui s'assemble dans le col membranaire reliant la vésicule en formation au reste de la membrane lipidique [22], [48]. Cette structure, qui interagit fortement avec la membrane, réduit la taille du cou membranaire et exerce des contraintes mécaniques considérables qui permettent de favoriser la fission et ainsi libérer la vésicule. En fin de processus l'ATPase VPS4 désassemble le polymère.

Le modèle de fonctionnement d'ESCRT-III est encore débattu. On distingue deux modèles qui attribuent des contributions différentes aux protéines CHMP4, CHMP3 et CHMP2 notamment (Figure 10 - iv-v).

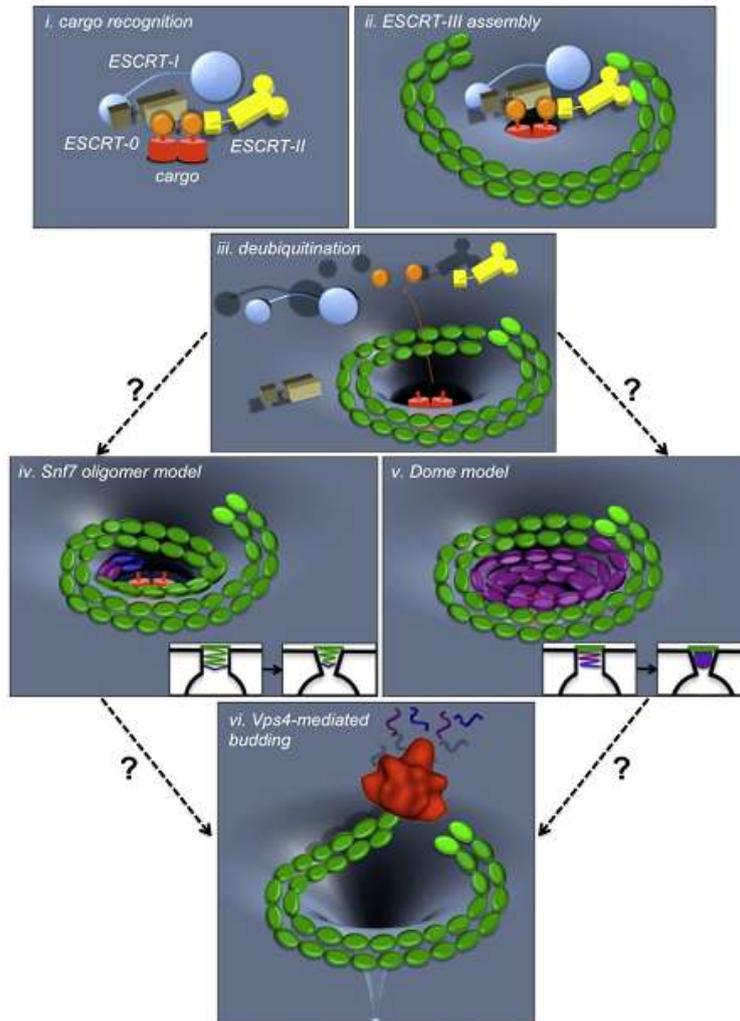


Figure 10 : Modèle de formation et libération de vésicules lipidiques par la machinerie ESCRT. Les cargos ubiquitinylés recrutent les complexes ESCRT-0, ESCRT-I et ESCRT-II au niveau de la membrane (i). Le supercomplexe ESCRT-I/ESCRT-II amorce la vésiculation et recrute ESCRT-III (ii). Après que l'ubiquitine sur les cargos ait été éliminée (iii), le polymère ESCRT-III se forme sur la membrane et rétrécit le cou membranaire connectant la vésicule selon un modèle encore débattu. Le premier modèle implique la formation d'un polymère majoritairement composé de Snf7 (homologue de CHMP4, en vert sur le schéma), CHMP2 et CHMP3 (violet) ne jouant un rôle que dans le recrutement de l'ATPase VPS4 (iv). Le second modèle stipule que CHMP4 polymérise pour contracter le col membranaire puis recrute CHMP2A et CHMP3 afin de former une structure en dôme qui ferme encore plus le col (v). Finalement, la vésicule est libérée suite à l'action de VPS4 (en rouge) qui désassemble le polymère (vi). Figure d'après [115].

La machinerie ESCRT répond à un besoin cellulaire fondamental : être capable de libérer des vésicules lipidiques dans le milieu extracellulaire ou dans un organelle précis depuis le cytoplasme. Ce processus complexe est nécessaire dans un très grand nombre de situations et il requiert une machinerie dédiée hautement spécifique. Comme on nous allons le voir, l'importance que revêt le système ESCRT dans la cellule repose sur le fait qu'il se situe au carrefour de nombreuses fonctions cellulaires majeures.

1.3.1. Tri vers les corps multivésiculaires

Pour bien appréhender quel peut être le rôle des complexes ESCRT dans le tri des cargos protéiques membranaires, il est nécessaire d'avoir une vision d'ensemble du processus cellulaire qu'est la voie endo-lysosomale (Figure 11).

Dans la plupart des cas, l'ubiquitine agit comme un signal favorisant l'internalisation des protéines membranaires par endocytose ainsi qu'un ciblage vers la voie endolysosomale [116], [6], [117], [118]. Il s'agit alors soit de monoubiquitine ou de chaînes de polyubiquitine liées par la lysine 63. Par la suite, les vésicules contenant les cargos fusionnent avec une structure membranaire particulière : l'endosome précoce. Cette structure sert de plateforme d'adressage pour les cargos. Ils peuvent être recyclés ou détruits. C'est là que la machinerie ESCRT intervient ; elle agit au niveau des endosomes précoces afin de regrouper les cargos à éliminer et les internalise dans des vésicules lipidiques libérées dans le lumen des endosomes (vésicules intraluminales ou ILVs) [119], [120]. Suite à l'action de tri répétée de la machinerie ESCRT, l'endosome précoce mature en corps multivésiculaire (MVB) riche en ILVs [6], [9], [8], [7].

Il est important de garder présent à l'esprit que la prise en charge des cargos par les complexes ESCRT constitue un point de non retour en ce sens qu'une fois incorporés au sein d'ILVs ; les cargos seront nécessairement dégradés lors de la fusion avec le lysosome. A ce titre, ESCRT joue un rôle important dans la signalisation cellulaire puisque de nombreux récepteurs activés continuent à transmettre un signal tout au long la voie endosomale jusqu'à leur incorporation dans les ILVs [121]. C'est à ce moment seulement qu'ils se retrouvent séparés physiquement du cytoplasme, c'est-à-dire de leurs partenaires de signalisation. Qui plus est, la participation d'ESCRT dans la signalisation ne s'arrête pas là. En effet, les complexes ESCRT interviennent de manière active dans la libération d'exosomes (impliqués dans la communication intercellulaire) soit indirectement lorsque le MVB libère les ILVs dans le milieu extérieur après fusion avec la membrane plasmique [122], soit directement en permettant le relargage de vésicules à partir de la membrane plasmique [123].

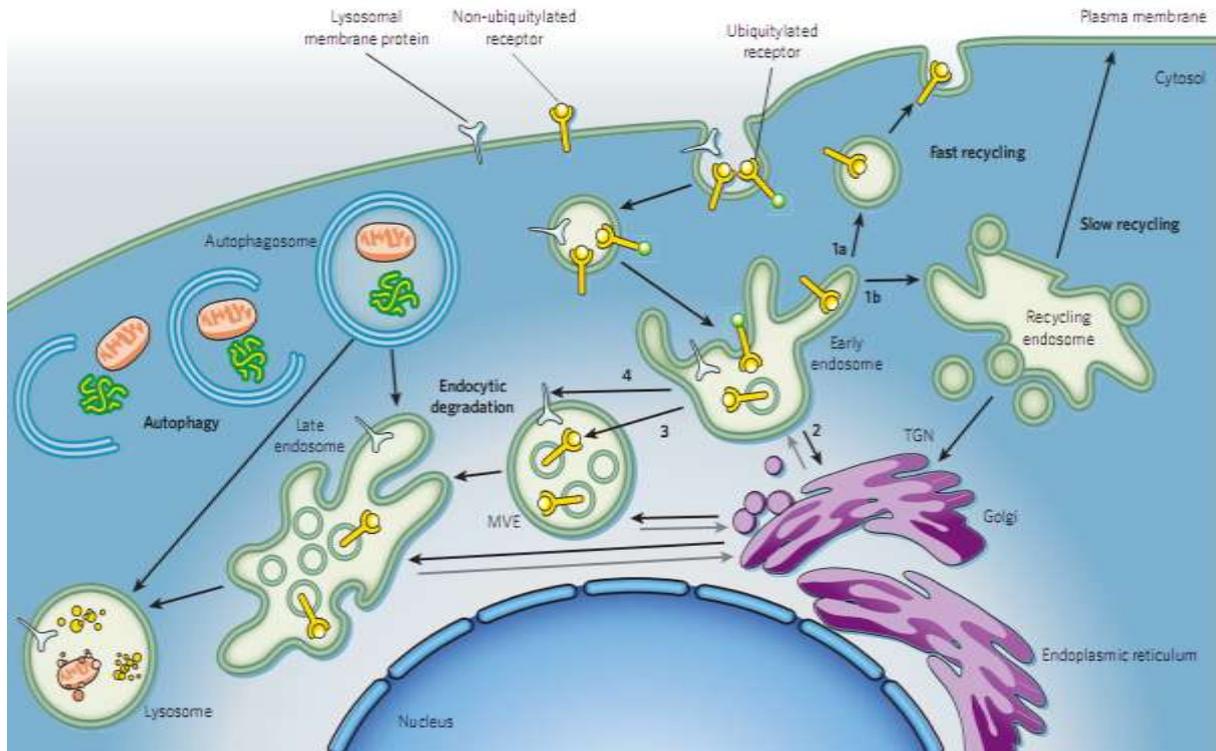


Figure 11 : Internalisation et tri des récepteurs membranaires vers la voie de recyclage et la voie endo-lysosomale. Les protéines membranaires à dégrader sont marquées par monoubiquitinylation (ou polyubiquitine K63) et sont endocytées par le biais de la clathrine. Les vésicules ainsi formées fusionnent avec une structure membranaire appelée endosome précoce. L'endosome précoce fonctionne comme une véritable plate-forme de tri qui permet de décider de l'avenir de chaque protéine (appelées cargos à ce stade). Il existe alors deux possibilités : recyclage (voies **1a** et **1b** sur le schéma) ou dégradation (voies **3** et **4** - la voie **2** étant une voie de transit). Le tri est pris en charge par la machinerie ESCRT qui permet d'internaliser les cargos dans l'endosome (voie **3** uniquement), conduisant ainsi à la formation de l'endosome multivésiculaire (MVE ou MVB). La maturation des MVBs conduit à la formation de l'endosome tardif qui, par fusion avec le lysosome, permet la dégradation de son contenu (cargos et vésicules intraluminales ou ILVs). Adapté de [119].

1.3.2. Cytocinèse

La cytokinèse représente le processus de séparation des cellules filles durant la division cellulaire. Plus spécifiquement elle correspond à une division du cytoplasme en individualisant chaque cellule fille. Cette opération s'amorce en fin de mitose/méiose, durant la télophase, où un anneau contractile formé de myosine et de filaments d'actine dessine un sillon de division entre les deux cellules en devenir. Ce processus actif conduit à un rétrécissement progressif du pont cytoplasmique au niveau du sillon reliant les cellules filles. L'actine à elle seule ne permet pas de provoquer la scission. A ce stade, le pont cytoplasmique reliant les cellules est appelé « midbody » (« corps intermédiaire »). Il s'agit d'une zone riche en microtubules (issus du fuseau de division) qui est le siège de la scission, opérée par les complexes ESCRT (Figure 12) [71]. La protéine centrosomale CEP55 est chargée du recrutement de la machinerie ESCRT au niveau du midbody mais il existe probablement d'autres protéines impliquées dans cette fonction [70], [71], [89].

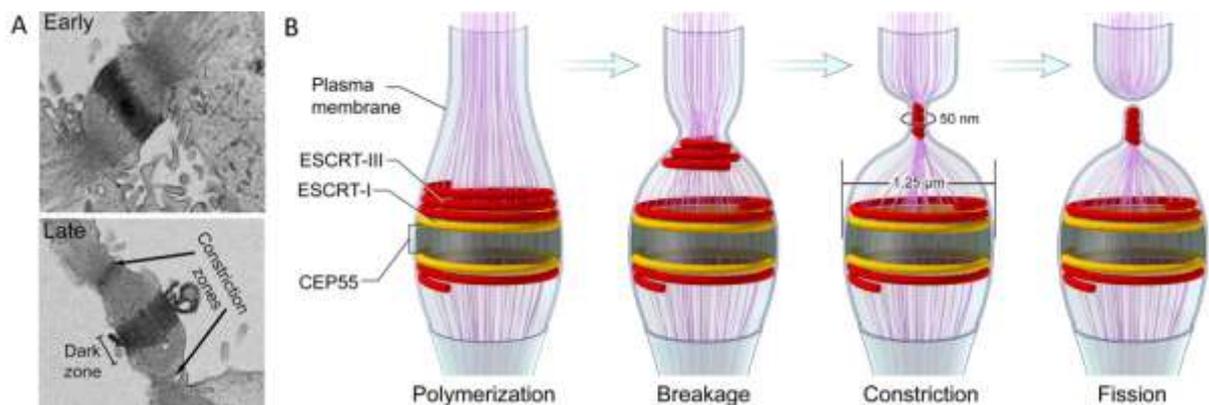


Figure 12 : Modèle de constriction et clivage du pont intercytoplasmique (midbody) par la machinerie ESCRT lors de la cytokinèse. **A.** Images de microscopie électronique du midbody de cellules de mammifère en division. Dans la phase précoce (early), on distingue essentiellement une bulle de cytoplasme reliant encore les cellules filles qui contient une zone sombre (dark zone) correspondant aux microtubules du fuseau de division. Dans la phase tardive (late) de l'abscission, on distingue deux zones de constriction qui correspondent aux endroits précis où la séparation a lieu. **B.** La fission fait intervenir les complexes ESCRT-I et ESCRT-III qui forment une spirale au contact de la membrane plasmique. Cette structure réalise à la fois la constriction ainsi que le clivage final séparant les cellules filles. Figure A d'après [103], et B d'après [124]

La machinerie ESCRT intervient donc dans la phase finale de la division cellulaire en séparant les cellules filles. Son rôle semble cependant être plus large dans le processus puisque certains composants d'ESCRT-III peuvent prévenir l'apparition de dommages génétiques lors de la division [91], [89]. Enfin, ESCRT-III se charge du recrutement de la spastine qui désassemble le faisceau de microtubules traversant le midbody pour permettre à la constriction et à la fission d'avoir lieu [125], [90].

1.3.3. Autophagie et régulation de la transcription

L'autophagie est un processus cellulaire qui permet l'élimination de sections entières du cytoplasme. Cela permet par exemple aux cellules de récupérer de l'énergie rapidement lorsqu'elles manquent de nutriments mais aussi de détruire des organelles défectueux ou encore des agrégats protéiques. Une double membrane issue du réticulum endoplasmique englobe alors la zone à éliminer dans un autophagosome qui fusionnera ensuite avec les endosomes tardifs/MVBs (produisant ainsi un compartiment hybride appelé amphisome) ou avec le lysosome pour en dégrader le contenu [126], [127].

Le lien entre la machinerie ESCRT et l'autophagie a commencé à être établi lors d'expériences visant à bloquer le fonctionnement d'ESCRT dans lesquelles les autophagosomes s'accumulaient de manière anormale [128], [129], [130]. Ce phénotype peut être expliqué soit par une induction accrue de l'autophagie en l'absence d'ESCRT ou alors par un blocage de la fusion des autophagosomes. Quoiqu'il en soit, le mécanisme par lequel ESCRT intervient dans ce processus est inconnu à l'heure actuelle. Une hypothèse séduisante est que la machinerie ESCRT soit nécessaire à la fermeture du

phagophore (la fermeture de l'autophagosome par jonction des membranes) car il se trouve que le mécanisme serait alors topologiquement similaire à ce que l'on trouve pour les autres fonctions cellulaires d'ESCRT [131]. Enfin, il a été montré que des protéines cytosoliques étaient spécifiquement incorporées à l'intérieur des ILVs en formation dans un processus dépendant d'ESCRT appelé microautophagie [132]. Il semble donc que les connections entre ESCRT et l'autophagie soient multiples ; des recherches plus approfondies étant nécessaires pour comprendre quelle est la contribution exacte d'ESCRT dans ce mécanisme complexe.

Etonnamment, de nombreux composants de la machinerie ESCRT ont été identifiés dans le noyau des cellules comme régulateurs de l'expression des gènes [133], [80], [134], [135], [136]. Dans ce cas, les partenaires protéiques sont très variés et ESCRT agit au niveau transcriptionnel. Ainsi, des protéines appartenant aux complexes ESCRT-I [137], [138], [139], ESCRT-II [140], [135], [141], mais également ESCRT-III [134] ont été identifiées comme étant impliquées dans cette régulation de la transcription des gènes. Là encore les mécanismes d'action sont variés mais méconnus. Cette fonction d'ESCRT semble toutefois dissociée des autres sur le plan mécanistique car elle ne fait pas intervenir de membranes lipidiques. Il n'est cependant pas exclu que la formation de structures analogues à celles impliquées dans la fission membranaire soient également présentes dans le noyau pour y assurer une fonction différente.

1.3.4. Bourgeonnement viral

De nombreux virus ont su mettre à profit la formidable plasticité de la machinerie ESCRT [142]. En effet, des virus enveloppés tels que les Retrovirus (ex : VIH, EIAV), les Rhabdovirus (ex : virus de la Rage), les Filovirus (ex : Ebola, Marbourg) mais aussi des virus à ADN tels que les virus de l'Hépatite B, l'Herpes simplex ou encore l'Epstein-Barr utilisent tout ou partie de la machinerie pour compléter leur cycle [142].

Le bourgeonnement du VIH compte parmi les exemples les mieux documentés d'utilisation de la machinerie ESCRT. La polyprotéine Gag formant la capsid du virus possède un motif C-terminal appelé domaine tardif (*late domain*) qui recrute la machinerie ESCRT pour assurer le bourgeonnement du virion [106], [143]. D'autres régions de la polyprotéine Gag jouent également impliquées dans la dépendance du VIH vis-à-vis d'ESCRT [144]. Le recrutement d'ESCRT se produit très rapidement après le début de l'assemblage de Gag au niveau de la membrane plasmique et l'action de la machinerie se termine avant que l'assemblage soit terminé [145]. Deux motifs ont été identifiés au niveau de p6 ; le motif PTAP qui recrute Tsg101 (ESCRT-I) et le motif LYPXnL connu pour recruter le domaine V de la protéine ALIX [112], [38], [146], [143]. Il semble toutefois que le rôle d'ALIX soit moins important qu'ESCRT-I dans le processus [112], [147]. L'assemblage à la membrane et la libération du virion nécessitent environ 10 min [148], [101]. Il a été montré que la vitesse à laquelle se déroule le bourgeonnement dépendant du motif PTAP est régulée par la kinase TBK1 selon un mécanisme où TBK1 interagit avec Vps37 (ESCRT-I).

La protéine ALIX joue un rôle important lors du bourgeonnement du VIH et des données récentes suggèrent qu'elle agisse comme une plate-forme de recrutement qui promeut la libération des virions par différentes voies [112]. En plus de l'interaction avec p6, le domaine Bro1 d'ALIX est

capable d'interagir directement avec le domaine nucléocapside (NC) de Gag [149], [150]. La disponibilité du site d'interaction d'ALIX avec p6 est d'ailleurs régulée car le site ne se trouve exposé que pour la fraction d'ALIX localisée à la membrane [151]. Contrairement à ESCRT-III et VPS4, ALIX n'est pas recyclée après le bourgeonnement et reste à la membrane avec Gag sur les sites d'assemblage [101].

Le complexe ESCRT-II n'est pas requis pour permettre le bourgeonnement viral [69]. Cela pose la question de la manière dont ESCRT-I et ALIX peuvent activer ESCRT-III. Il est connu que le domaine PRD d'ALIX (qui interagit avec Tsg101) lie un patch au sein du domaine Bro1 et que cette interaction génère la forme autoinhibée de la protéine [108]. Or le dimère de la protéine ALIX est capable de lier deux filaments CHMP4 différents [75]. De ces données, il est donc tentant d'envisager que le recrutement de Tsg101 au site de bourgeonnement provoque la formation de dimères ALIX actifs qui pourraient ensuite coordonner l'assemblage de deux polymères CHMP4, comme le fait ESCRT-II (Figure 13) [67], [110].

L'ubiquitine ligase Nedd4 en tant que partenaire d'ALIX dans le bourgeonnement des rétrovirus [152] est intéressante à bien des égards. En effet, il a été démontré que Nedd4-1 est capable de compléter l'absence de bourgeonnement chez les virions dont le motif PTAP est absent et cet effet est indépendant de Tsg101 [152]. De plus, lors de ces expériences, le sauvetage des virions nécessitait l'interaction entre ALIX et Gag. Cette interdépendance fonctionnelle repose sur l'ubiquitination d'ALIX par Nedd4-1 [152]. Chez d'autres rétrovirus comme le MLV (Murine Leukemia Virus) ou l'HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type-1), l'accès à la machinerie ESCRT semble s'opérer par le biais des ubiquitine ligases HECT (connues pour interagir avec les domaines tardifs viraux PPXY) et les protéines ART qui procurent de multiples interactions avec les composants de la machinerie ESCRT [153]. Les ubiquitine ligases jouent un rôle majeur dans le recrutement d'ESCRT au niveau des sites de bourgeonnement et des résultats obtenus sur le PFV (Prototypic Foamy Virus) ont montré que l'activité ubiquitine ligase était primordiale dans le processus [154].

L'ubiquitination K-63 peut ainsi stimuler le bourgeonnement du VIH [155] et bien qu'ESCRT-I soit capable d'interagir avec l'ubiquitine, cet action est indépendante de Tsg101 [152]. Par ailleurs, les données disponibles actuellement sur l'ASV (Avian Sarcoma Virus) suggèrent que Tsg101 et Nedd4 constituent deux voies non interdépendantes pour effectuer le bourgeonnement [156].

Sans la présence d'ESCRT, les virions restent piégés en surface des cellules par le col membranaire qui les attache à la membrane plasmique (Figure 13) [106], [107], [88]. Il semble que le bourgeonnement viral fasse appel à une machinerie ESCRT réduite. Parmi les protéines composant ESCRT-III, CHMP4B, CHMP2 et CHMP1 semblent jouer un rôle majeur dans le processus [101], [88]. La présence des protéines ESCRT-III CHMP2 et CHMP4 est primordiale pour la libération des virions [88]. Ces dernières forment un polymère sur la membrane plasmique au niveau du site de bourgeonnement et permettent la libération des virions par clivage membranaire avec la participation de VPS4 [106], [88], [100], [101].

Gag possède de multiples voies d'accès à la machinerie ESCRT et le rôle exact de chacun des composants est là encore mal connu. Dans le modèle exposé en figure 13, ALIX et ESCRT-I permettent l'assemblage des filaments CHMP4 qui rétrécissent le col membranaire et permettent

ensuite l'activation et l'assemblage du polymère CHMP2. Une fois ce polymère ESCRT-III assemblé, l'ATPase VPS4 désassemble la structure et le virion est libéré.

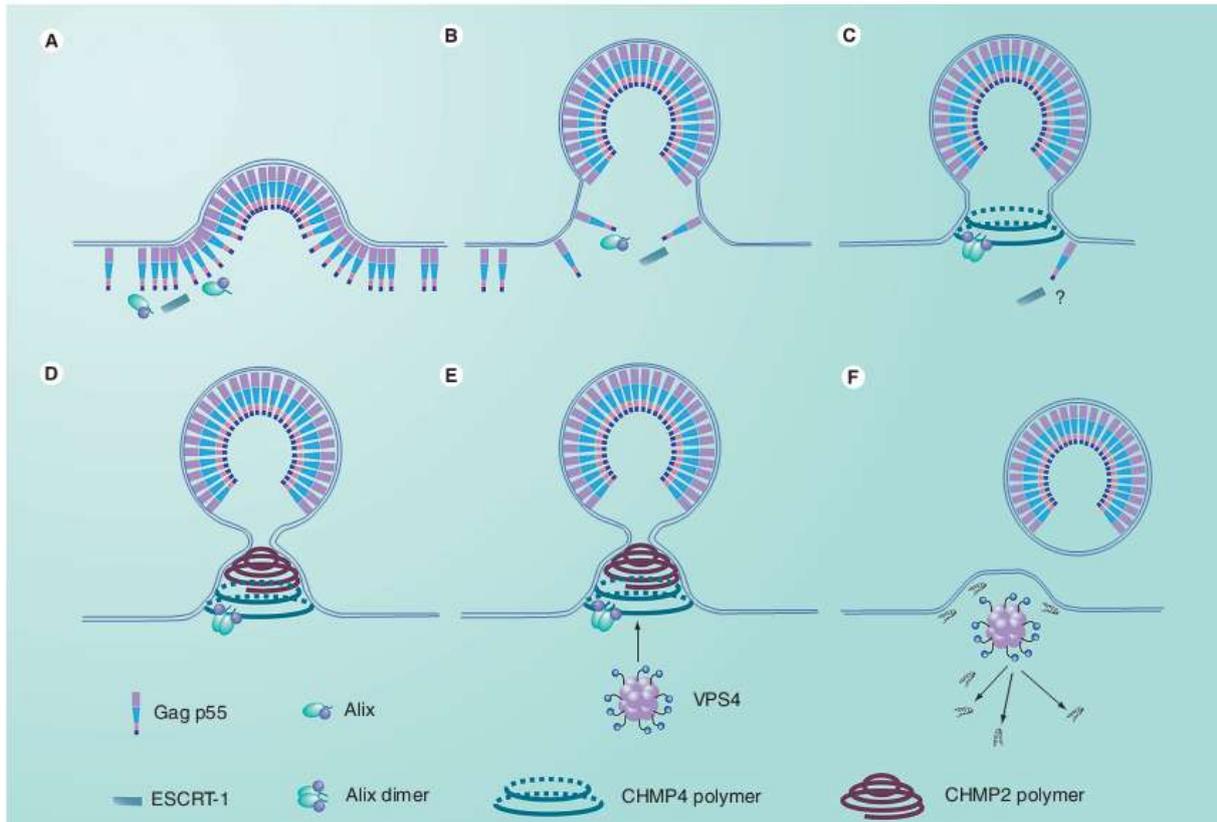


Figure 13 : Modèle de bourgeonnement du VIH assisté par la machinerie ESCRT. **A.** Les polyprotéines virales Gag s'assemblent au contact de la membrane plasmique. **B.** La capsid en cours d'assemblage recrute ESCRT-I ainsi que la protéine ALIX. **C et D.** ESCRT-III intervient (protéines CHMP4 et CHMP2 sur le schéma) en formant une structure spirale à la base du col membranaire afin d'en rétrécir le diamètre pour rendre la fission possible. **E et F.** L'ATPase VPS4 désassemble le complexe ESCRT-III et le virion est libéré. Figure d'après [110].

L'ensemble de la machinerie ESCRT constitue le centre névralgique d'une multitude de fonctions cellulaires fondamentales très dissemblables. Cette fascinante polyvalence fonctionnelle des protéines ESCRT constitue un des points les plus remarquables de cette machinerie cellulaire complexe.

1.4. Article (Review) : Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding.

Dordor A, Poudevigne E, Göttlinger H, Weissenhorn W.

Future Microbiol. 2011 Oct; 6(10):1159-70.

- **Résumé de l'article:** Cet article de review dresse l'état actuel des connaissances sur les facteurs cellulaires recrutés par la protéine rétrovirale Gag pour son adressage et son assemblage. L'accent est porté sur le recrutement de la machinerie ESCRT par Gag et sur son rôle dans le bourgeonnement viral. L'article propose un modèle intégré du bourgeonnement du VIH catalysé par ESCRT ainsi que des pistes sur le rôle des différents acteurs de la machinerie.

- **Contribution personnelle:** J'ai participé activement à l'écriture de l'article et j'ai réalisé la totalité des figures.

Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding

Aurelien Dordor¹, Emilie Poudevigne¹, Heinrich Göttlinger²
& Winfried Weissenhorn¹

¹Unit of Virus-Host Cell Interactions UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function & Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

*Author for correspondence. Tel.: +33 476 207 281 • Fax: +33 476 209 400 • weissenhorn@embl.fr

HIV-1 employs its structural proteins to orchestrate assembly and budding at the plasma membrane of host cells. The Gag polyprotein is sufficient to form virus-like particles in the absence of other viral proteins and provides a platform to interact with numerous cellular factors that regulate Gag trafficking to the site of assembly and budding. Notably endosomal sorting complexes required for transport have attracted much attention over the last decade because of their essential role in virion release. Here we review recent advances in understanding the role of host cell factors recruited by Gag during HIV-1 assembly and budding.

The role of viral structural proteins in HIV-1 assembly

HIV-1 assembly and budding take place at the plasma membrane [1-3] and require the interplay of viral structural proteins [4] and cellular factors to successfully release new infectious virions [5-9]. Although budding is mostly driven by the polyprotein Gag (FIGURE 1), which is sufficient to produce virus-like particles (VLPs) [10], the production of infectious virions additionally requires Env, genomic RNA and Gag-Pol, which encodes protease, reverse transcriptase and integrase [11]. The Gag polyprotein or Gag-RNA aggregates/polymers initiate assembly at the plasma membrane mediated by membrane interaction of the matrix (MA) domain. Both myristylation of the N-terminal glycine of MA and MA's basic surface patch are required for Gag plasma membrane targeting [12-14]. Membrane targeting specificity is determined by MA recognition of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) [15], which contributes together with Gag multimerization [16,17] to the exposure and plasma membrane insertion of the MA myristate group [18,19].

In the immature virion, Gag forms an extended structure [20]. MA is followed by the second structural moiety encoded by Gag, the capsid domain (CA). CA is composed of N-terminal domain and C-terminal domain (FIGURE 1). CA-C-terminal domain mediates multiple weak and cooperative Gag-Gag interactions, which are further supported by the adjacent SP1 [4,21,22]. CA is majorly responsible for the continuous, but incomplete hexameric Gag lattice [21,23,24]. Although MA and the third structural domain of Gag, the nucleoprotein (NC) do not follow hexagonal symmetry, MA can form hexamers on membranes [25].

The capsid domain CA is followed by NC (FIGURE 1) whose main function is the incorporation of two RNA genomes [26] a process that contributes to Gag polymerization [27]. However, only a small number of Gag molecules recruit viral genomes to the plasma membrane [2]. Gag polymers in complex with genomic RNA are already present in the cytosol and are as such targeted to membranes [28]. Finally the last domain of Gag, p6 connected via SP2 to NC, functions as a hub for cellular factors required for budding (FIGURE 1) [5].

The Gag lattice assembled at budding sites is indistinguishable from that of immature virions [29]. The transition from the Gag lattice of immature virions [21] to mature virions [30] is mediated by the protease that cleaves Gag during assembly; PR activity produces MA, CA, SP1, NC, SP2 and p6 proteins. MA stays associated with the inner viral membrane upon PR cleavage while CA forms a cone-shaped core around the condensed ribonucleoprotein composed of NC and the viral RNA genomes [4,31,32]. Importantly, PR cleavage of Gag is essential to produce infectious virions [33,34].

Host cell factors involved in Gag trafficking

How is Gag directed to the site of assembly? Although we still lack a comprehensive picture, multiple factors have been identified to affect assembly and budding by influencing Gag trafficking (TABLE 1) [35]. Gag assembly depends on the pathway of REV-mediated Gag mRNA export from the nucleus to direct Gag to productive assembly sites [36,37]. The suppressor of cytokine signaling-1 is an inducible host factor

Keywords

• budding • CHMP2 • CHMP3
• CHMP4 • CHMP6 • ESCRT-I
• ESCRT-III • Gag • HIV-1
• L domain • membrane
fission • VPS4

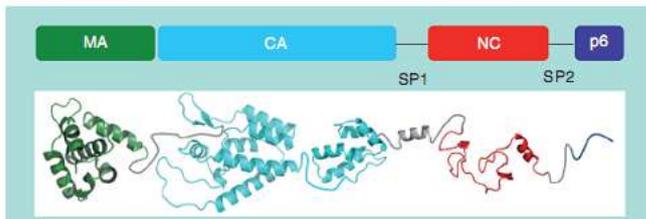


Figure 1. Schematic and structural model of the polyprotein Gag. The Gag polyprotein is composed of four major domains: MA (PDB 1HIW), which is involved in Gag trafficking and membrane binding; CA (PDB 1AK4 & 1A80), involved in oligomerization and capsid formation; SP1; NC (PDB 1A1T), implicated in Gag oligomerization and RNA binding; SP2; and p6 containing the L domain motifs. CA: Capsid; MA: Matrix; NC: Nucleocapsid; SP: Spacer peptide.

that regulates Gag trafficking via interaction with MA and NC; its absence induces perinuclear Gag aggregation and degradation [38]. Plasma membrane trafficking defects are also observed in the absence or during overexpression of Golgi-localized, γ -ear containing, ADP ribosylation factor-binding proteins by disrupting the function of endogenous ADP ribosylation factors [39,40]. Clathrin adaptor complexes AP-1, -2 and -3 play an additional role in Gag trafficking [41–43] consistent with clathrin incorporation into virions, which is important for optimal replication [44,45]. Gag transport seems to further depend on intact cellular trafficking, including the SNARE machinery [46], endosomal trafficking [47], and filamin A [48]. Furthermore, actin interacts with NC, and actin filaments are transiently assembled during budding [49].

Additionally, HIV-1 Gag trafficking might display some cell-type specificity. Although HIV-1 buds from the plasma membrane in most target cells, budding in macrophages was suggested to occur in endosomal or nonclassical endosomal compartments [50–53]. This observation is supported by the Annexin 2–Gag interaction at the limiting membrane of late endosomes or multivesicular bodies [54,55]. However, the role of endosomes in budding might have to be reconsidered because budding in macrophages was also observed at the plasma membrane [1,56], from an internally sequestered plasma membrane [57] and from tubular membranous compartments that are continuous with plasma membrane [58,59].

Together these data suggest that trafficking of Gag to the site of assembly at the plasma membrane must be orchestrated to ensure the necessary Gag concentration required to form the Gag protein lattice and initiate virion production. Although only the viral structural proteins assemble into the virion as described earlier, the

virus requires important assistance from the cell to bud off. This help is recruited from specific domains whose function is described below.

Late domains recruit endosomal sorting complexes required for transport

HIV-1 budding depends on the N-terminal region of p6 [60], because mutations within a conserved p6 sequence motif inhibit budding at a late stage [60,61]. Since then, three different so called late domains (L domains) have been identified and shown to be functionally interchangeable [62–64]. The two L domains relevant for HIV-1 have the sequence motifs P(T/S)AP and LYPx_nL [59,65,66], while the third L domain PPxY is important for release of other enveloped viruses [67,68].

A huge body of work has shown that L domains engage the vacuolar protein sorting (VPS) machinery, composed of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-0, -I, -II, -III and the VPS4 complex, that catalyzes plasma membrane receptor downregulation at endosomal membranes [69,70] as well as distinct steps during cell division [6,71–74]. L domains are employed to recruit ESCRTs; the PTAP motif binds to Tsg101 a member of ESCRT-I [75–77] and LYPx_nL recruits Alix which might link ESCRT-I and ESCRT-III [78–81]. The third class, PPxY, interacts with WW domains present in HECT domain-containing E3 ubiquitin ligases, such as Nedd4 [82–84].

The PTAP Tsg101 binding motif is essential for HIV-1 replication [75] while siRNA knock-downs of Alix or deletion of the Alix-specific L domain have more modest effects on virion production and HIV-1 replication [80,85,86]. An important question thus concerns the roles of the different cellular factors recruited during assembly and budding. We will describe in the following two sections cellular interactions that can be considered to be supportive but nonessential and those which are absolutely essential for budding.

Factors supporting HIV-1 budding

A number of cellular factors linked to the ESCRT system have been shown to play roles in HIV-1 budding, although they seem to be nonessential in various cell culture systems employed to study HIV-1 budding. Among these factors Alix is the most studied but its exact role in HIV-1 budding is still unclear.

Alix is composed of three domains, an N-terminal Bro1 domain that interacts with the C-terminal region of all ESCRT-III CHMP4

isoforms [87]; Bro1 connects to a V-shaped domain that harbors the late domain binding site [85,88,89], which is followed by a proline-rich region that serves as a hub for multiple cellular factors [8,90]. The PRD seems to keep Alix in an autoinhibitory state [91,92], while deletion of the PRD induces Alix dimerization [85,93].

Alix clearly has a supportive role in HIV-1 budding [78,79,85] and overexpression of isolated Alix domains inhibit HIV-1 release [94]. Notably, cells overexpressing Alix can compensate for the loss of the Tsg101-specific L domain, which depends on the CHMP4 binding site present in the Bro1 domain [85,95]. Furthermore, the role of Alix seems to be cell-type specific, because the requirement of Alix-support for HIV-1 replication varies substantially between different target cells of HIV-1 [86]. Finally, Alix function during HIV-1 budding depends on its propensity to dimerize and/or multimerize [93,96].

Alix Bro1 also interacts with the zinc fingers of NC and elimination of the interaction interface inhibits HIV-1 budding. Notably HIV-1 zinc

finger mutants were defective for particle production and exhibited a similar defect in Gag processing as a PTAP deletion mutant [97–99]. Markedly, the NC-P1 region of Gag plays an important role in the ESCRT-pathway dependency of HIV-1 budding [100]. However, because siRNA depletion of Alix has only a moderate effect on HIV-1 budding [80], other Bro1-containing factors might be able to compensate for the function of the Alix Bro1–NC interaction [101].

Recent work has also shed more light on the role of ubiquitin in HIV-1 budding. Virions contain free ubiquitin and small amounts of Gag are ubiquitylated [102], whereas ubiquitylation is dependent on Gag–membrane interaction [103]. HECT domain-containing ubiquitin ligases, which might ubiquitylate Gag have been linked to HIV-1 budding, even though HIV-1 does not contain the PPxY L domain employed by other viruses to recruit such ligases. Notably overexpression of Nedd4–2, a splice variant of Nedd4–2 (Nedd4L) with a naturally truncated C2 domain, potently rescues Tsg101-related

Table 1. List of cellular factors that interact with Gag and affect assembly and virion budding.

Gag	Host protein	Function	Ref.
MA	Adaptor protein complex AP-1 (μ subunit)	Interaction with MA as well as Tsg101 and Nedd4–1; positive regulator of budding	[43]
MA	Adaptor protein complex AP-2 (μ 2 subunit)	AP-2 interaction with matrix–capsid junction in the Gag polyprotein (Tyr 132 and val135); regulation of HIV assembly	[42]
MA	Adaptor protein complex AP-3 (δ subunit)	Gag trafficking to MVB; role in particle assembly	[41]
MA	SOCS-1	Positive regulator of Gag stability and trafficking	[38]
MA	Calmodulin	Myristoylate group exposure	[147]
CA	CypA	Accelerates protein folding by catalyzing the <i>cis</i> – <i>trans</i> isomerization of proline imidic peptide bonds. Present inside virions, unknown role, may act in capsid restriction	[148]
CA	Filamin A	Positive regulator of assembly	[48]
NC	Alix (Bro domain)	Bro domain alone stimulates virus release; NC cooperates with PTAP L domain in the recruitment of cellular proteins necessary for its L domain activity	[101] [98]
NC	ABCE1	Role in capsid assembly	[149]
NC	F-actin	Assembly and budding are actin driven	[49]
NC	SOCS-1	Positive regulator of Gag stability and trafficking	[38]
P6	Alix (V domain)	Interaction with L domain LYPx(n)L; positive regulator of budding; supportive role of PTAP L domain function	[78–80]
P6	Tsg101 ESCRT-I complex	Interaction with L domain PTAP; essential for HIV-1 budding; recruitment of ESCRTs	[75]
Gag	ADP-ribosylation factor-binding protein (GGA) and ARF	Gag trafficking; positive regulation of assembly and budding	[39]
Gag	Annexin 2	Macrophage-specific assembly factor	[54]
Gag	Dlg-1	Negative regulator of assembly	[150]
Gag	Nedd4	Positive regulator of budding; ESCRT-I independent	[107]
?	Vps18 and Mon2	Gag trafficking	[47]

ABCE1: ATP-binding cassette sub-family E member 1; Alix: ALG-2 interacting protein X; ARF: ADP ribosylation factor; Anx2: Annexin 2; CA: Capsid; CypA: Cyclophilin A; Dlg-1: Human Discs large; ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport; MA: Matrix; NC: Nucleocapsid; Nedd4: Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4; SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1; Tsg101: Tumor susceptibility gene 101.

budding defects [104,105]. However, direct Gag ubiquitylation is not always necessary, suggesting that the catalytic activity of Hect domain-containing ubiquitin ligases is employed to ubiquitylate factors acting in *trans* to drive budding [106]. Interestingly, the truncated C2 domain of Nedd4-2 is sufficient to transfer the ability to stimulate HIV-1 budding to other Nedd4 family members [107]. Although the exact role of these ligases at the budding site is yet unclear, they provide a link to the ESCRT pathway [69,108].

The potential role of ubiquitin in budding was indirectly linked to the ubiquitin hydrolase, AMSH that is part of the ESCRT pathway and removes ubiquitin from cargo [109]. AMSH was shown to interact with ESCRT-III proteins including CHMP3 [110,111] and overexpression of catalytically inactive GFP-AMSH converts wild-type CHMP3 into a potent inhibitor of HIV-1 release [111]. By contrast, overexpression of C-terminal-tagged versions of catalytically inactive AMSH and CHMP3 induced only a mild inhibitory effect on budding, indicating that the previously observed budding defect might be caused by unusual deregulation of N-terminally tagged GFP-AMSH [112].

Even though the exact roles of ubiquitin hydrolases have yet to be established, it is interesting to note that ubiquitylation during budding might provide additional support to recruit ESCRTs in cell types with limited expression of Tsg101 [104]. Albeit not shown for HIV-1, Gag-ubiquitin fusions of equine infectious anemia virus Gag eliminate the role of the L domain for VLP release [113], providing further evidence that ubiquitin supports access to the ESCRT machinery.

As well as positive budding signals, Gag contains a negative budding signal within the SP2 domain whose function was linked to the ESCRT machinery [114]. Furthermore, budding might be directly linked to immune defense. Pattern recognition receptors recruit TANK-binding kinase (TBK)-1 that is part of a scaffold that activates the expression of IFN- β as a first line of immune defense during infection. Notably, overexpression of TBK1 attenuates PTAP-dependent HIV-1 budding via the interaction with the ESCRT-I component Vps37C [115].

In summary, the supportive factors might be nonessential in cell culture systems but must play an important role during infection. The Alix binding site in Gag p6 for example could have been easily deleted from viral genomes a long time ago if Alix recruitment did not provide

important advantages for the virus life cycle. Thus, the support provided by Hect domains, ubiquitin, Alix and other factors influencing HIV-1 budding most likely provide essential advantages to spread infection.

Central role of ESCRT-III in HIV-1 budding

HIV-1 recruits only a subset of the ESCRT complexes to the budding site, including ESCRT-I, selected ESCRT-III members and the VPS4 complex, while ESCRT-0 and -II are dispensable for budding [116]. As ESCRT-II provides the link between ESCRT-I and -III in yeast via ESCRT-II Vps25 interaction with Vps20 (CHMP6) [117], an open question is how ESCRT-I might be linked to ESCRT-III during HIV-1 budding. Although Alix could provide that link through its interaction with Tsg101 and CHMP4 [78-80], Alix depletion has no substantial effect on HIV-1 budding [80], indicating that another factor must provide the link. One possibility is that VPS28, a component of heterotetrameric ESCRT-I [118] interacts directly with CHMP6 [119], however CHMP6 is also not essential for HIV-1 budding [116].

In addition there might be an indirect role for ESCRT-II; sprouty (Spry2) binds to the ESCRT-II subunit, Eap20, leading to the disruption of the ESCRT-I-II interaction, thus liberating ESCRT-I to serve HIV-1 budding [120]. Intriguingly, Spry is known to bind SIV-1 CA and contributes to TRIM5 α -induced capsid restriction [4].

A huge body of evidence indicates that the different routes to access ESCRTs via Tsg101, Alix or the ubiquitin ligases aim to provide access to ESCRT-III and the VPS4 machinery. The first compelling evidence came from data showing that dominant negative forms of ESCRT-III members and of catalytically inactive VPS4 are potent inhibitors of HIV-1 budding [78-80]. VPS4 is an AAA-type ATPase that exists as an inactive dimeric form in the cytoplasm and as active dodecameric form [121]; thus overexpression of the catalytically inactive form leads to the assembly of mixed dodecamers that become inactive and therefore unable to fulfill their function to disassemble ESCRT-III from membranes [121-123]. Mammalian cells express 12 ESCRT-III-like proteins. While CHMP3, CHMP6, CHMP4A, B and C and CHMP2A, B isoforms might form a core ESCRT-III complex as suggested for the yeast homologs [124], the other members including CHMP1A, B, CHMP5, CHMP7 and IST1 seem to exert regulatory roles [70,125].

ESCRT-III members shuttle between an inactive autoinhibited state present in the cytosol and an activated state that polymerizes on membranes. Release of autoinhibition entails the displacement of the C-terminal region from the N-terminal helical core of CHMP proteins [111,126–130]. The C-terminal regions of most CHMP proteins contain MIT domain interacting motifs (MIMs) that are employed to recruit VPS4 [131–133]. It is likely that this MIM–MIT interaction with membrane-associated CHMP polymers is required to induce further activation of VPS4, such as dodecamer assembly, which ultimately leads to ESCRT-III recycling [121].

The first direct evidence that CHMP protein polymerization on membranes can deform membranes came from overexpression experiments of CHMP4 and catalytically inactive VPS4, which revealed circular CHMP4 polymers associated with plasma membrane and capable of inducing tubes protruding from the plasma membrane [134]. *In vitro* experiments also showed polymerization propensities of CHMP proteins. CHMP4 forms loose circular arrays of linear polymers that are most likely formed by head-to-tail interactions of CHMP4 [93,135]. By contrast, CHMP2A and CHMP3 assemble into defined helical tubular structures that are straight, cone-shaped and often closed at one end [129–136]. These tubes expose their membrane-targeting surface on the outside and the VPS4 interaction sites on the inside, permitting VPS4-driven tube disassembly *in vitro* [136].

The structural features of the CHMP2–3 helical tubes suggest that they could assemble within the membrane neck of budding structures such as virions, vesicles or the cytokinetic midbody [136]. However, the mean tube diameter of CHMP2A–3 tubes is approximately 50 nm, which keeps the membranes too far apart in order to undergo fission. Nonetheless some of the tubes generated *in vitro* revealed closed ends characterized by a successive narrowing of the helical diameter which resembles ‘dome-like’ structures. Such structures might be able to attract membrane and act as a scaffold for membrane bending. This could then lead to thinning of the membrane neck and spontaneous fast fission [137]. This model leaves the possibility open that VPS4 might play an active role in fission by releasing the elastic stress imposed by the CHMP protein scaffold on the membrane [137]. Besides this model, other possibilities are discussed in the literature, such as stepwise removal of CHMP proteins from membrane-bound polymers that induce constriction and eventually fission [70,138].

The first direct evidence of CHMP proteins catalyzing membrane fission came from *in vitro* experiments with giant unilamellar vesicles (GUVs). It was shown that the presence of the four core yeast CHMP proteins (Vps20, Snf7, Vps24 and Vps2) leads to vesicle budding into the lumen of GUVs [139]. The requirement for CHMPs was further narrowed down to the fission process itself, because a follow-up study suggested that CHMP4 (Snf7) is sufficient to induce fission and thus the release of vesicles into the GUV lumen. Furthermore, Vps4 did not play an active role in this set-up [140].

In summary, a huge body of work demonstrates that ESCRT-III is part of the membrane fission machinery that is recruited during HIV-1 release. Although there are several potential and promising models, it still needs to be determined experimentally how this complex achieves its task. Furthermore, as described in the next paragraph, the minimal requirements for membrane fission concerning the ESCRT-III composition and role of VPS4 *in vitro* and *in vivo* seem to differ and these issues need to be resolved in future experiments.

Dynamic assembly & minimal requirement of ESCRT-III & VPS4 at budding sites

Live cell imaging of budding sites revealed that Gag recruitment into VLPs was completed in 9.6 min on average [141], independent of the presence or absence of L domains [142], indicating that ESCRTs are not required for Gag recruitment and assembly. Together with Gag, Alix progressively accumulated and remained at the site throughout the budding process [142]. Termination of Gag recruitment was then followed by a short (~1–3 min) appearance of GFP-tagged ESCRT proteins CHMP4B, CHMP4C, CHMP1B and VPS4B (tested so far), indicating that the fission machinery assembles late and only transiently at the budding site [142].

Late-domain-dependent recruitment of VPS4A to nascent HIV-1 particles at the host cell plasma membrane was further confirmed and analyzed in more detail by live-cell imaging. Accordingly, VPS4 is recruited transiently to the budding site and assembles into 2–5 dodecamers. The short (~35 s) appearance of VPS4 just before particle release provides the strongest evidence so far for a direct role of VPS4 in membrane fission leading to HIV-1 release [143].

An elegant study by the Sundquist laboratory analyzed the requirement of all ESCRT-III members for HIV-1 budding systematically. Interestingly, they found that virus release was largely inhibited by co-depletion of either CHMP2 or CHMP4 family members. By contrast, depletion of CHMP3 and CHMP1 proteins resulted in only modest titer reductions (two- to eight-fold) and no effect could be observed by depleting cells of other ESCRT-III members [144]. Moreover, the function of CHMP4 and CHMP2 in release depends on their interaction, which was determined biochemically. Furthermore, electron microscopy images of budding sites of CHMP2-depleted cells reveal ring-like electron-dense structures within the membrane neck of some virions that

fail to pinch off. This suggests that these ring-like structures might be composed of CHMP4 polymers that accumulate in the absence of CHMP2 [144]. Notably these images are also the first images that visualize ESCRT-III within the neck of a budding virion.

Together these data demonstrate that CHMP4 recruitment is not sufficient to catalyze membrane fission in the absence of CHMP2. However, CHMP4 polymers are important and likely provide a platform for CHMP2 assembly, which in turn might recruit VPS4 to complete membrane fission. Thus, only a selected subset of ESCRT-III is required for HIV-1 release and VPS4 seems to play an active role in membrane fission and not only disassemble and recycle ESCRT-III components from membranes.

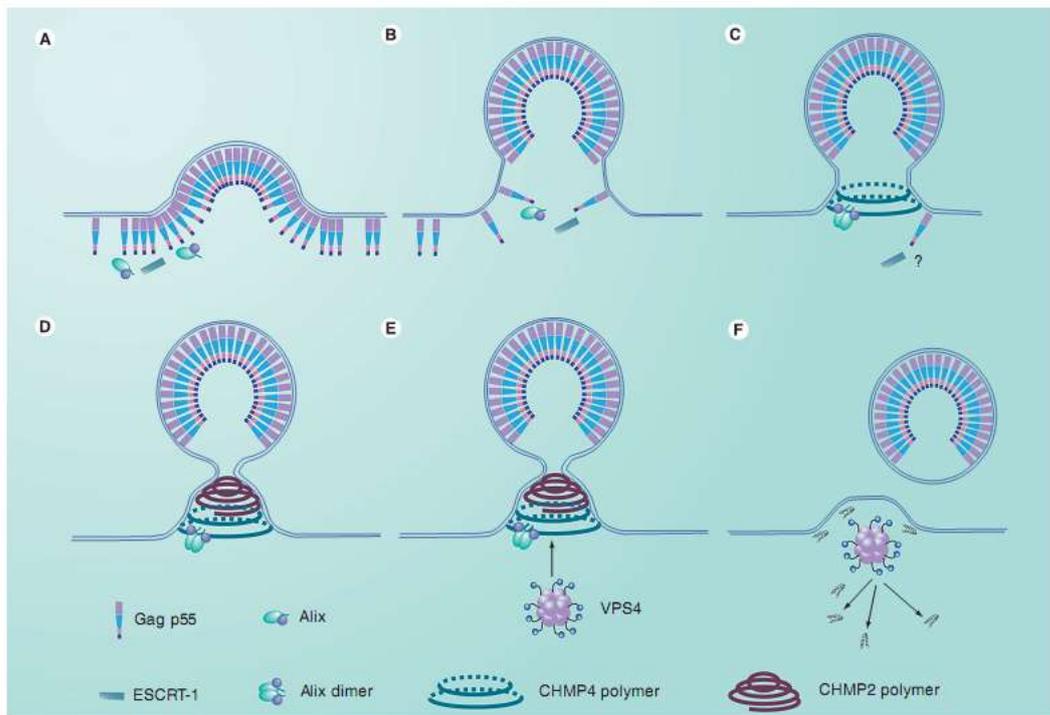


Figure 2. Model for ESCRT-driven HIV-1 release. (A) ESCRT-1 and Alix accumulate at the plasma membrane concomitantly with Gag. (B) Alix and probably ESCRT-1 stay until Gag recruitment and virus-like particle assembly are completed. (C) CHMP4 is recruited to form a polymer within the neck of the budding virus, which might induce constriction of the neck. CHMP4 recruitment might be mediated by Alix and Alix might be activated to dimerize and coordinate two CHMP4 filaments. (D) Once CHMP4 assembly is completed, it serves as a platform to assemble CHMP2 or CHMP2A-3 tubular structures that close at one end to form dome-like structures and induce further constriction leading to membrane neck thinning. However, the elastic stress imposed on the membrane might not yet be sufficient to induce fission. (E) Subsequent recruitment of VPS4 that forms dodecamers with the capacity to bind 12 CHMPs utilizes ATP hydrolysis to make the final cut by relieving the elastic membrane stress that leads to spontaneous fission (F) and concomitant release of CHMP monomers from the budding site. ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport.

Future perspective & model for ESCRT-catalyzed membrane fission

The current data demonstrate that Gag assembly at the plasma membrane coincides with the appearance of Alix at the budding site [142]. ESCRT-I (Tsg101) might be recruited at the same time. Depending on the cell type and expression levels of Tsg101, multiple modes of entering the ESCRT machinery might be required to increase budding efficiency. We don't know whether ESCRT-I or Alix serve solely as platforms for protein–protein interactions or whether they play an active role at early stages of budding [145].

Once Gag assembly is completed, ESCRT-III is recruited [142]. Although Alix could bridge ESCRT-I and -III function, the question remains why Alix is present early in assembly and recruits ESCRT-III. CHMP4 only after Gag assembly is completed. In addition, Alix is not absolutely required for HIV-1 budding; thus either ESCRT-I VPS28 interacting with CHMP6 could provide this link [119] or a yet unknown factor is needed to link ESCRT-I with ESCRT-III.

Based on the current data we suggest the following model for assembly and budding. Gag assembly at the plasma membrane coincides with ESCRT-I and Alix recruitment (FIGURE 2A & 2B). This somehow leads to ESCRT-III CHMP4 recruitment, which might require or lead to Alix dimerization as well as CHMP4 polymerization into filamentous structures that associate within the membrane neck of the budding virion (FIGURE 2C). Dimeric Alix might coordinate two turns of the helical CHMP4 polymer [93] and might thus substitute for ESCRT-II-mediated coordination of two Snf7/CHMP4 filaments [146]. Interestingly, CHMP4 filaments accumulate within the membrane neck in CHMP2-depleted cells [144]. This leads to nearly closed Gag lattices [144]; by contrast, Gag is arranged as a continuous but incomplete lattice in the released virion, indicating that proper assembly of ESCRT-III prevents Gag lattice closure [145]. What is the function of CHMP4 polymer assembly if it does not induce membrane fission [144]? One possibility is that it narrows the initially wide open neck connecting the plasma membrane and the virion membrane (FIGURE 2B & 2C). Subsequently, CHMP4 polymers serve as platform to recruit CHMP2 (FIGURE 2D) [144]. CHMP2A or B alone or CHMP2A together with CHMP3 might then assemble into dome-like structures that can bend the membrane sufficiently to induce

membrane neck thinning that is required for spontaneous fission (FIGURE 2D & 2E) [137]. One caveat is that such dome-like structures have only been observed for CHMP2A-3 polymers [129,136] and CHMP3 plays at most a minor role in release [144]. It thus remains to be determined whether CHMP2 isoforms can assemble into similar dome structures on their own. In favor of the dome model is the fact that CHMP2A can form ring-like structures, which have the smallest diameters (~12 nm) of any CHMP polymer analyzed so far *in vitro* [136]. Likewise *in vivo* imaging of CHMP2 polymers at the midbody revealed a CHMP2 polymer diameter of approximately 17 nm [73]; these data thus corroborate that CHMP2 has a key role in fission.

Finally, another open question is how the energy for fission is provided. Some of it might derive from ESCRT-III monomer to polymer transition on the membrane where the synergistic effect of polymer formation and membrane bending might come into play and keep the membrane in a stressed state. Although in theory accumulation of such elastic stress might suffice to induce fission, the execution of fission seems to require ATP hydrolysis by VPS4 [143]. The VPS4 dodecamer might be able to interact with 12 CHMP proteins simultaneously; its catalytic activity could thus exert mechanical force on the membrane-bound CHMP lattice in a synchronized fashion and induce abrupt relieve of the elastic stress, which could lead to spontaneous fission (FIGURE 2E). Concomitantly, this will lead to depolymerization of the CHMP lattice and recycling of ESCRT-III (FIGURE 2F).

Overall, the last decade brought about great progress in the understanding of HIV-1 budding and release. However, further work is required to decipher the exact role of many Gag interaction partners, to determine the function of early ESCRT budding factors, and to validate the fine mechanics of ESCRT-driven membrane fission.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

The role of structural proteins in HIV-1 assembly

- Budding is driven by the polyprotein Gag, which forms virus-like particles when expressed on its own.
- The production of infectious virions requires Env, genomic RNA and Gag–Pol, coding for the protease, the reverse transcriptase and the integrase.

Host cell factors involved in Gag trafficking

- Gag trafficking to the plasma membrane, the main site of virus assembly, is ensured by multiple cellular factors that regulate Gag mRNA transport and protein trafficking.

Factors supporting HIV-1 budding

- Gag recruits host cell factors that classify as not absolutely essential for HIV-1 budding such as Alix and ubiquitin.
- Engagement of these factors might play cell-type specific roles and provide additional support to enter the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway; this might be especially important in cells expressing low levels of Tsg101 and help to divert more ESCRTs to the site of HIV-1 budding.

Central role of ESCRT-III in HIV-1 budding

- Access to ESCRT-III and the VPS4 machinery is essential for HIV-1 budding. Interference with ESCRT-III and VPS4 leads to fully assembled viral particles that fail to pinch off from the plasma membrane.
- ESCRT-III assembles into polymers that can deform membranes and is part of the minimal membrane fission machinery.

Dynamic assembly & minimal requirement of ESCRT-III and VPS4 at budding sites

- ESCRT-III and VPS4 appear only after Gag assembly is completed at the budding site.
- By contrast, Alix is present throughout the Gag assembly process.
- CHMP4 assembles first and provides a platform to recruit CHMP2 and VPS4.
- ESCRT-III CHMP4 and CHMP2 family members are required at the budding site to release virions.
- VPS4 plays an active role in the ESCRT-III-driven release process, potentially by providing energy for membrane fission.

Future perspective & model for ESCRT-catalyzed membrane fission

- What are the structural principles of ESCRT-III assemblies at the budding site?
- Data on ESCRT-III polymerization suggest a model, which entails initial membrane neck constriction by a polymer assembled by one of the three CHMP4 isoforms and subsequent recruitment of one CHMP2 family member, which catalyze membrane fission with the help of VPS4.
- Novel structural and functional approaches will be required to validate the model.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
1. Jouvencet N, Neil SJ, Bess C *et al.* Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4(12), e435 (2006).
 2. Jouvencet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(45), 19114–19119 (2009).
 3. Finzi A, Orthwein A, Mercier J *et al.* Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J. Virol.* 81(14), 7476–7490 (2007).
 4. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WL. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18(2), 203–217 (2008).
 5. Marita E, Sundquist WL. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20(1), 395–425 (2004).
 6. Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316(5833), 1908–1912 (2007).
 7. Welsch S, Müller, B, Krausslich HG. More than one door – budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* 581(11), 2089–2097 (2007).
 8. Fujii K, Hurley JH, Freed EO. Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(12), 912–916 (2007).
 9. Bieniasz PD. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* 5(6), 550–558 (2009).
 10. Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F *et al.* Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59(1), 103–112 (1989).
 11. Martin-Serrano J, Neil SJ. Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(7), 519–531 (2011).
 12. Gottlinger H, Sodroski J, Haseltine W. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 5781–5785 (1989).
 13. Zhou W, Parent L, Wills J *et al.* Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* 68, 2556–2569 (1994).
 14. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP *et al.* Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *PNAS* 93(7), 3099–3104 (1996).
 15. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ *et al.* Phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(41), 14889–14894 (2004).
 16. Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Martin-Serrano J *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions. *J. Virol.* 78(17), 9560–9563 (2004).
 17. Li H, Dou J, Ding L *et al.* Myristoylation is required for human immunodeficiency virus type 1 Gag–Gag multimerization in mammalian cells. *J. Virol.* 81(23), 12899–12910 (2007).

18. Saad JS, Miller J, Tai J *et al.* Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(30), 11364–11369 (2006).
19. Saad JS, Ablan SD, Ghanam RH *et al.* Structure of the myristylated human immunodeficiency virus type 2 matrix protein and the role of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in membrane targeting. *J Mol Biol* 382(2), 434–447 (2008).
20. Wilk T, Gross I, Gowen BE *et al.* Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75(2), 759–771 (2001).
21. Briggs JA, Riches JD, Glass B *et al.* Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(27), 11090–11095 (2009).
22. Briggs JA, Krausslich HG. The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* 410(4), 491–500 (2011).
23. Briggs JA, Simon MN, Gross I *et al.* The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11(7), 672–675 (2004).
24. Wright ER, Schooler JB, Ding HJ *et al.* Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J* 26(8), 2218–2226 (2007).
25. Alfadhli A, Barklis RL, Barklis E. HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *Virology* 387(2), 466–472 (2009).
26. Lu K, Heng X, Summers MF. Structural determinants and mechanism of HIV-1 Genome Packaging. *J Mol Biol* 410(4), 609–633 (2011).
27. Muriaux, D, Darlix JL. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* 7(6), 744–753 (2010).
28. Kutluay SB, Bieniasz PD. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog* 6(11), e1001200 (2010).
29. Carlson LA, de Marco A, Oberwinkler H *et al.* Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog* 6(11), e1001173 (2010).
30. Briggs JA, Wilk T, Welker R *et al.* Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* 22(7), 1707–1715 (2003).
31. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M. Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131(1), 70–79 (2007).
32. de Marco A, Muller B, Glass B *et al.* Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS Pathog* 6(11), e1001215 (2010).
33. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA *et al.* Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(13), 4686–4690 (1988).
34. Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(15), 5781–5785 (1989).
35. Ono A. HIV-1 Assembly at the plasma membrane: Gag trafficking and localization. *Future Virol* 4(3), 241–257 (2009).
36. Jin J, Sturgeon T, Chen C *et al.* Distinct intracellular trafficking of equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus type 1 Gag during viral assembly and budding revealed by bimolecular fluorescence complementation assays. *J Virol* 81 (20), 11226–11235 (2007).
37. Jin J, Sturgeon T, Weisz OA *et al.* HIV-1 matrix dependent membrane targeting is regulated by Gag mRNA trafficking. *PLoS ONE* 4(8), e6551 (2009).
38. Ryo A, Tsurutani N, Ohba K *et al.* SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(1), 294–299 (2008).
39. Joshi A, Garg H, Nagashima K *et al.* GGA and Arf proteins modulate retrovirus assembly and release. *Mol Cell* 30(2), 227–238 (2008).
40. Joshi A, Nagashima K, Freed EO. Defects in cellular sorting and retroviral assembly induced by GGA overexpression. *BMC Cell Biol* 10, 72 (2009).
41. Dong X, Li H, Derdowski A *et al.* AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* 120(5), 663–674 (2005).
42. Batonick M, Favre M, Boge M *et al.* Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2. *Virology* 342(2), 190–200 (2005).
43. Camus G, Segura-Morales C, Molle D *et al.* The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. *Mol Biol Cell* 18(8), 3193–3203 (2007).
44. Zhang F, Zang T, Wilson SJ *et al.* Clathrin Facilitates the morphogenesis of retrovirus particles. *PLoS Pathog* 7(6), e1002119 (2011).
45. Popov S, Strack B, Sanchez-Merino V *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses engage clathrin through Gag-Pol or Gag. *J Virol* 85(8), 3792–3801 (2011).
46. Joshi A, Garg H, Ablan SD *et al.* Evidence of a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) machinery in HIV-1 assembly and release. *J Biol Chem* 286(34), 29861–29871 (2011).
47. Tomita Y, Noda T, Fujii K *et al.* The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J Virol* 85(11), 5618–5627 (2011).
48. Cooper J, Liu L, Woodruff EA *et al.* Filamin A interacts with human immunodeficiency virus type 1 Gag and contributes to productive particle assembly. *J Biol Chem* 286(32), 28498–28510 (2011).
49. Gladnikoff M, Shimoni E, Gov NS *et al.* Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys J* 97(9), 2419–2428 (2009).
50. Raposo GA, Moore M, Innes D *et al.* Human Macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3(10), 718–729 (2002).
51. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162(3), 443–455 (2003).
52. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S *et al.* HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2(2), 85–95 (2007).
53. Benaroch P, Billard E, Gaudin R *et al.* HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29 (2010).
54. Ryzhova EV, Vos RM, Albright AV *et al.* Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocytoid-derived macrophages. *J Virol* 80(6), 2694–2704 (2006).
55. Harrist AV, Ryzhova EV, Harvey T *et al.* Anx2 interacts with HIV-1 Gag at phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate-containing lipid rafts and increases viral production in 293T cells. *PLoS ONE* 4(3), e5020 (2009).
56. Welsch S, Keppler OT, Habermann A *et al.* HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 3(3), e36 (2007).
57. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R *et al.* In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* 177(2), 329–341 (2007).
58. Bennett AE, Narayan K, Shi D *et al.* Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog* 5(9), e1000591 (2009).

59. Welsch S, Groot F, Krausslich H-G *et al.* Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages. *J. Virol.* 85(15), 7922–7927 (2011).
60. Gottlinger H, Dorfman T, Sodroski J *et al.* Effect of mutations affecting the p6 Gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 3195–3199 (1991).
61. Huang M, Orenstein J, Martin M *et al.* p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 69, 6810–6818 (1995).
62. Parent L, Bennett R, Craven R *et al.* Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* 69, 5455–5460 (1995).
63. Strack B, Calistri A, Gottlinger HG. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J. Virol.* 76(11), 5472–5479 (2002).
64. Martin-Serrano J, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J. Virol.* 78(11), 5554–5563 (2004).
65. Demirov DG, Freed EO. Retrovirus budding. *Virus Res.* 106(2), 87–102 (2004).
66. Usami Y, Popov S, Popova E *et al.* The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37(Pt 1), 181–184 (2009).
67. Bieniasz PD. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344(1), 55–63 (2006).
68. Hartlieb B, Weissenhorn W. Filovirus assembly and budding. *Virology* 344(1), 64–70 (2006).
69. Saksena S, Sun J, Chu T *et al.* ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 32(12), 561–573 (2007).
70. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(8), 556–566 (2010).
71. Morita E, Sandrin V, Chung HY *et al.* Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26(19), 4215–4227 (2007).
72. Morita E, Colf LA, Karren MA *et al.* Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 12889–12894 (2010).
73. Guizetti J, Schermelleh L, Mantler J *et al.* Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331(6024), 1616–1620 (2011).
74. Elia N, Sougrat R, Spurlin TA *et al.* Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(12), 4846–4851 (2011).
75. Garrus J, von Schwedler U, Pornillos O *et al.* Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55–65 (2001).
76. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz P. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313–1319 (2001).
77. VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa T *et al.* Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating(E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 7724–7729 (2001).
78. Strack B, Calistri A, Popova E *et al.* AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689–699 (2003).
79. von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B *et al.* The protein network of HIV budding. *Cell* 114(6), 701–713 (2003).
80. Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D *et al.* Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(21), 12414–12419 (2003).
81. Vincent O, Rainbow L, Tilburn J *et al.* YPXLI is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell Biol.* 23(5), 1647–1655 (2003).
82. Strack B, Calistri A, Accola M *et al.* A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 13063–13068 (2000).
83. Yasuda J, Hunter E, Nakao M *et al.* Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Rep.* 3(7), 636–640 (2002).
84. Bouamr F, Melillo JA, Wang MQ *et al.* PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J. Virol.* 77(22), 11882–11895 (2003).
85. Fisher RD, Chung HY, Zhai Q *et al.* Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128(5), 841–852 (2007).
86. Fujii K, Munshi UM, Ablan SD *et al.* Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* 391(2), 284–292 (2009).
87. McCullough J, Fisher RD, Whitby FG *et al.* ALIX–CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(22), 7687–7691 (2008).
88. Lee S, Joshi A, Nagashima K *et al.* Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(3), 194–199 (2007).
89. Zhai Q, Fisher RD, Chung HY *et al.* Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(1), 43–49 (2008).
90. Odorizzi G. The multiple personalities of Alix. *J. Cell Sci.* 119(15), 3025–3032 (2006).
91. Zhou X, Pan S, Sun L *et al.* The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem. J.* 418(2), 277–284 (2009).
92. Zhai Q, Landesman MB, Chung HY *et al.* Activation of the retroviral budding factor ALIX. *J. Virol.* 85(17), 9222–9226 (2011).
93. Pires R, Hartlieb B, Signor L *et al.* A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17(6), 843–856 (2009).
94. Munshi UM, Kim J, Nagashima K *et al.* An Alix fragment potentially inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPXL late domains. *J. Biol. Chem.* 282(6), 3847–3855 (2007).
95. Usami Y, Popov S, Gottlinger HG. Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J. Virol.* 81(12), 6614–6622 (2007).
96. Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(30), 10541–10546 (2008).
97. Popov S, Popova E, Inoue M *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* 82(3), 1389–1398 (2008).
98. Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoude G *et al.* The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog.* 5(3), e1000339 (2009).
99. Dussupt V, Sette P, Bello NF *et al.* Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J. Virol.* 85(5), 2304–2315 (2011).
100. Popova E, Popov S, Gottlinger HG. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p1 confers ESCRT pathway dependence. *J. Virol.* 84(13), 6590–6597 (2010).

- ▶ 101. Popov S, Popova E, Inoue M *et al*. Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *J. Virol.* 83(14), 7185–7193 (2009).
- ▶ 102. Martin-Serrano J. The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic* 8(10), 1297–1303 (2007).
- ▶ 103. Jager S, Gottwein E, Krausslich HG. Ubiquitination of human immunodeficiency virus type 1 Gag is highly dependent on Gag membrane association. *J. Virol.* 81(17), 9193–9201 (2007).
- ▶ 104. Chung HY, Morita E, von Schwedler U *et al*. NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPX late domains. *J. Virol.* 82(10), 4884–4897 (2008).
- ▶ 105. Usami Y, Popov S, Popova E *et al*. Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J. Virol.* 82, 4898–4907 (2008).
- ▶ 106. Zhadina M, Bieniasz PD. Functional interchangeability of late domains, late domain cofactors and ubiquitin in viral budding. *PLoS Pathog.* 6(10), e1001153 (2010).
- ▶ 107. Weiss ER, Popova E, Yamanaka H *et al*. Rescue of HIV-1 release by targeting widely divergent NEDD4-type ubiquitin ligases and isolated catalytic HECT domains to Gag. *PLoS Pathog.* 6(9) e1001107 (2010).
- ▶ 108. Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W *et al*. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J. Cell Biol.* 168(1), 89–101 (2005).
- ▶ 109. Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(8), 550–563 (2009).
- ▶ 110. Agromayor M, Martin-Serrano J. Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 281(32), 23083–23091 (2006).
- ▶ 111. Zamborini A, Usami Y, Radoshitzky SR *et al*. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(50), 19140–19145 (2006).
- ▶ 112. Solomons J, Sabin C, Poudevigne E *et al*. Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSH. *Structure* 19(18), 1149–1159 (2011).
- ▶ 113. Joshi A, Munshi U, Ablan SD *et al*. Functional replacement of a retroviral late domain by ubiquitin fusion. *Traffic* 9(11), 1972–1983 (2008).
- ▶ 114. Gan X, Gould SJ. Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. *Mol. Biol. Cell* 22(6), 817–830 (2011).
- ▶ 115. Da Q, Yang X, Xu Y *et al*. TANK-binding kinase 1 attenuates PTAP-dependent retroviral budding through targeting endosomal sorting complex required for transport-1. *J. Immunol.* 186(5), 3023–3030 (2011).
- ▶ 116. Langelier C, von Schwedler UK, Fisher RD *et al*. Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* 80(19), 9465–9480 (2006).
- ▶ 117. Im YJ, Wollert T, Boura E *et al*. Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev. Cell* 17(2), 234–243 (2009).
- ▶ 118. Kostelansky MS, Schluter C, Tam YY *et al*. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129(3), 485–498 (2007).
- ▶ 119. Pineda-Molina E, Belhali H, Piefer AJ *et al*. The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic* 7(8), 1007–1016 (2006).
- ▶ 120. Medina GN, Ehrlich LS, Chen MH *et al*. Sprouy 2 binds ESCRT-I factor Eap20 and facilitates HIV-1 Gag release. *J. Virol.* 85(14), 7353–7362 (2011).
- ▶ 121. Davies BA, Babst M, Katzmann DJ. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic* 12(10), 1298–1305 (2011).
- ▶ 122. Babst M, Wendland B, Estepa EJ *et al*. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17(11), 2982–2993 (1998).
- ▶ 123. Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV *et al*. Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J. Biol. Chem.* 280(13), 12799–12809 (2005).
- ▶ 124. Saksena S, Wahlman J, Teis D *et al*. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136(1), 97–109 (2009).
- **This is the first report that implicates conformational changes in endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-III, Vps20 and Snf7 upon polymerization on membranes.**
- ▶ 125. Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N *et al*. Divergent pathways lead to ESCRT-III catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36(4), 199–210 (2011).
- ▶ 126. Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB *et al*. Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* 10(6), 821–830 (2006).
- ▶ 127. Shim S, Kimpler LA, Hanson PI. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8(8), 1068–1079 (2007).
- ▶ 128. Lata S, Roessle M, Solomons J *et al*. Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* 378(4), 818–827 (2008).
- ▶ 129. Bajorek M, Schubert HL, McCullough J *et al*. Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(7), 754–762 (2009).
- ▶ 130. Rozycki B, Kim YC, Hummer G. SAXS ensemble refinement of ESCRT-III CHMP3 conformational transitions. *Structure* 19(1), 109–116 (2011).
- ▶ 131. Struchell-Breereton MD, Skaliky JJ, Kieffer C *et al*. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449(7163), 740–744 (2007).
- ▶ 132. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S *et al*. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449(7163), 735–739 (2007).
- ▶ 133. Kieffer C, Skaliky JJ, Morita E *et al*. Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* 15(1), 62–73 (2008).
- ▶ 134. Hanson PI, Roth R, Lin Y *et al*. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180(2), 389–402 (2008).
- **This is the first report that shows CHMP4(Snf7) ESCRT-III polymerization deforms the plasma membrane into membrane tubes.**
- ▶ 135. Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short JM *et al*. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 16(9), 1345–1356 (2008).
- ▶ 136. Lata S, Schoehn G, Jain A *et al*. Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321(5894), 1354–1357 (2008).
- **Reports the *in vitro* reconstitution of a helical tubular ESCRT-III polymer composed of CHMP2A and CHMP3. The tube binds membranes on the outside and VPS4 on the inside suggesting that such structures assemble on the inside of a bud neck.**
- ▶ 137. Fabrikant G, Lata S, Riches JD *et al*. Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* 5(11), e1000575 (2009).

- The computational model suggests that the membrane-binding affinity of ESCRT-III might be sufficient to provide the energy for fission.
- ▶ 138. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* 21(1), 77–91 (2011).
- ▶ 139. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J *et al.* Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458(7235), 172–177 (2009).
 - Demonstrates for the first time that ESCRT-III is involved in membrane fission.
- ▶ 140. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290), 864–869 (2010).
 - This report demonstrates that ESCRT-I and -II catalyze vesicle formation and ESCRT-III membrane fission.
- ▶ 141. Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454(7201), 236–240 (2008).
- ▶ 142. Jouvenet N, Zhadina M, Bieniasz PD *et al.* Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* 13(4), 394–401 (2011).
 - Reports that Gag and Alix progressively accumulate at viral assembly sites, while ESCRT-III and Vps4A were transiently recruited after completion of Gag assembly.
- ▶ 143. Baumgartel V, Ivanchenko S, Dupont A *et al.* Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat. Cell Biol.* 13(4), 469–474 (2011).
 - Utilized live-cell imaging to show that VPSA is transiently recruited to HIV budding sites where it assembles into dodecamers, which reside at the site for ~35 s and disappear before particle release. First indication that VPS4 plays an active role in membrane fission.
- ▶ 144. Morita E, Sandrin V, McCullough J *et al.* ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9(3), 235–242 (2011).
 - Demonstrates that CHMP4 and CHMP2 ESCRT-III family members are the most important ESCRT-III proteins required for HIV release. CHMP4 interacts with CHMP2, and CHMP2 might make the final cut, supported by [73].
- ▶ 145. Carlson LA, Briggs JA, Glass B *et al.* Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* 4(6), 592–599 (2008).
- ▶ 146. Teis D, Saksena S, Judson BL *et al.* ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* 29(5), 871–883 (2010).
- ▶ 147. Ghanam RH, Fernandez TF, Fledderman EL *et al.* Binding of calmodulin to the HIV-1 matrix protein triggers myristate exposure. *J. Biol. Chem.* 285(53), 41911–41920 (2011).
- ▶ 148. Thali M, Bukovsky A, Kondo E *et al.* Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372(6504), 363–365 (1994).
- ▶ 149. Lingappa JR, Dooher JE, Newman MA *et al.* Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1(HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J. Biol. Chem.* 281(7), 3773–3784 (2006).
- ▶ 150. Perugi F, Mutiaux D, Ramirez BC *et al.* Human discs large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Mol. Biol. Cell* 20(1), 498–508 (2009).

1.5. Objectifs du travail de thèse

- 1 Caractérisation biochimique et structurale des polymères ESCRT-III

CONTEXTE : Il a été montré que les protéines CHMP2a et CHMP3 forment un hétéropolymère conique *in vitro* potentiellement responsable de l'activité de clivage membranaire catalysé par ESCRT-III [73], [82]. La capacité de ces polymères à remodeler les membranes reste cependant à démontrer. De plus, la structure adoptée par CHMP2a et CHMP3 au sein de ce polymère est inconnue.

De précédents travaux ont également décrit les interactions existant entre les protéines CHMP [60], [159]. Il n'existe en revanche aucune donnée sur les affinités engagées dans ces interactions.

OBJECTIFS : Reconstituer les polymères CHMP2a/CHMP3, les analyser et en obtenir la structure par cryo-microscopie électronique afin de comprendre comment ils sont formés et comment ils peuvent fonctionner dans la cellule. Analyser les interactions entre protéines CHMP par SPR.

- 2 Développement d'anticorps spécifiques des polymères ESCRT-III

CONTEXTE : Les protéines ESCRT-III sont capables de former différents types de polymères *in vitro*. Cependant, il existe peu de preuves directes de l'existence de ces polymères dans les cellules.

OBJECTIF : Développer un anticorps reconnaissant uniquement les structures polymériques afin de pouvoir visualiser et éventuellement purifier les polymères ESCRT présents dans les cellules humaines.

- 3 Etude des interactions entre protéines CHMP

CONTEXTE : Il n'existe à l'heure aucun modèle clair permettant de comprendre comment les protéines CHMP interagissent entre elles au sein d'ESCRT-III. Les quelques données structurales sur les interactions entre protéines CHMP ne donnent aucun indice sur la manière dont les polymères sont formés mais semblent indiquer un mécanisme d'assemblage commun.

OBJECTIF : Identifier et obtenir la structure du dimère constituant la sous unité minimale présente au sein des polymères CHMP2A/CHMP3.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Structure des polymères CHMP2A/CHMP3 par cryo-microscopie électronique

Constructions plasmidiques utilisées :

Vecteur	Insert	Provenance
pMAL C2G modifié (site thrombine remplacé par TEV)	CHMP2A (9-161)	[73]
pProEx HTb	CHMP3 full length (1-222)	[87]

Purification des protéines CHMP2A et CHMP3 : Les bactéries ont été transformées avec les constructions plasmidiques précitées comme suit : la souche BL21-Gold DE3 pour CHMP3 et C41 DE3 pour CHMP2A. Les bactéries ont été cultivées dans 2L de milieu LB ampicilline. Lorsque les cellules ont atteint une DO à 600 nm de 0,5 elles sont induites avec 1 mM final d'IPTG durant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS⁶⁰⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl) puis lysées par sonication durant 10 min sur la glace. Le lysat est ensuite centrifugé durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une résine de nickel (CHMP3) Ni-NTA Superflow (Qiagen) ou sur résine d'amylose (CHMP2A) Amylose Resin High FLOW (New England Biolabs) puis les protéines retenues sur la résine sont lavées avec du tampon HBS¹⁵⁰ ; 10 mM imidazole (CHMP3) ou HBS⁶⁰⁰ (CHMP2A). Les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl (pour la purification de CHMP3 ces tampons contiennent également 20 mM d'imidazole). Pour CHMP3, un dernier lavage dans le tampon HBS¹⁵⁰, puis HBS¹⁵⁰ 50 mM imidazole précède l'élution dans le même tampon contenant 350 mM d'imidazole. La protéine CHMP2A est lavée dans le tampon HBS⁶⁰⁰ puis éluée dans ce tampon avec 10 mM de maltose. Enfin, CHMP2A et CHMP3 sont purifiées par filtration sur gel à l'aide d'une colonne Superdex 200 (GE Healthcare) dans le tampon HBS¹⁵⁰ (CHMP3) ou HBS⁶⁰⁰ (CHMP2A).

Production et purification des polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 : Afin de produire des polymères, environ 4 à 10 µM de monomères CHMP2A sont mélangés à un excès de la protéine CHMP3 (généralement 30-80 µM). Le mélange est incubé sur la nuit à 4°C. Les polymères sont ensuite séparés des monomères par gradient de sucrose dans le tampon HBS¹⁵⁰ contenant divers pourcentage de sucrose. Le gradient est constitué en superposant des fractions de 60, 40, 30, 20, 15 et 5% de sucrose ; l'échantillon est chargé en haut du gradient (sur la fraction 5% sucrose) puis centrifugé 6h à 152000 x g. Après centrifugation, la fraction de 60% de sucrose contenant les polymères est récupérée et analysée par microscopie électronique. Toutes les fractions sont analysées par SDS-PAGE. Par la suite, dans le but d'augmenter les rendements en polymères, le mélange de CHMP2A/CHMP3 est concentré environ 4 fois et incubé sur la nuit à 4°C. Les polymères sont ensuite purifiés par centrifugation 10 min à 12000 x g puis resuspendus dans le tampon HBS¹⁵⁰. Cette opération est répétée 4 fois. Les polymères sont ensuite mis en présence de la protéase TEV

avec un ratio en masse de 1:5 durant 4h à température ambiante. La MBP libre est finalement éliminée en répétant le protocole de purification par centrifugation/resuspension ci-dessus.

Cryo-microscopie électronique : Environ 3.5 μL d'échantillon ont été appliqués sur le carbone d'une grille de cryo-microscopie électronique (Quantifoil) puis transférés et congelés dans de l'éthane liquide grâce à un appareil Vitrobot Mark II (FEI). Les grilles ont été stockées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation sur un microscope Philips CM200 opérant à 200 kV ou sur un microscope FEI Polara opérant à 300 kV. Les images sont acquises à faible dose d'exposition avec des grossissements de 39.5k pour les données enregistrées avec le microscope CM200 (jeu de données 1), de 39k (jeu de données 2) ou 59k (jeu de données 3) pour les données enregistrées avec le microscope FEI Polara. Les micrographies ont été enregistrées sur un film SO-163 (Kodak).

Reconstruction de la structure tridimensionnelle des polymères : voir section 3.1.1.2.2.

2.2. Propriétés biochimiques des polymères CHMP2A/CHMP3

Constructions plasmidiques utilisées : Voir section 2.1

Purification des protéines CHMP2A et CHMP3 : Voir section 2.1

Production et purification des polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 : Afin de produire des polymères, environ 4 à 10 μM de monomères CHMP2A sont mélangés à un excès de la protéine CHMP3 (généralement 30-80 μM), le mélange de CHMP2A/CHMP3 est concentré environ 4 fois et incubé sur la nuit à 4°C. Les polymères sont ensuite purifiés par centrifugation 10 min à 12000 $\times g$ puis resuspendus dans le tampon HBS¹⁵⁰. Cette opération est répétée 4 fois. Lorsque cela est nécessaire, les polymères sont mis en présence de la protéase TEV avec un ratio en masse de 1:5 durant 4h à température ambiante. La MBP libre est finalement éliminée en répétant le protocole de purification par centrifugation/resuspension ci-dessus.

Dichroïsme circulaire : Toutes les expériences sont conduites sur un spectropolarimètre Jasco J-810 à 222 nm avec une cuvette de 1 mm d'épaisseur. Le bon repliement des protéines testées est au préalable vérifié en réalisant un scan de 350 nm à 190 nm. Un scan basé sur le tampon seul permet de contrôler la contribution du tampon dans la valeur du signal. Les courbes de dénaturation sont enregistrées dans le tampon HBS¹⁵⁰ avec un pas de 1°C et un temps d'équilibration de 30 sec de 20°C à 95°C. La quantité de protéine est ajustée pour donner un signal compris entre -35 et -40 millidegrés.

Protéolyse limitée : Les protéines sont mises en présence de différents ratios en masse de trypsine ou de protéinase K. Les réactions sont incubées 1 h à température ambiante puis analysées par SDS-PAGE.

Production de liposomes : Les liposomes sont produits en mélangeant 70% du lipide POPC (1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) avec 20% du lipide DOPS (1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine) et 10% de cholestérol (Avanti). Le chloroforme,

dans lequel le mélange de lipide est solubilisé, est évaporé puis les lipides sont resuspendus dans le tampon HBS¹⁵⁰ pour obtenir une concentration finale de 2,5 mg/mL. Les lipides sont enfin extrudés à travers un filtre ayant des pores de 200 nm de diamètre (Avanti). La taille moyenne des liposomes, de l'ordre de 400-500 nm, est obtenue par diffusion dynamique de lumière.

Interaction avec les lipides : Environ 10 µg de polymères en présence de TEV à un ratio 1:5 sont mélangés à 100 µg de liposomes à température ambiante. Les réactions sont observées à 15 min, 30 min, 1 h et 2 h par microscopie électronique (coloration négative). Le mélange protéines/liposomes est dilué au demi dans le tampon HBS¹⁵⁰ ; 80% sucrose et chargé en bas du gradient (= fraction 40%). Les gradients sont formés en ajoutant successivement 40%, 30%, 20%, 15% et 5% de sucrose dans du tampon HBS¹⁵⁰ puis les gradients sont centrifugés durant 6h à 152000 x g. Les fractions sont ensuite récupérées et analysées par gel SDS-PAGE.

2.3. Etude des interactions entre protéines CHMP par SPR

Constructions plasmidiques utilisées :

Vecteur	Insert	Provenance
pBADM41	CHMP6 full length (1-201)	Dr. Bettina Hartlieb
pBADM41	CHMP4B 1-175-SNSASDDASASASADEDASS-(204-224)	[75]
pMAL C2G modifié (site thrombine remplacé par TEV)	CHMP2A (9-161)	[73]
pProEx HTb	CHMP3 (9-183)	[87]
pProEx HTb	CHMP3 full length (1-222)	[87]

Purification des protéines CHMP6, CHMP4B, CHMP2A et CHMP3 : Les constructions ont été exprimées dans la souche BL21-Gold DE3 (CHMP3, CHMP6) ou C41 DE3 (CHMP2A, CHMP4B). Les bactéries ont été cultivées dans 2L ou 4L (CHMP4B) de milieu LB ampicilline. Lorsque les cellules ont atteint une DO à 600 nm de 0,5 elles sont induites avec 1 mM final d'IPTG (CHMP2A, CHMP3) ou avec 0,2% d'arabinose (CHMP4B, CHMP6) durant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS¹⁵⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 150 mM NaCl - CHMP6) ou HBS¹⁵⁰ ; 10 mM imidazole (CHMP3) ou HBS⁶⁰⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl - CHMP2A, CHMP4B) puis lysées par sonication durant 10 min sur la glace. Les lysats sont ensuite centrifugés durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une résine de nickel (CHMP3) Ni-NTA Superflow (Qiagen) ou sur résine d'amylose

(CHMP2A, CHMP4B, CHMP6) Amylose Resin High Flow (New England Biolabs) puis les protéines retenues sur la résine sont lavées avec du tampon HBS¹⁵⁰ (CHMP6) ou HBS¹⁵⁰ ; 10 mM imidazole (CHMP3) ou HBS⁶⁰⁰ (CHMP2A, CHMP4B). Les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl (pour la purification de CHMP3 ces tampons contiennent également 20 mM d'imidazole). Pour CHMP3, un dernier lavage dans le tampon HBS¹⁵⁰ ; 20 mM imidazole, puis HBS¹⁵⁰ 50 mM imidazole précède l'élution dans le même tampon contenant 350 mM d'imidazole. Les protéines CHMP2A et CHMP4B sont lavées dans le tampon HBS⁶⁰⁰ puis éluées dans ce tampon avec 10 mM de maltose. La protéine CHMP6 est lavée avec le tampon HBS¹⁵⁰ et élue dans ce même tampon avec 10 mM de maltose. Les protéines sont enfin purifiées par filtration sur gel à l'aide d'une colonne Superdex75 (GE Healthcare) dans le tampon HBS¹⁵⁰.

Résonance plasmonique de surface (SPR) : Toutes les expériences ont été réalisées avec l'instrument Biacore X (GE Healthcare) dans le tampon de course suivant : 20 mM Hepes pH 7,6 ; 150 mM NaCl ; 50 µM EDTA ; 0,005% P20. Les protéines purifiées utilisées comme analyte ont été dialysées dans le tampon de course. Les protéines utilisées comme ligand sont immobilisées sur des puces CM5 (GE Healthcare). Les quantités de ligand à immobiliser (RU_{ligand}) sont estimées sur la base de la formule :

$$RU_{ligand} = 4 \cdot R_{max} \cdot \frac{MW_{analyte}}{MW_{ligand}} \cdot valence_{ligand}$$

MW : masse moléculaire en kDa

R_{max} : valeur de la réponse maximale que l'on veut fixer

Pour l'analyse cinétique, les protéines ont été immobilisées directement sur la puce dans une des deux cellules après activation avec un mélange d'EDC/NHS (Sigma). Les protéines à immobiliser sont diluées dans le tampon de couplage (10 mM acétate de sodium pH 4,5) puis injectées jusqu'à l'obtention des niveaux de réponse requis. La puce est ensuite désactivée avec 0.1M éthanolamine-HCl. Les mesures sont réalisées à un flux de 25 µL/min en injectant 50 µL de chacune des dilutions contenant l'analyte et en laissant la dissociation se produire durant 600 secondes. Les courbes ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel BiaEval (version 4.1 ; Biacore).

Pour l'analyse à l'équilibre, les deux cellules de chaque puce ont été saturées avec 0,1 µg/mL streptavidine (dans le tampon de couplage) après activation. Les protéines à immobiliser ont été mises en présence de biotine sulfo-LC-NHS (Thermo Scientific) 1h à 4°C à un ratio molaire de 1:5, puis dialysées dans le tampon HBS¹⁵⁰ afin d'éliminer la biotine libre. Les protéines sont ensuite ajoutées dans une des deux cellules de chaque puce. Les courbes sont enregistrées à un flux de 5 µL/min en injectant 90 µL de chacune des dilutions d'analyte (sauf pour le jeu de données CHMP2A/CHMP3 full length où le volume d'injection est de 70 µL) et en laissant un délai de 600 secondes par mesure en fin d'injection. Les valeurs à l'équilibre ont été calculées en moyennant le signal correspondant approximativement aux 140 dernières secondes de chaque mesure (variation globale d'1 RU maximum). Les régressions linéaires des graphes de Scatchard ont été calculées avec le logiciel Excel 2007 (Microsoft). Les hyperboles ont été calculées à l'aide du logiciel Sigma Plot (version 11.4 ; Systat).

2.4. Sélection d'anticorps de lama contre les polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 par Phage Display

Constructions plasmidiques utilisées :

Vecteur	Insert	Provenance
pMAL C2G modifié (site thrombine remplacé par TEV)	CHMP2A (9-161)	[73]
pProEx HTb	CHMP3 (9-183)	[73]
phagemide pUR5071	PelBleader—V _{HH} —His6—MYC—pIII	T. Verrips lab. Utrecht, Pays Bas

Phage Display :

Protocole standard - Les protéines servant à la sélection ont été adsorbées en plaque Maxisorp 96 puits (Nunc) sur la nuit à 4°C dans du tampon PBS. Les puits sont bloqués à l'aide de PBS supplémenté de 5% de lait 1h à température ambiante. La bibliothèque de phages est ensuite mise en contact des puits dans le même tampon durant 2h à température ambiante sous agitation. Les puits sont par la suite lavés 5 fois avec du PBS tween 0,05% à raison de 10 min par lavage sous agitation, puis 3 lavage dans du PBS. Les phages retenus sont enfin élués avec de la trypsine à 1 mg/mL dans du PBS durant 20 min à température ambiante. La trypsine est par la suite neutralisée via un inhibiteur de protéase (Sigma). Les phages élués sont mis en présence de bactéries en phase exponentielle de croissance (*E. coli* souche TG1) dans 900 µL de milieu 2x YT durant 30 min à 37°C sans agitation. Les infections sont ensuite dilués en série de pas 10 jusqu'à la dilution 10⁻¹⁰ en plaque 96 puits. 5 µL de chacune des dilutions sont déposés sur gélose 2x YT ampicilline 2% glucose et mis en culture sur la nuit à 37°C afin d'évaluer les taux d'enrichissement à l'issue du premier round. En parallèle, le reste des infections (non diluées) est incubé dans 5 mL de milieu LB ampicilline 2% glucose sur la nuit à 37°C. Après culture, les infections sont diluées 100 fois dans du milieu LB ampicilline 2% glucose durant 2h à 37°C. Afin de générer une bibliothèque enrichie pour un deuxième round de sélection, les bactéries sont ensuite infectées par le phage M13 helper durant 30 min à 37°C sans agitation puis centrifugées 10 min à 4600 rpm. Les culots bactériens sont resuspendus dans 50 mL de milieu 2x YT ampicilline kanamycine et incubés dans 50 mL de milieu sous agitation sur la nuit à 37°C. Après culture, les infections sont centrifugées 10 min à 4600 rpm. On précipite les phages en mélangeant 40 mL de surnageant à 10 mL de PEG6000 20% ; 2,5 M NaCl et en les incubant 30 min sur la glace. Les phages sont culotés par centrifugation 15 min à 4600 rpm et resuspendus dans 1mL de PBS. On répète l'opération (avec 250 µL de PEG) afin de laver les phages. Pour la sélection, on utilise 1 µL de phages. La suite de la procédure est similaire au premier round. Les bactéries porteuses de phagemides issues de la sélection sont enfin étalées sur gélose LB ampicilline 2% de glucose. Les clones isolés sont mis en culture en plaque 96 puits dans du milieu LB

ampicilline 2% glucose et stockés après ajout de glycérol (concentration finale 15%) pour un stockage à -80°C.

Protocole en solution - Les bactéries *E. coli* souche TG1 en phase exponentielle issues de la première sélection avec les polymères CHMP (tubes) sont infectées par un phage M13 helper 30 min à 37°C sans agitation. Les bactéries sont ensuite centrifugées 10 min à 4600 rpm et resuspendues dans 50 mL de milieu LB ampicilline kanamycine pour être cultivées sur la nuit à 37°C. La culture est centrifugée 15 min à 4600 rpm. Le surnageant de culture est récupéré (40 mL) et les phages sont précipités avec 10 mL de PEG6000 20% ; 2,5 M NaCl 30 min sur la glace. Les virus sont enfin centrifugés 15 min à 4600 rpm et resuspendus dans 1 mL de PBS 5% lait. La sélection est réalisée en mélangeant les phages avec environ 10 µg de tubes MBP-CHMP2A/CHMP3 et en incubant le mélange sous agitation 30 min à température ambiante. Les polymères sont ensuite culotés par centrifugation 20 min à 12000 rpm et lavés au PBS, cette opération est répétée 3 fois. Les phages copurifiés avec les polymères sont ensuite mis en présence de cellules TG1 en phase exponentielle de croissance pour infection durant 30 min à 37°C sans agitation. Les bactéries sont enfin centrifugées 10 min à 4600 rpm, resuspendues puis étalées sur gélose LB ampicilline pour récupérer les clones isolés. Les tests d'expression sont conduits (i) en cultivant les clones dans 100 µL LB ampicilline puis induits avec de l'IPTG sur la nuit à 37°C ou (ii) en cultivant le mélange de cellules infectées à l'issue de la sélection puis en l'induisant à l'IPTG sur la nuit à 37°C. Les résultats sont analysés par comparaison induit/non induit sur gel SDS-PAGE.

Fingerprinting : L'analyse par fingerprinting est conduite en effectuant des PCR sur les colonies de clones isolés lors de la sélection. La PCR est conduite à l'aide des amorces MPE25 (5'-TTTCTGTATGGGGTTTTGCTA-3') et M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3'), l'amplification des VHH (~750 pb) est effectuée selon le protocole suivant : 30 sec à 98°C ; 35 sec à 55°C ; 25 sec à 72°C (30 cycles). Les fragments amplifiés sont digérés à l'aide de l'enzyme HinFI 2h à 37°C. Les produits de digestion sont enfin analysés sur gel d'agarose 2,5%.

Purification des clones VHH isolés : Les clones isolés ont été inoculés dans 1L LB ampicilline puis induits sur la nuit à 18°C avec 1 mM final d'IPTG lorsque les bactéries ont atteint une DO à 600 nm de 0,5. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS¹⁵⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 150 mM NaCl) puis lysées par sonication durant 10 min sur la glace. Le lysat est ensuite centrifugé durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une résine de nickel Ni-NTA superflow (Qiagen) puis lavé avec le tampon HBS¹⁵⁰, les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl. L'élution, précédée dans lavage avec le tampon HBS¹⁵⁰ 50 mM imidazole, est effectuée dans le tampon HBS¹⁵⁰ ; 350 mM imidazole. Les protéines éluées sont ensuite purifiées par gel filtration avec une Superdex 200 (GE Healthcare) dans le tampon HBS¹⁵⁰. Les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE.

Tests ELISA : Les protéines CHMP purifiées (monomères et polymères) ainsi que la MBP sont adsorbées sur plaque Maxisorp 96 puits (Nunc) sur la nuit à 4°C dans du tampon PBS, les puits sont ensuite bloqués par ajout de PBS 4% lait. Les VHH sont produits en exprimant les clones issus de la sélection en plaque 96 puits dans 4 mL de LB ampicilline à 37°C. L'expression des VHH est induite par ajout d'IPTG (1 mM final) sur la nuit à 37°C. Après culture, les VHH sont extraits du périplasme par congélation/décongélation et les clones sont centrifugés 15 min à 4600 rpm. Le surnageant est

ensuite directement ajouté à la solution de blocage dans les puits contenant les protéines adsorbés et incubé 1h à température ambiante. Les plaques servant aux tests ELISA sont ensuite lavées à 5 reprises dans du tampon PBS 0,05% Tween, incubées avec l'anticorps secondaire 9E10 anti-myc (Abcam) dilué au 2000^{ème} 45 min dans du PBS 5% lait à température ambiante puis lavées à nouveau 5 fois dans du tampon PBS 0,05% Tween. Une dernière incubation de 45 min avec un anticorps tertiaire anti souris couplé HRP dans du PBS 5% lait est réalisée. Enfin, après avoir répété les 5 étapes de lavage dans du PBS 0,05% Tween, les puits sont lavés au PBS et incubés en présence d'OPD (ortho-phénylène diamine - Thermo Scientific). La réaction enzymatique est bloquée avec 0.2 M d'H₂SO₄ et les absorbance sont ensuite lues à 495 nm avec un lecteur de plaque Wallac Victor² V (Perkin Elmer). Les contrôles positifs sont réalisés à partir d'un VHH bien caractérisé non issu de la bibliothèque.

Tests d'interaction par gradients de sucrose : Le clone 2A8 est mis en présence de 5 µg de tubes MBP-CHMP2A/CHMP3, le mélange est ensuite incubé sur la nuit à 4°C. La protéase TEV est ajoutée à un ratio en masse de 1:5. Les gradients sont formés en ajoutant successivement 60%, 40%, 30%, 20% et 15% de sucrose dans du tampon HBS¹⁵⁰. Les mélanges protéiques sont chargés sur la fraction 15% puis les gradients sont centrifugés durant 6h à 152000 x g. Les fractions sont ensuite récupérées et analysées par gel SDS-PAGE.

2.5. Obtention d'un sérum polyclonal anti-CHMP4B et purification des anticorps spécifiques

Constructions plasmidiques utilisées :

Vecteur	Insert	Provenance
pMAL C2G modifié (site thrombine remplacé par TEV)	CHMP2A (9-161)	[73]
pBADM41	CHMP4B 1-175- SNSASDDASASASADEDASS- (204-224)	[75]
pDsRed2-N1	DsRed-CHMP4B full length	Dr. Heinrich Gottlinger

Purification des polymères CHMP2A et CHMP4B : Pour la purification de CHMP2A, voir section 2.1 Le plasmide codant pour la protéine MBP-CHMP4B a été transféré dans des cellules *E. coli* souche BL21-Gold DE3. Les bactéries ont été cultivées dans 4L de milieu LB ampicilline. Lorsque les cellules ont atteint une DO à 600 nm de 0,5 elles sont induites avec 0,2% d'arabinose durant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS⁶⁰⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl) puis lysées par sonication durant 10 min sur la glace. Le lysat est ensuite centrifugé durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une résine d'amylose Amylose Resin High Flow (New England Biolabs)

puis les protéines retenues sur la résine sont lavées avec du tampon HBS⁶⁰⁰, les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl. Un dernier lavage dans le tampon HBS⁶⁰⁰ précède l'éluion dans le tampon HBS⁶⁰⁰ supplémenté de 10 mM de maltose. Les polymères sont ensuite séparés des monomères par filtration sur gel à l'aide d'une colonne Superdex75 (GE Healthcare) dans le tampon HBS⁶⁰⁰. Les fractions correspondant aux polymères sont enfin incubées avec de la protéase TEV 4h à 25°C (CHMP4B, ratio en masse 1:10) ou de protéinase K 1h à 25°C (CHMP2A, ratio en masse 1:100). Les polymères CHMP2A débarrassés de la MBP sont soumis à un gradient de sucrose (de bas en haut du gradient : 60% - 40% - 30% - 20% - 15%) durant 6h à 152000 x g. Après centrifugation, la fraction de 60% de sucrose contenant les polymères est récupérée. Les polymères CHMP4B sont purifiés en chargeant le produit de clivage sur une colonne de nickel HisTrap FF (GE Healthcare) dans le tampon HBS⁶⁰⁰. Les polymères sont récupérés lors du lavage.

Immunisation : Le protocole est pris en charge par la société Covalab. Brièvement, les polymères purifiés sont injectés aux jours 0, 14, 28, et 56. Chaque injection contient 50 µg de protéine purifiée en présence d'adjuvant de Freund. Un sérum test est prélevé au jour 38.

ELISA & western blot : Environ 250 ng de protéine sont adsorbés dans chaque puits d'une plaque Maxisorp (Nunc) sur la nuit à 4°C dans du PBS. Les puits sont saturés avec du PBS contenant 5% de lait. Le sérum polyclonal de lapin est ensuite utilisé à différentes dilutions (1: 1000 ; 1:2500 ; 1:5000 ; 1:7500 ; 1:10000) comme anticorps primaire dans le même tampon durant 45 min à température ambiante puis, après 5 lavage au PBS Tween 0.05%, un anticorps secondaire anti lapin dilué au 10000^{ème} couplé HRP (Promega) est incubé dans les puits dans du tampon PBS 5% lait 45 min à 25°C. Après 5 lavages supplémentaires avec du PBS Tween 0,05%, un lavage final est réalisé dans du PBS puis la révélation est opérée avec de l'OPD (Thermo Scientific). La réaction enzymatique est bloquée avec 0.2 M d'H₂SO₄ et les absorbance sont ensuite lues à 495 nm avec un lecteur de plaque Wallac Victor² V (Perkin Elmer). Les western blot sont réalisés à partir de gel SDS de 16% de polyacrylamide et transférés sur membrane de nitrocellulose. Le protocole de lavage et d'incubation des anticorps est en tout point similaire à l'ELISA excepté le dernier lavage qui est effectué dans un tampon Hepes (20 mM pH 7,6 ; 150 mM NaCl). L'anticorps secondaire est couplé à la phosphatase alcaline (Promega) et la révélation utilise la solution de révélation Western Blue (Promega). Après l'apparition du signal spécifique sur la membrane, la réaction est stoppée en lavant la membrane avec de l'eau distillée.

Culture cellulaire & Immunofluorescence : Les cellules HEK293T sont cultivées à 37°C dans le milieu DMEM supplémenté de sérum de veau fœtal, de L-glutamine ainsi que de pénicilline et streptomycine (Gibco). Les cellules sont transfectées à l'aide de PEI à 10 µg/mL en présence de 2 µg de plasmide dans du milieu DMEM non supplémenté durant 4 h à 37°C. Le milieu de transfection est ensuite remplacé par du DMEM supplémenté et les cellules sont incubées 24 h à 37°C. Les cellules sont par la suite lavées deux fois avec du tampon PBS froid puis fixées 20 min à 4°C en présence de paraformaldéhyde 4%, lavées deux fois avec du PBS et bloquées 10 min avec 100 mM de glycine dans du PBS. Après un lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées 3 min avec du PBS contenant 0.1% de Triton X-100 puis lavées à nouveau avec du PBS à 4°C. L'immunomarquage est effectué en incubant les cellules fixées 1h à température ambiante avec l'anticorps anti CHMP4B purifié dilué au 500^{ème} puis en lavant les cellules 3 fois avec du PBS. L'anticorps secondaire anti lapin couplé Alexa

Fluor 488 (Molecular Probes) est utilisé au 2000^{ème} en présence de DAPI dans du PBS ; 5% glycerol ; 2% BSA. Enfin, les cellules sont lavées au PBS et les lamelles sont montées à l'aide de Mowiol. Les lames sont visualisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence TCS-SP2 (Leica).

2.6. Test de modèles de polymérisation

Constructions plasmidiques utilisées :

Vecteur	Insert	Provenance
pBADM30	CHMP2A (54-103)	clone personnel
pBADM30	CHMP3 (105-161)	clone personnel
pBADM41	CHMP2A (1-53)	clone personnel
pBADM41	CHMP2A (10-53)	clone personnel
pBADM41	CHMP3 (105-161)	clone personnel
pETM41	CHMP2A (104-181)	clone personnel
pETG 30A	CHMP2A (115-161)	clone personnel
pProEx HTb	CHMP3 (1-103)	clone personnel
pProEx HTb	CHMP3 (9-183) M27C ; M84C	GenScript
pProEx HTb	CHMP3 (9-183) H83C ; L117C	GenScript
pRSET A	CHMP2A (1-118)	clone personnel
RSF Duet	CHMP2A (1-102)	clone personnel
RSF Duet	CHMP2A (10-102)	clone personnel
RSF Duet	CHMP2A (103-159)	clone personnel

Expression et purification des tronctions : La souche *E. coli* C41 a été transformée avec chacune des tronctions ci-dessus puis inoculée dans 1L LB avec l'antibiotique approprié. Les cultures ont été incubées à 37°C jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,5. Les cellules ont ensuite été induites avec 1 mM d'IPTG ou 0,2% d'arabinose selon la construction utilisée durant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS¹⁵⁰ (20 mM Hepes pH 7,6 ; 150 mM NaCl). Pour chacune des combinaisons testées, les culots des deux constructions sont mélangés puis lysés par sonication durant 10 min sur la glace. Le lysat est ensuite centrifugé durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé

sur une résine de nickel Ni-NTA superflow (Qiagen), une résine d'amylose Amylose Resin High FLOW (New England Biolabs) ou une résine de glutathion Glutathione Sepharose 4b (GE Healthcare) puis lavé avec le tampon HBS¹⁵⁰, les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl. L'élution, précédée dans lavage avec le tampon HBS¹⁵⁰ 50 mM imidazole, est effectuée dans le tampon contenant 350 mM imidazole pour la colonne de nickel ; 10 mM de maltose pour la colonne d'amylose ou de 10 mM de glutathion réduit pour la colonne de glutathion. Les protéines éluées sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE. Pour les constructions CHMP3 (1-103) et CHMP2A (104-181), une purification par chromatographie d'exclusion de taille est réalisée sur colonne Superdex 75 (GE Healthcare) dans le tampon HBS¹⁵⁰.

Purification des mutants CHMP3Cys : Les bactéries *E. coli* souche BL21-Gold DE3 (transformées avec les constructions codants pour les mutants) ont été cultivées dans 2L de milieu LB ampicilline. Lorsque les cellules ont atteint une DO à 600 nm de 0,5 elles sont induites avec 1 mM final d'IPTG durant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 min à 8000 x g et resuspendues dans 100 mL de tampon HBS¹⁵⁰ ; 10 mM imidazole puis lysées par sonication durant 10 min sur la glace. Le lysat est ensuite centrifugé durant 25 min à 32800 x g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est chargé sur une résine de nickel Ni-NTA Superflow (Qiagen) puis les protéines retenues sur la résine sont lavées avec du tampon HBS¹⁵⁰, les acides nucléiques sont éliminés par lavages successifs avec 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M NaCl puis 20 mM Hepes pH 7,6 ; 1M KCl. Un dernier lavage dans le tampon HBS¹⁵⁰, puis HBS¹⁵⁰ ; 50 mM imidazole précède l'élution dans le même tampon contenant 350 mM d'imidazole. Les protéines sont enfin purifiées par filtration sur gel à l'aide d'une colonne Superdex200 (GE Healthcare) dans le tampon HBS¹⁵⁰.

Cross-linking chimique : Les expériences de cross-linking sont réalisées en ajoutant entre 0,1 et 5 mM d'EGS (Pierce) ou de glutaraldéhyde (Sigma) durant 20 min à température ambiante. La réaction est bloquée par ajout de 20 mM Tris pH 7,6. Le produit de chaque réaction est analysé par SDS-PAGE.

Tests de polymérisation par gradients de sucrose : Un large excès des mutants CHMP3Cys est mis en présence de quelques microgrammes de la protéine MBP-CHMP2A. Après incubation sur la nuit à 4°C, le mélange est chargé sur le haut d'un gradient de sucrose (de bas en haut du gradient : 60% - 40% - 30% - 20% - 15%) durant 6h à 152000 x g. Après centrifugation, la fraction de 60% de sucrose contenant les polymères est récupérée et analysée par microscopie électronique. Toutes les fractions sont analysées par SDS-PAGE.

3.RESULTATS

3.1. Caractérisation biochimique et structurale des polymères ESCRT-III

3.1.1. Structure des polymères CHMP2A/CHMP3 par cryo-microscopie électronique

3.1.1.1. Introduction

Les protéines CHMP2A et CHMP3 font partie d'ESCRT-III. Lorsqu'elles sont mises en présence l'une de l'autre *in vitro*, elles sont capables de former des hétéropolymères tubulaires dont l'une des extrémités est parfois terminée par une structure en forme de dôme [73]. Ces structures sont probablement responsables de l'activité de clivage membranaire d'ESCRT-III [73], [82].

Ce projet fait suite au travail d'une post-doctorante (Dr. Suman Lata) du laboratoire concrétisé par une publication dans laquelle sont décrits la première fois ces polymères. Mon objectif a été de produire et purifier les polymères afin d'en obtenir la structure par cryo-microscopie électronique. La partie microscopie électronique ainsi que la reconstruction de la structure sont réalisées par le Dr. Grégory Effantin, post-doctorant dans le laboratoire.

3.1.1.2. Résultats

3.1.1.2.1. Production, purification et optimisation des échantillons de polymères pour la microscopie électronique :

Pour produire et purifier les polymères tubulaires, je me suis basé sur le protocole développé par le docteur Suman Lata. Selon ce protocole, les constructions protéiques MBP-CHMP2A (troncation C-terminale constitutivement active) et CHMP3 (full length) sont purifiées séparément puis mélangées afin d'assembler les polymères. La réaction de polymérisation est spontanée et ne nécessite qu'une dizaine de micromolaires de MBP-CHMP2A en présence d'un excès de la protéine CHMP3.

J'ai donc purifié chacune de ces deux protéines individuellement (Figure 14). Les deux protéines se purifient relativement aisément après une colonne d'affinité suivie par une colonne de filtration sur gel. La protéine MBP-CHMP2A est capable de former des homopolymères en forme d'anneaux d'environ 25 nm de diamètre visibles en microscopie électronique (Figure 14B). Ces polymères éluent dans le volume mort d'une colonne de filtration sur gel Superdex 200. Le profil d'élution montre également la présence de MBP seule, probablement issue d'une hydrolyse spontanée du linker entre cette dernière et CHMP2A. La difficulté majeure a été d'obtenir suffisamment de monomères MBP-CHMP2A car les polymères sont généralement très majoritaires lors de la purification.

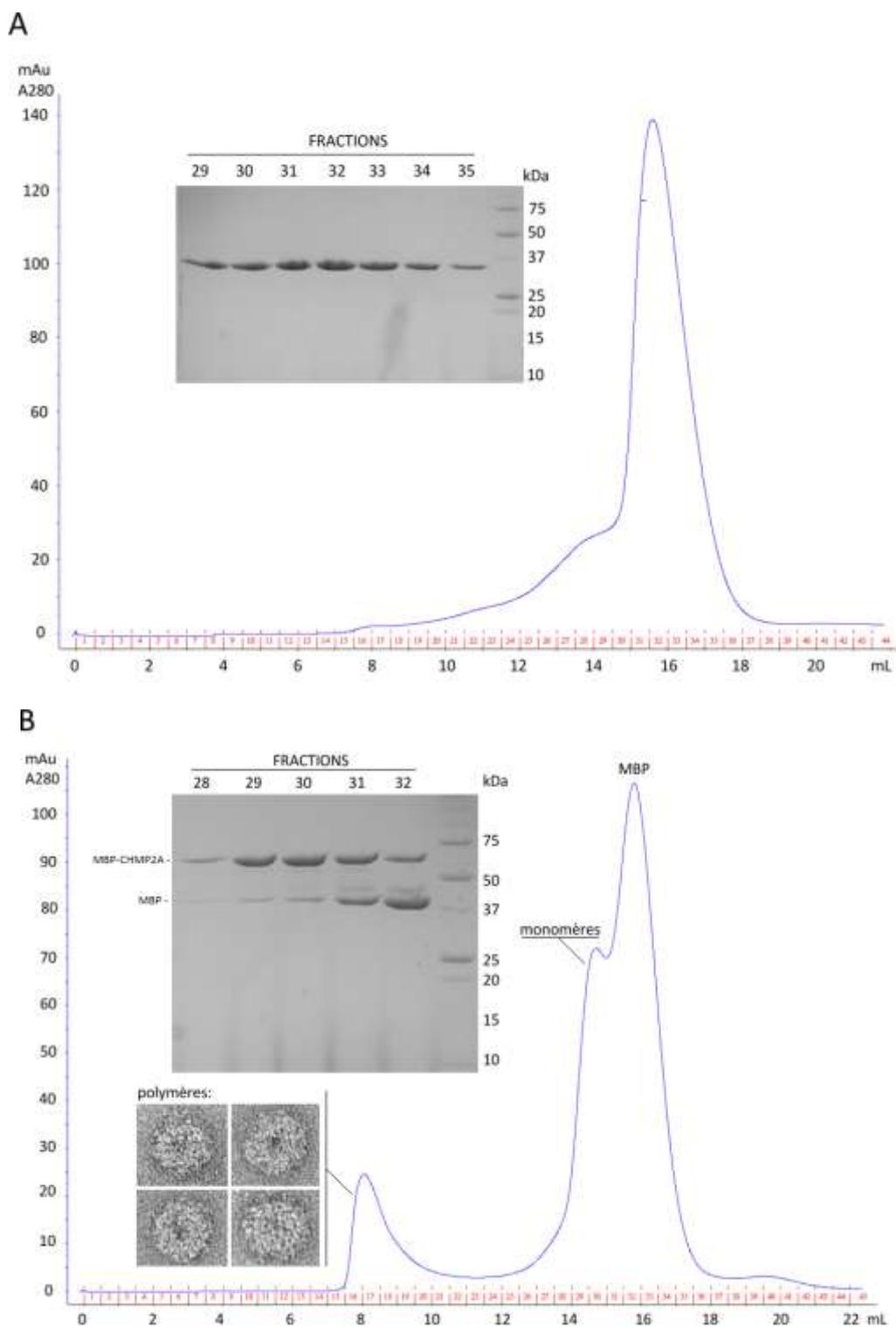


Figure 14 : Profils de chromatographie d'exclusion de taille des protéines CHMP3 et MBP-CHMP2A sur une colonne Superdex 200. **A.** Profil d'éluion de la protéine CHMP3 (full length) et gel SDS-PAGE des fractions correspondantes. **B.** Profil d'éluion de la protéine MBP-CHMP2A (troncation C-terminale) et gel SDS-PAGE des fractions correspondantes. Le profil présente 3 pics correspondant aux homopolymères en forme d'anneaux (images de microscopie électronique), aux monomères puis à la MBP seule.

Afin de former les hétéropolymères tubulaires, entre 4 et 10 μM de monomères MBP-CHMP2A sont mis en présence d'un excès de CHMP3. La réaction de polymérisation est spontanée. En se basant sur un volume de 2L de milieu de culture pour chacune des deux protéines, on obtient entre 20 et 80 μg de polymères. Les polymères sont séparés des monomères restants par gradient de sucrose (Figure 15).

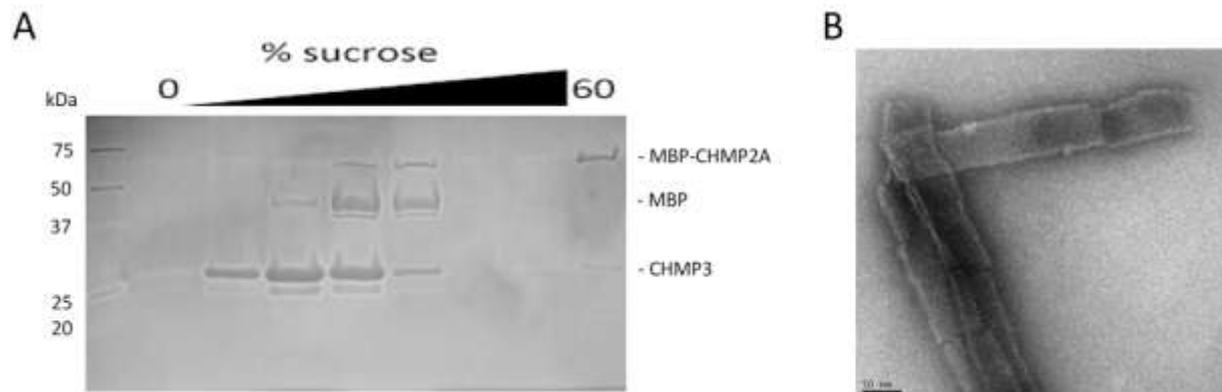


Figure 15 : Purification des polymères tubulaires MBP-CHMP2A/CHMP3. **A.** Les polymères sédimentent au fond d'un gradient de sucrose (60% sucrose), contrairement aux monomères et à la MBP. **B.** Vérification des polymères par microscopie électronique (coloration négative - barre d'échelle : 50 nm).

Ayant constaté que la concentration de départ en monomères était le facteur principal déterminant la quantité finale de polymères obtenus, j'ai optimisé ce protocole en concentrant les monomères CHMP2A et CHMP3 juste après mélange. Cette modification a permis d'obtenir plus de polymères pour la microscopie avec environ 220 μg de polymères par préparation, soit jusqu'à 10 fois plus qu'avec le protocole standard.

J'ai aussi simplifié le protocole de purification car je me suis aperçu que les grandes dimensions des polymères tubulaires (50-70 nm de diamètre ; > 100 nm de long) permettaient de les culoter avec une centrifugeuse de paillasse ($\sim 12000 \times g$). Ce faisant, on peut s'affranchir du gradient de sucrose et resuspendre les polymères dans le tampon et le volume de son choix.

Lorsque les polymères ont été visualisés par cryo-microscopie électronique, il est apparu évident que la présence de la MBP diminuait grandement le niveau de détails observable sur les polymères. En effet, la MBP se localise en surface des tubes et masque l'extérieur des polymères. La présence de MBP constitue donc un frein pour avoir une résolution suffisante lors de la détermination de la structure des polymères (Figure 16A).

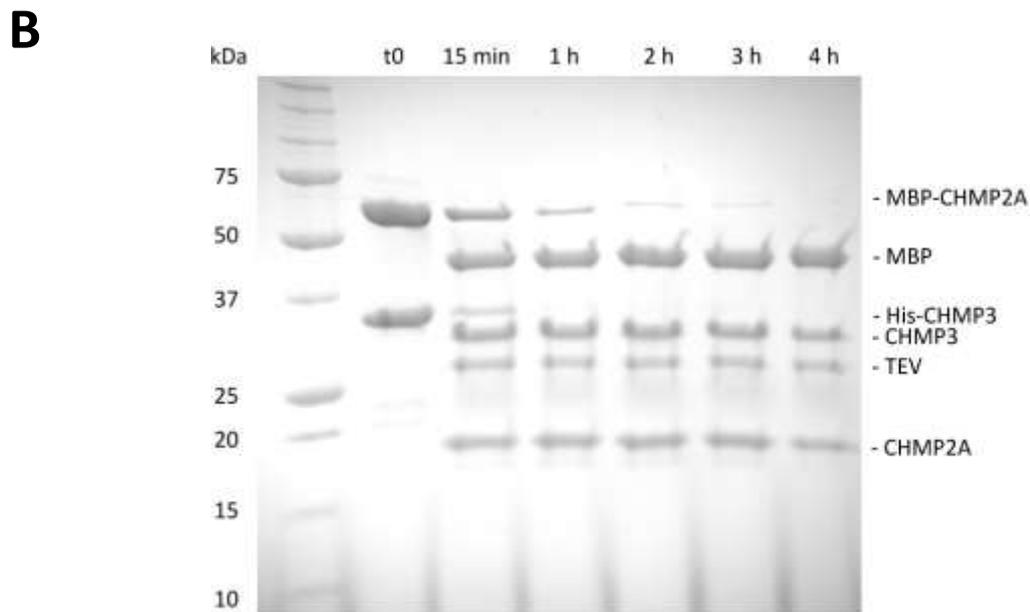
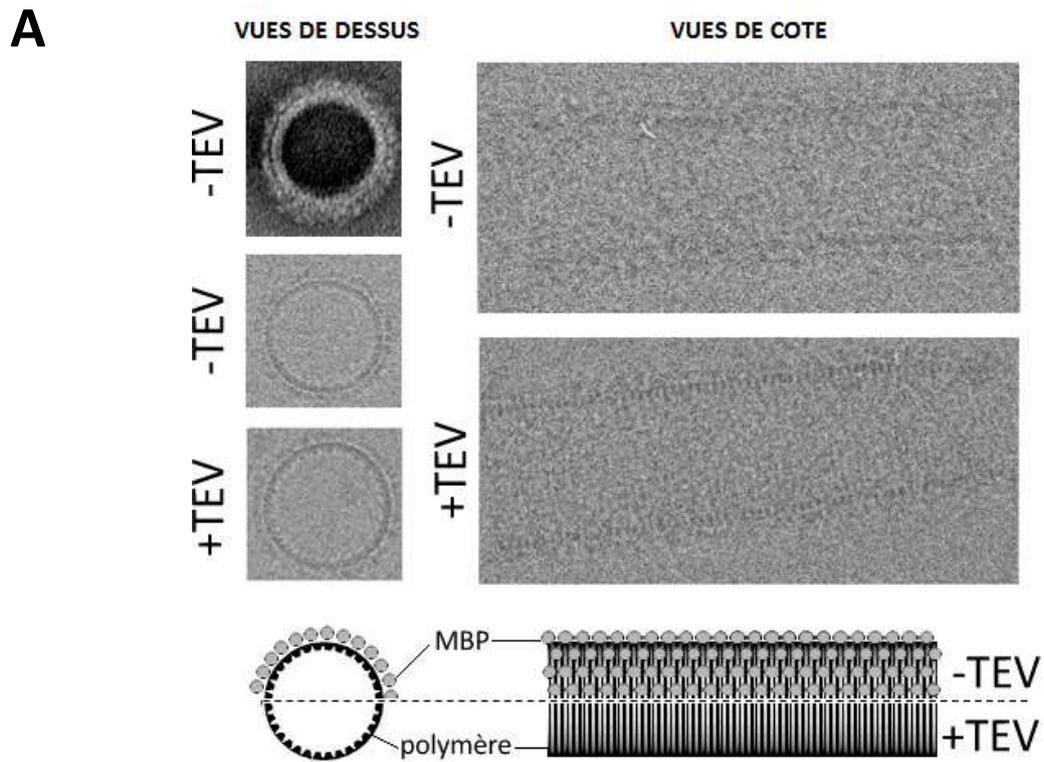


Figure 16 : Elimination de la MBP des polymères MBP-CHMP2A/CHMP3 grâce à la protéase TEV. **A.** Observation des polymères par microscopie électronique en présence et en absence de TEV. La MBP est clairement visible le long de la surface externe des polymères. **B.** Gel SDS-PAGE montrant que pour un ratio en masse de TEV de 1:5, la MBP est presque totalement clivée au bout de 4 h à température ambiante.

J'ai donc déterminé quelles quantités de protéase TEV étaient nécessaires pour cliver totalement la MBP (Figure 16B). Un ratio très élevé (1:5 en masse) en protéase est nécessaire pour éliminer la MBP efficacement. Ceci s'explique par le fait que (i) l'accessibilité du site TEV est grandement limitée par la disposition compacte des MBP dans le polymère et (ii) les tubes sans MBP se regroupent rapidement entre eux au sein d'amas de tubes dont le cœur est difficilement atteignable par la TEV.

Ces conditions ont permis de générer des échantillons satisfaisants pour permettre la détermination de structure des polymères par cryo-microscopie électronique.

3.1.1.2.2. Détermination de la structure :

L'observation des polymères par cryo-microscopie électronique a permis de mettre en évidence une variabilité morphologique importante. Les images correspondant aux sections de tubes les plus régulières ont été isolées et regroupées par classes en fonction de leur diamètre (Figure 17B). Les diamètres varient entre 445 et 545 Å selon une répartition globalement gaussienne et la classe majoritaire regroupe les polymères de 485 Å de diamètre. La classification des images a permis de mettre en évidence la présence d'au moins deux sous types de polymères différents : les sections présentant un pattern de striations dit « en ligne » et les sections présentant un pattern dit « en colonnes » (Figure 17C). Ces sous types indiquent qu'il y a des structures alternatives qui coexistent au sein des polymères. De plus, on dénombre des différences au sein même des images présentant un pattern en colonne ; le nombre de colonnes pouvant varier sensiblement (de 3 à 6).

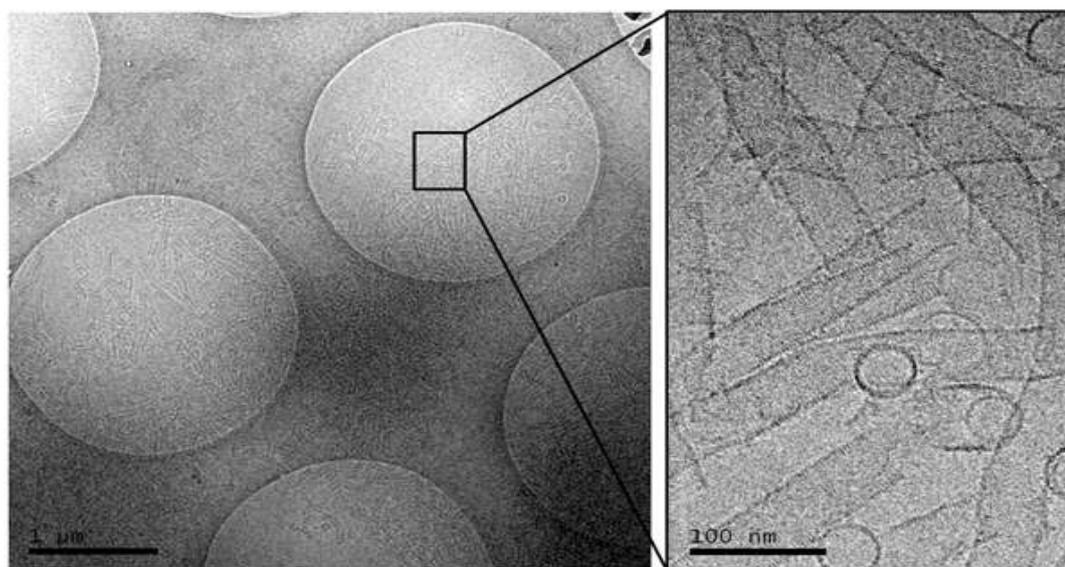
La grande variabilité morphologique observée complique énormément l'analyse d'image pour le calcul de la structure car elle impose d'effectuer un regroupement des images par patterns en plus du diamètre.

L'analyse des images moyennes indique la présence d'un pas d'hélice d'environ 30 Å et révèle que le pattern en ligne est décrit par une hélice simple alors que les patterns en colonne peuvent être décrits par plusieurs hélices (au nombre de 6 pour la classe la plus peuplée). Afin d'évaluer la pertinence de chacun des modèles, les structures tridimensionnelles correspondants aux modèles à une et six hélices ont été générés. Ces structures servent ensuite à calculer des projections en 2 dimensions qui sont comparées aux images moyennes expérimentales.

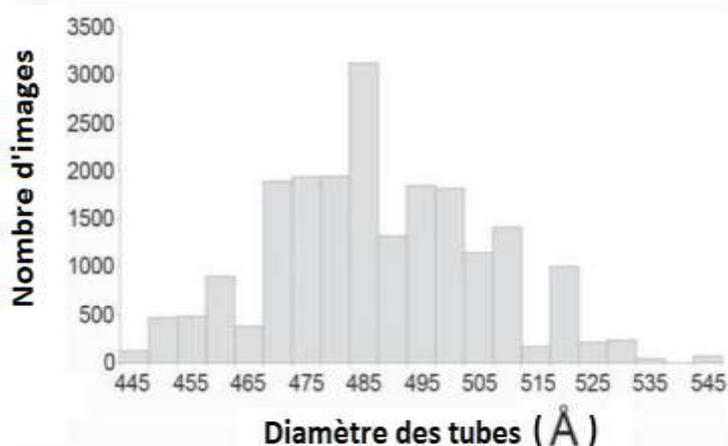
Le modèle d'hélice simple explique bien le pattern en ligne et indique là encore un pas d'hélice de l'ordre de 30 Å. Le modèle à 6 hélices indique quand à lui une bonne corrélation pour un pas de 181 Å ainsi que d'autres corrélations plus faibles pour les multiples de 30 Å.

La génération de ces modèles permet de guider la reconstruction de la structure finale. Seule la structure à six hélice a pu être déterminée, l'hélice simple n'étant pas suffisamment représentée parmi les images expérimentales. La reconstruction finale se situe à une résolution de 22,4 Å. Elle montre que la surface externe des polymères est relativement lisse. En revanche, la présence de profonds sillons entre hélices ainsi que la protrusion de chaque unité asymétrique à l'intérieur des tubes montre que la surface interne est nettement plus accidentée (Figure 18A, 18B).

A



B



C

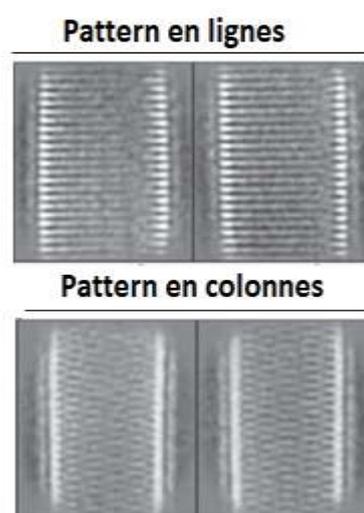


Figure 17 : Mise en évidence de la variabilité morphologique des polymères MBP-CHMP2A/CHMP3. **A.** Aperçu d'un échantillon de polymères purifiés par cryo-microscopie électronique. Panneau de gauche : visualisation d'un échantillon de polymères tubulaires déposé sur une grille de cryo-microscopie. Panneau de droite : zoom dans l'une des gouttes de tampon vitrifié contenant des polymères tubulaires **B.** Histogramme indiquant la répartition des différents diamètres de polymères parmi les images sélectionnées. **C.** Images moyennées de sections de polymères montrant clairement la présence de deux patterns différents : un pattern dit « en lignes » où les striations internes sont linéaires et un pattern dit « en colonnes » où les striations sont interrompues. Figures **B** et **C** adaptées de [160].

La résolution obtenue ne permet pas d'insérer la structure du monomère cristallographique CHMP3 de manière non ambiguë au sein de l'unité asymétrique (Figure 18C). La carte de densité indique la présence de deux interfaces : une interface au sein de chaque hélice et une interface

moins étendue entre les unités asymétriques de différentes hélices. Si l'on admet que le docking de la structure du monomère CHMP3 est correct ; chaque monomère CHMP2A ou CHMP3 est en interaction avec 4 autres monomères dans la structure (Figure 18C). La structure des polymères présentant un pattern en ligne n'a pas pu être obtenue en raison du manque d'images correspondant à ce sous-type.

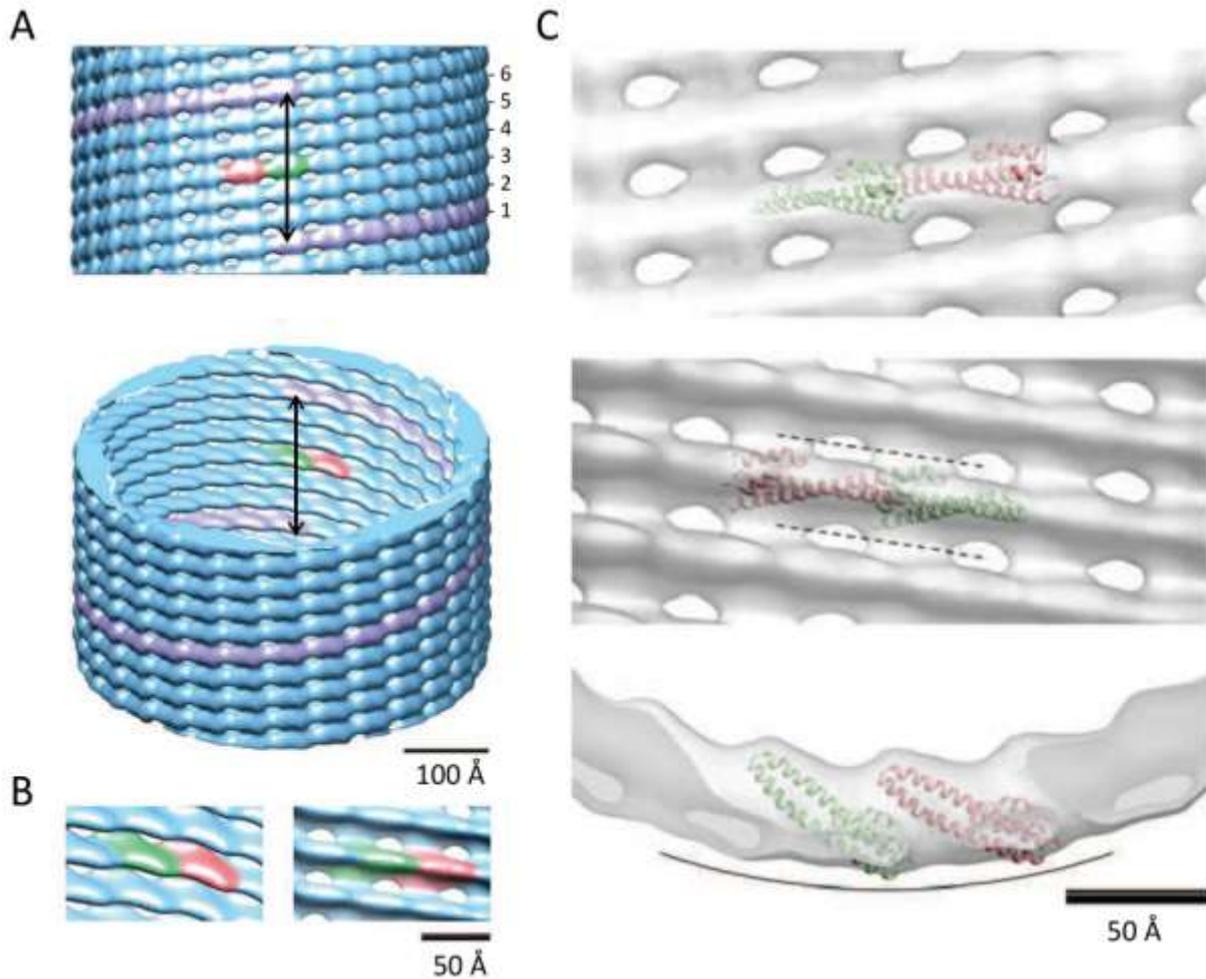


Figure 18 : Résultat de la reconstruction tridimensionnelle à 22,4 Å de résolution de la structure des polymères CHMP2A/CHMP3 (pattern en colonne à 6 hélices). **A.** Aperçu de la structure. Le pas d'une hélice (181 Å) est indiqué par la double flèche. Les 6 hélices composant le polymère sont indiquées par les chiffres à droite de la structure. Deux unités asymétriques sont colorisées en vert et en rouge. **B.** Zoom sur l'unité asymétrique (vues depuis l'intérieur du tube). **C.** Docking de la structure cristallographique du monomère CHMP3 dans l'unité asymétrique de la structure des polymères tubulaires. Panneau supérieur : vue depuis l'extérieur du tube ; panneau du milieu : vue depuis l'intérieur du tube - les pointillés tracent les sillons présents à l'intérieur de la structure ; panneau inférieur : vue de dessus - la ligne incurvée marque la zone d'interaction avec la membrane. Figure adaptée de [160].

Les homopolymères CHMP2A (Figure 14B) ont également été digérés à l'aide de la protéase TEV. Le retrait de la MBP révèle des structures filamenteuses enroulées sur elles-mêmes (Figure 19). Ces structures sont de dimension comparable aux filaments hélicoïdaux composant les tubes CHMP2A/CHMP3. Ce filament CHMP2A est large d'environ 30 Å.

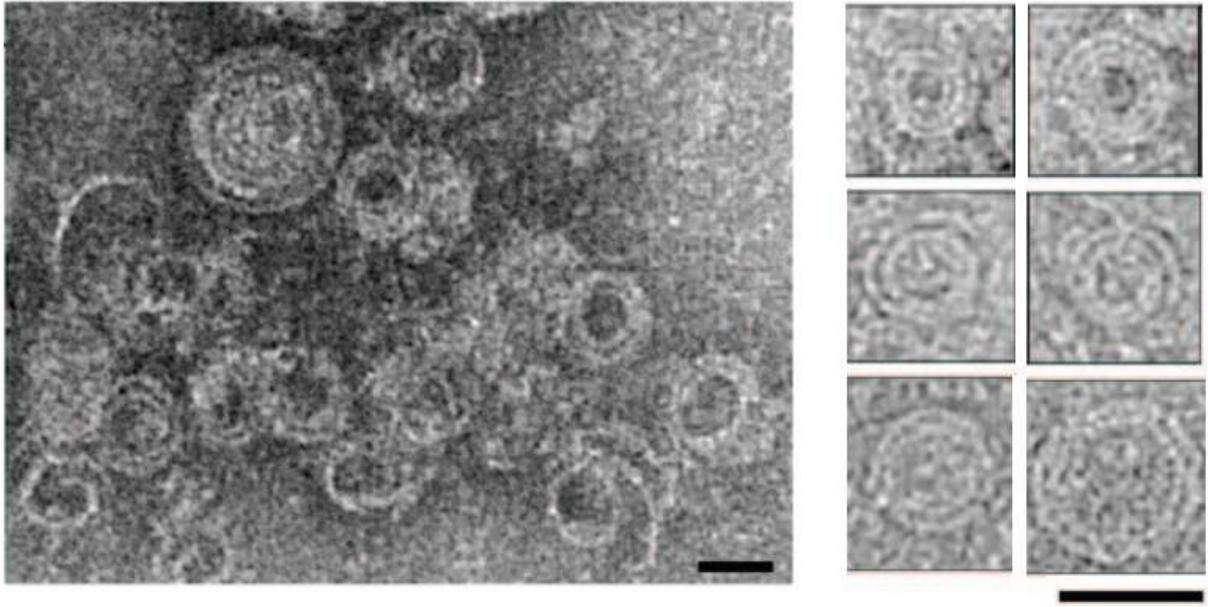


Figure 19 : Polymères CHMP2A visualisés par microscopie électronique (coloration négative). Une fois débarrassés de la MBP, les anneaux formés par MBP-CHMP2A deviennent moins compacts et se présentent sous la forme d'un filament fin, en forme de spirale, de diamètre comparable aux tubes CHMP2A/CHMP3. Echelle : 40 nm. Figure adaptée de [160].

3.1.1.3. Discussion

J'ai reproduit les hétéropolymères CHMP2A/CHMP3 puis j'ai optimisé le protocole permettant de les fabriquer afin de rendre possible l'obtention de leur structure à 22,4 Å de résolution par cryo-microscopie électronique.

Bien qu'une reconstruction très basse résolution de ces polymères ait été publiée précédemment dans le laboratoire [73], cette dernière ne permettait pas de percevoir autant de détails en surface des tubes. De plus, nous montrons ici que ces polymères sont représentés par un ensemble de structures hélicoïdales distinctes et qu'elles ne sont pas seulement issues d'un mode unique d'assemblage. Cette plasticité est sans doute un prérequis pour constituer des structures coniques dont la valeur du pas change à chaque tour d'hélice.

La reconstruction de structure révèle une surface externe des polymères relativement lisse et une surface interne irrégulière. Cette différence marquée peut assez bien s'expliquer si l'on considère que la surface externe des tubes doit interagir avec les membranes lipidiques d'une part et que la surface interne est impliquée dans le recrutement de partenaires protéiques d'autre part. Une surface lisse garanti une aire de contact maximale avec la membrane lipidique. A l'inverse, la présence d'une surface accidentée peut favoriser l'arrimage d'interacteurs en créant des cavités reconnues spécifiquement, come cela a été montré pour VPS4 [73].

Le docking de CHMP3 prédit que la partie à l'extérieur de la structure correspond aux résidus impliqués dans le ciblage à la membrane et que les résidus identifiées comme jouant un rôle dans la polymérisation se trouvent à l'interface avec le monomère suivant (voir Figure 7D et Figure 18C). Ce

positionnement des monomères dans la structure est donc en accord avec les données de mutagenèse disponibles sur les protéines CHMP [22].

Cependant, bien que la forme de la densité correspondant à l'unité asymétrique dans la reconstruction corresponde bien à la forme de l'enveloppe du monomère CHMP3, ce dernier ne remplit pas totalement l'unité asymétrique. La densité est également trop petite pour accueillir un dimère. Les espaces qui ne sont pas comblés par le monomère ne peuvent pas non plus être expliqués par la queue C-terminale des protéines CHMP car elle n'est pas requise pour la formation de polymères avec CHMP3 et elle n'est pas présente dans la construction CHMP2A utilisée. Par conséquent, il est très probable qu'une conformation différente du monomère soit présente dans le polymère. La densité de l'unité asymétrique comprend vraisemblablement une partie de chacun des deux monomères organisés dans une conformation spécifique.

Les polymères CHMP2A présentent de grandes similarités avec le filament hélicoïdal constituant les hétéropolymères CHMP2A/CHMP3. La largeur de ces filaments est très proche de ceux observés dans la structure des polymères tubulaires (Figure 18C), et possiblement des polymères CHMP4B et CHMP2B [75], [81]. Ces similarités suggèrent que toutes les protéines ESCRT-III partagent le même mécanisme global d'assemblage.

3.1.2. Propriétés biochimiques des polymères CHMP2A/CHMP3

3.1.2.1. Introduction

Les polymères CHMP2A/CHMP3 peuvent spontanément former des polymères qui nécessitent l'apport d'énergie (grâce à l'ATPase VPS4) pour être désassemblés [73]. Ces observations suggèrent que les polymères sont beaucoup plus stables que les monomères.

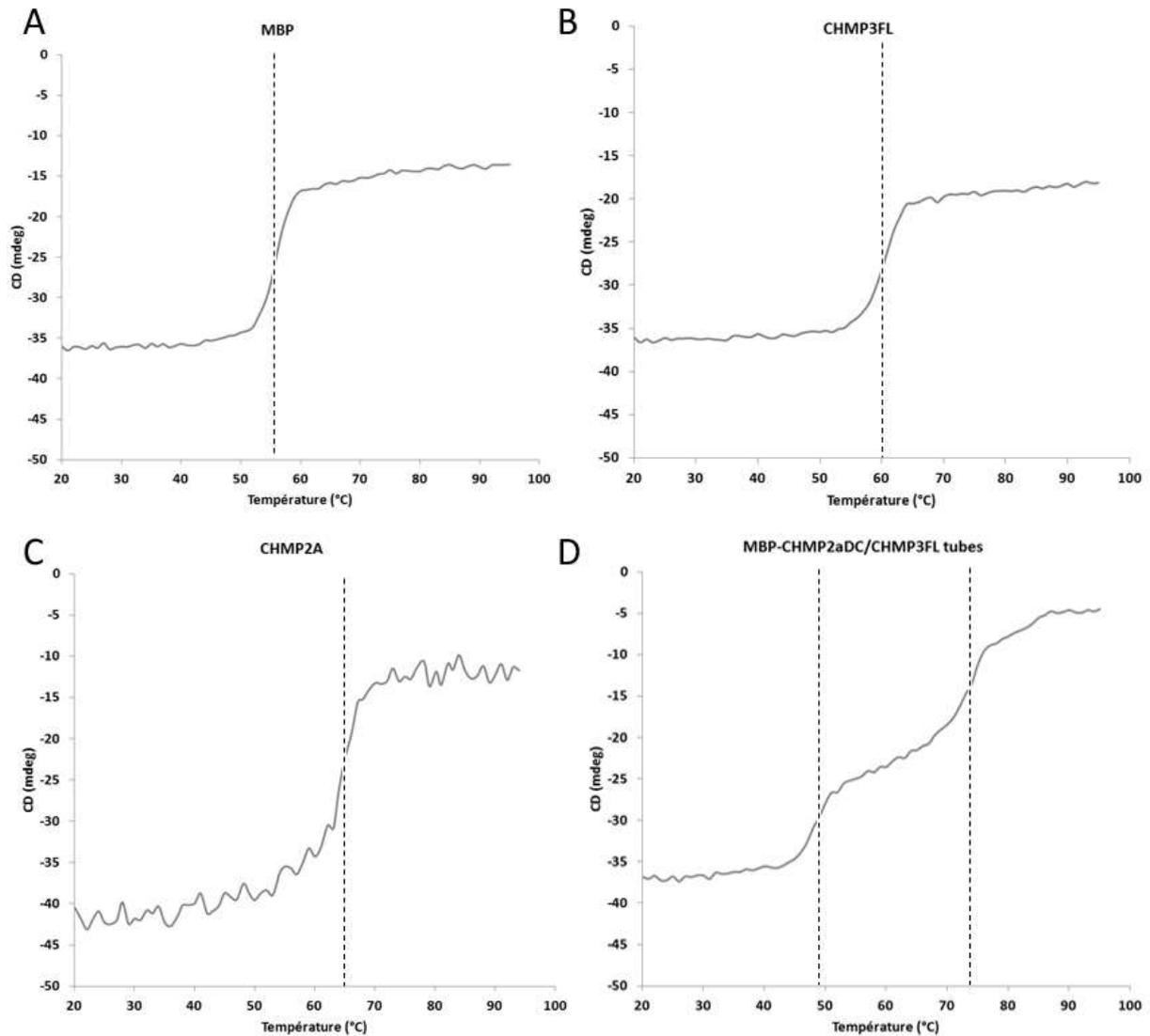
De plus, bien qu'une interaction entre les polymères et les lipides ait été mise en évidence [73], il n'existe pas de données montrant clairement une activité de fusion/remodelage des membranes par les polymères.

Mon travail a consisté à évaluer la stabilité des polymères ainsi qu'à déterminer s'ils étaient capables de remodeler des structures membranaires.

3.1.2.2. Résultats

3.1.2.2.1. Stabilité des polymères :

Afin d'évaluer l'effet de la polymérisation sur la stabilité des protéines CHMP2A et CHMP3 ; j'ai purifié chacune de ces deux protéines puis j'ai enregistré des profils de dénaturation par dichroïsme circulaire pour les monomères et les polymères (Figure 20). Les monomères CHMP2A et CHMP3 affichent une température de dénaturation de 60°C et 65°C respectivement (Figures 20B et 20C). La courbe de dénaturation des polymères présente deux phases de transition : une première phase à environ 50°C et une seconde phase vers 74°C (Figure 20D). La première phase correspond à la dénaturation de la MBP comme le montre le profil de dénaturation de la MBP seule (Figure 20A). Ainsi, la courbe de dénaturation des tubes clivés n'affiche plus cette première transition et indique une dénaturation aux alentours de 70°C (Figure 20E).



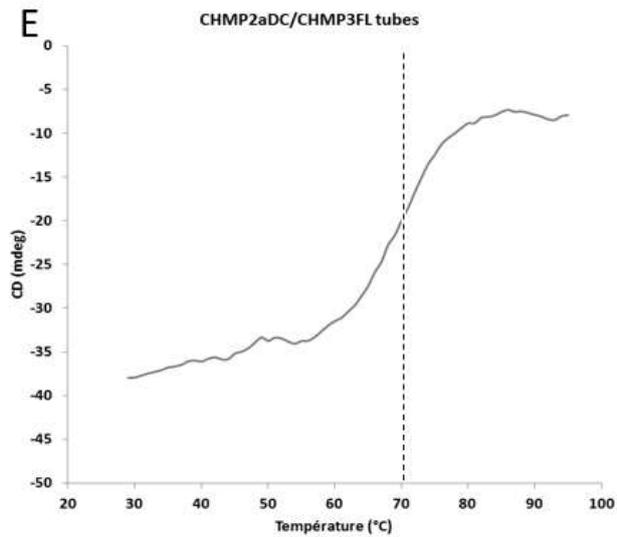


Figure 20 : Profils de dénaturation obtenus par dichroïsme circulaire.

Températures de dénaturation :

- A. MBP : 55°C
- B. CHMP3 : 60°C
- C. MBP-CHMP2A : 65°C
- D. MBP-CHMP2A/CHMP3 : 49°C ; 74°C
- E. CHMP2A/CHMP3 : 70°C

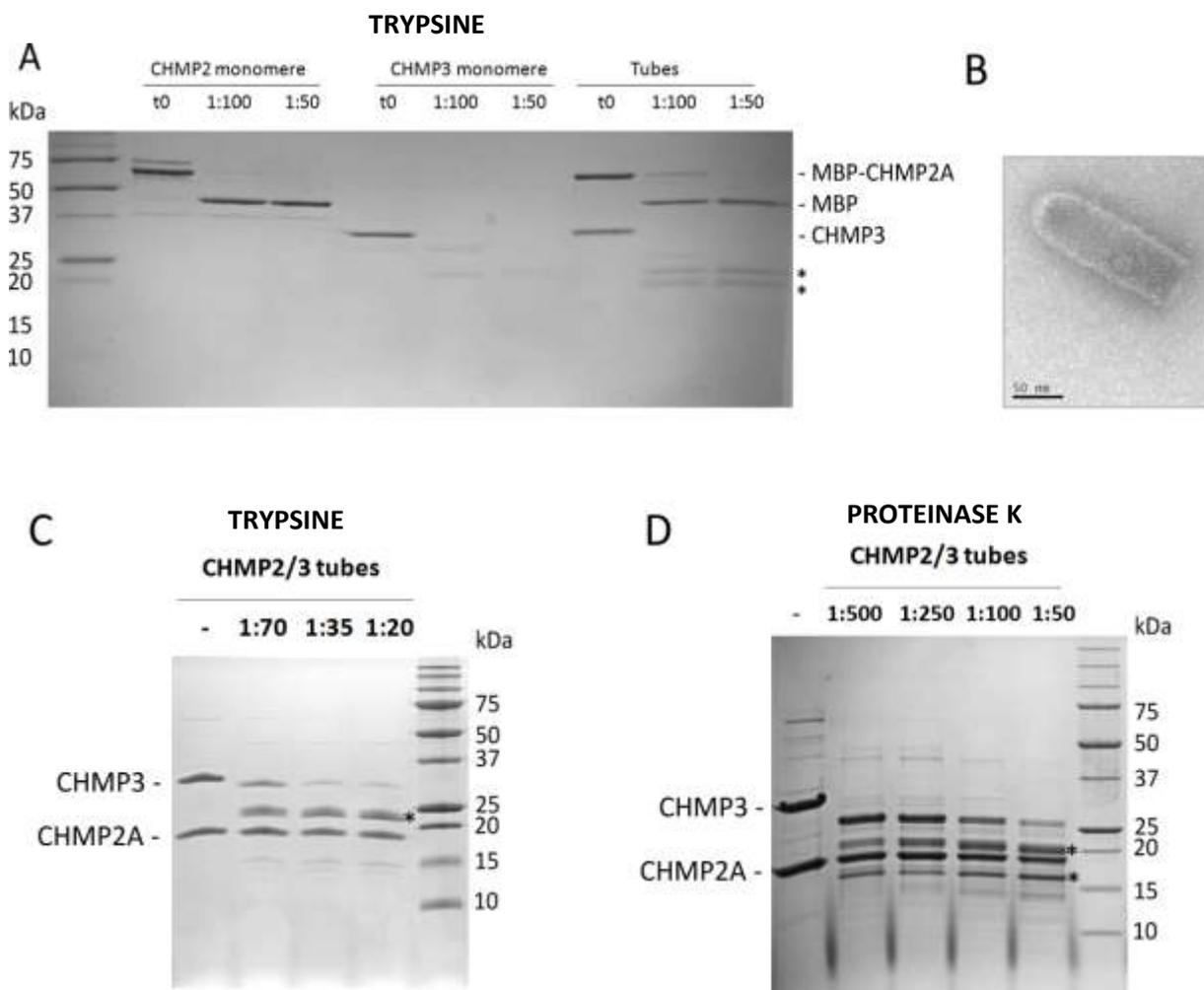


Figure 21 : Protéolyse limitée sur les monomères CHMP2A/CHMP3 et leurs polymères. **A.** Deux ratios (en masse) de trypsine sont testés sur les monomères et les polymères (tubes) durant 1h à température ambiante. On observe la persistance de deux bandes (astérisques) pour les polymères uniquement **B.** Image de microscopie électronique (coloration négative) montrant que des tubes sont toujours présents dans l'échantillon contenant 1:50 de trypsine. **C et D.** Protéolyse limitée sur les tubes clivés. CHMP2A reste in affectée par la présence de

protéase. Les fragments stables de CHMP3 (**C.** : résidus 12-164 et **D.** : résidus 11-187 et 6-172) sont marqués par des astérisques.

Pour confirmer cette différence de stabilité marquée entre les monomères et les polymères, des tests de résistance aux protéases ont été conduits. Pour cela, j'ai exposé les protéines à différents ratios en protéases afin d'estimer à partir de quelles quantités de protéases chacune des protéines est dégradée (Figure 21).

Contrairement aux monomères, les polymères MBP-CHMP2A/CHMP3 sont capables de résister à la présence de trypsine (Figures 21A, 21B). La protéolyse des polymères débarrassés de la MBP montre que CHMP2A reste complètement résistante aux protéases alors que CHMP3 forme un fragment stable légèrement supérieur à 20 kDa ainsi qu'un fragment entre 15 et 20 kDa (Figures 21C et 21D). L'analyse de ces deux fragments par spectrométrie de masse indique qu'ils correspondent aux hélices $\alpha 1$ à $\alpha 5$ (11-187/6-172) et $\alpha 1$ à $\alpha 4$ (12-164).

3.1.2.2.2. Propriétés optiques :

Les polymères tubulaires sont vraisemblablement formés par une alternance entre les deux protéines CHMP2A et CHMP3. Ceci impose que le ratio entre les deux protéines est de 1:1 dans le polymère. Afin de déterminer précisément la concentration des polymères purifiés en solution, j'ai adapté la formule suivante qui relie l'absorbance à 280 nm à la concentration:

$$Abs_{280} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

L'absorbance mesurée est la résultante des absorbances cumulées de CHMP2A et CHMP3 soit :

$$Abs_{\text{polymères}} = Abs_{\text{CHMP2A}} + Abs_{\text{CHMP3}}$$

c'est-à-dire :

$$Abs_{\text{polymères}} = \epsilon_{\text{CHMP2A}} \cdot l \cdot C_{\text{CHMP2A}} + \epsilon_{\text{CHMP3}} \cdot l \cdot C_{\text{CHMP3}}$$

avec un ratio 1:1 on a : $C_{\text{CHMP2A}} = C_{\text{CHMP3}} = x$

et donc :

$$Abs_{\text{polymères}} = \epsilon_{\text{CHMP2A}} \cdot l \cdot x + \epsilon_{\text{CHMP3}} \cdot l \cdot x$$

$$Abs_{\text{polymères}} = ((\epsilon_{\text{CHMP2A}} + \epsilon_{\text{CHMP3}})l)x$$

et la concentration en polymère est égale à $2x$.

Lorsque j'ai appliqué cette formule pour déterminer la concentration en polymères natifs, je me suis aperçu que les valeurs obtenues ne correspondaient pas aux quantités réelles en polymères. De plus, tous les échantillons présentaient des taux apparents d'ADN anormaux (mesurés à 260 nm). Le tableau 1 montre qu'il n'y a en fait pas d'ADN dans les échantillons car la formule reste correcte lorsqu'on mesure la concentration sur des polymères dénaturés (le ratio Abs_{280}/Abs_{260} revient à une valeur acceptable). Il y a donc un effet hyperchrome propre aux polymères qui est confirmé par les

mesures à 280 et 260 nm (Tableau 1). Ce phénomène a été observé pour les polymères formés par CHMP2A/CHMP3 et CHMP2A seule (ainsi que pour CHMP4B). Il est donc impossible d'évaluer la concentration des polymères en se basant sur l'absorbance d'un échantillon natif car (i) on surestime la concentration effective en protéine et (ii) on surestime la contamination en acides nucléiques car la valeur du ratio Abs_{280}/Abs_{260} est trop élevée. Cet effet reste spécifique des polymères car chacun des monomères MBP-CHMP2A et CHMP3 utilisés avant assemblage ne présentent pas d'hyperchromicité.

PROTEINE	Tampon	Absorbance à 280 nm	Absorbance à 260 nm	Ratio 280/260
Polymères tubulaires MBP-CHMP2A/CHMP3	HBS	0,803	0,827	1,0
	6M Guanidine HCl	0,151	0,042	3,6
Polymères en anneaux MBP-CHMP2A	HBS	0,155	0,111	1,4
	6M Guanidine HCl	0,065	0,000	+++

Tableau 1 : Illustration de l'effet hyperchrome pour les polymères CHMP2A/CHMP3 et CHMP2A. Les absorbances à 260 et 280 nm issues des mêmes échantillons de protéines ont été mesurées en condition native (HBS) et dénaturée (6M guanidine HCl). Les polymères natifs présentent des absorbances à 260 et 280 nm largement supérieures à la valeur des polymères dénaturés.

3.1.2.2.3. Remodelage des membranes lipidiques:

Afin de vérifier si les polymères tubulaires formés par CHMP2A/CHMP3 sont effectivement capables d'interagir et de déformer les membranes, j'ai coincubé les polymères avec des liposomes et observé l'échantillon à différents temps par microscopie électronique (Figure 22). L'observation du mélange de tubes débarrassés de la MBP avec les liposomes indique qu'au bout de seulement 15 min, des interactions sont clairement visibles puisque les polymères s'accumulent par paquets au niveau des liposomes. Après 30 min d'incubation, les liposomes apparaissent déchirés ou éventrés avec notamment l'apparition de structures membranaires allongées en périphérie des perforations. Vers 1 h d'incubation, les liposomes individualisés n'existent plus : on ne distingue alors que de vastes îlots de structures membranaires dans lesquels se trouvent les polymères CHMP2A/CHMP3. Enfin, après 2 h, les lipides et les polymères forment de gigantesques super-agrégats trop épais pour être visualisés en détail par coloration négative. En dehors de ces quelques agrégats massifs ; l'échantillon est parfaitement limpide à ce stade.

Un échantillon similaire contenant des polymères dont la MBP n'a pas été clivée ne présente aucun des symptômes précités. Dans cet échantillon, les polymères et les liposomes ne sont pas associés ; ils restent intacts et arrondis y compris après plusieurs heures d'incubation (Figure 22 ctrl).

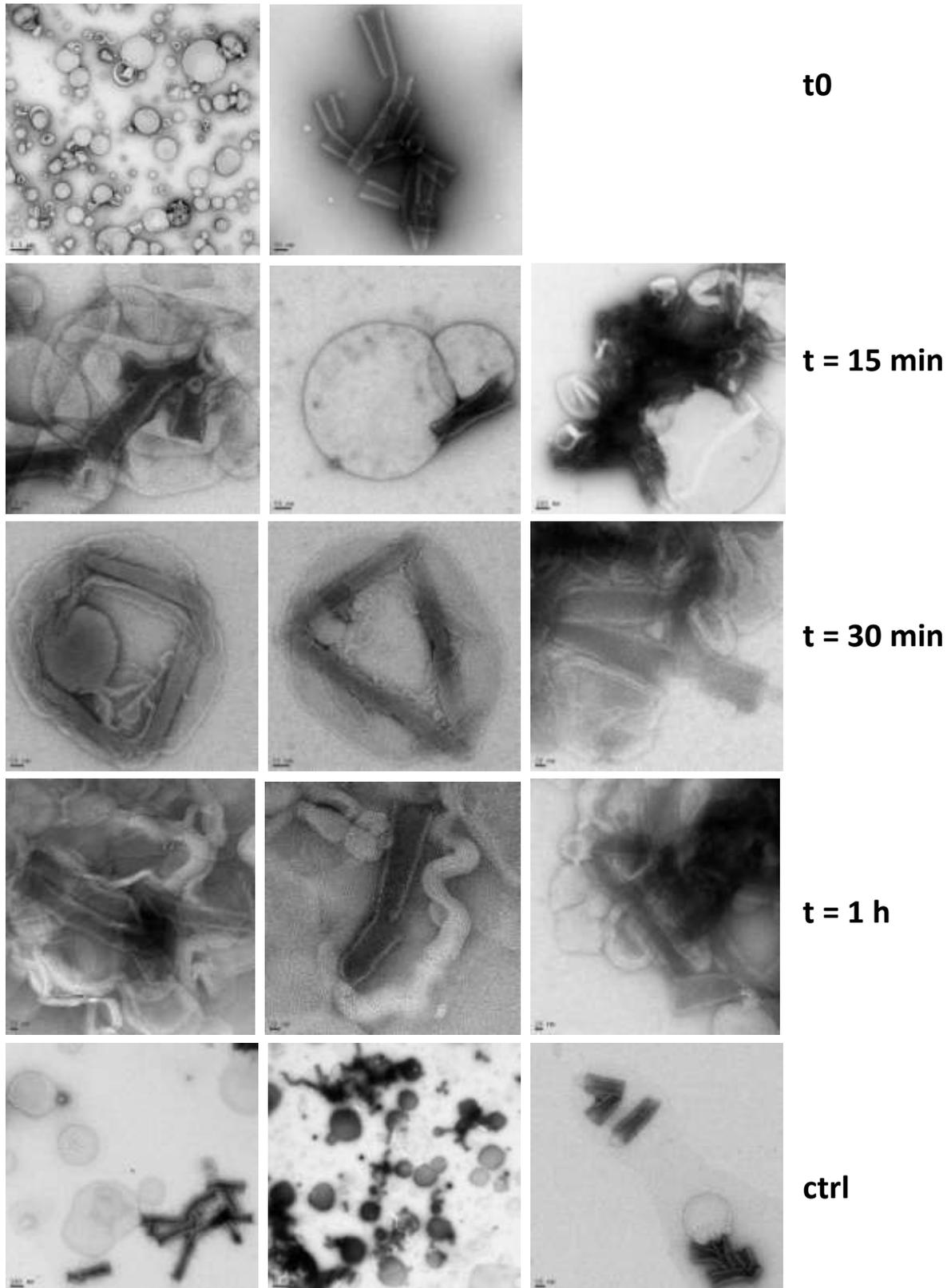


Figure 22 : Cinétique de déformation des liposomes par les polymères CHMP2A/CHMP3. Les tubes MBP-CHMP2A/CMP3 ont été incubés en présence de liposome et de la protéase TEV (afin d'éliminer la MBP - ratio en masse 1:5) puis observés par microscope électronique à t0 (liposomes et tubes avant mélange), t = 15 min, 30 min, 1 h et 2 h. L'échantillon à t = 2 h était trop agrégé pour permettre l'observation. **ctrl** : contrôle sans TEV incubé plusieurs heures.

J'ai entrepris de confirmer ces observations en réalisant un test de flottation en gradient de sucrose. Le principe de ce test repose sur le fait qu'après ultracentrifugation, les lipides chargés au départ en bas du gradient remontent dans les fractions hautes du gradient. Etant donné que les polymères CHMP2A/CHMP3, culotent normalement au fond d'un tel gradient après centrifugation, leur présence dans la fraction haute du gradient (où se trouvent les lipides) permettra de confirmer l'interaction observée précédemment. En accord avec le résultat des expériences de microscopie, le test de flottation montre qu'il existe bien une interaction spécifique entre les tubes sans MBP et les lipides (Figure 23).

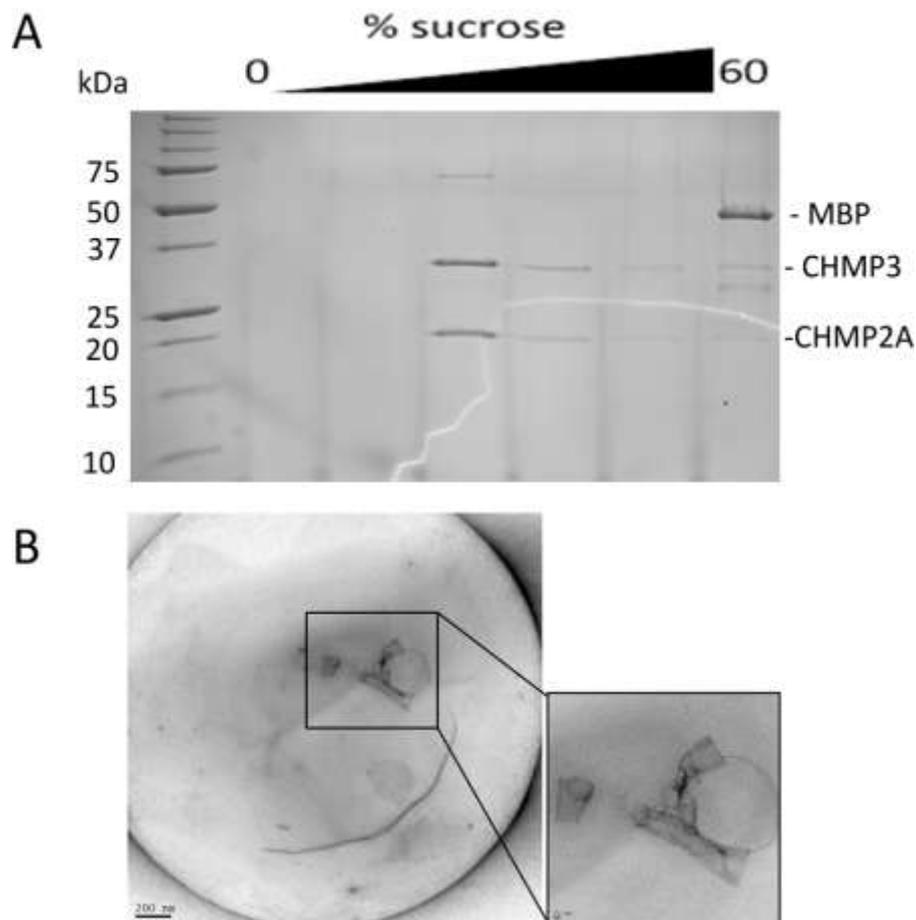


Figure 23 : Test de flottation confirmant l'interaction entre les polymères CHMP2A/CHMP3 et les liposomes. **A.** SDS-PAGE montrant le contenu du gradient. Les polymères sont localisés dans le haut du gradient avec les liposomes. **B.** Visualisation de la fraction contenant les polymères et les lipides par microscopie électronique (coloration négative) : on distingue de vastes liposomes sur lesquels des polymères sont présents.

3.1.2.3. Discussion

Lors de ce travail, j'ai mis en évidence l'exceptionnelle stabilité des polymères CHMP2A/CHMP3 ainsi que leur faculté à interagir et remodeler les membranes lipidiques.

Les expériences de dichroïsme circulaire montrent que la température de dénaturation des polymères est de 5 à 10°C plus élevée que celle des monomères CHMP2 et CHMP3 (Figure 20). La dénaturation de la MBP au sein des polymères se produit très tôt (Figure 20D). Cela peut s'expliquer par le fait que l'orientation de la protéine est fortement contrainte dans les polymères. La dénaturation initiale de la MBP ne perturbe pas la structure des tubes dont la dénaturation n'apparaît qu'aux alentours de 70°C (Figures 20D, 20E). Contrairement à la situation dans le polymère, la courbe de dénaturation de la protéine MBP-CHMP2A monomérique ne présente pas deux phases de dénaturation. Il est vraisemblable que les deux parties de la protéine se stabilisent mutuellement ce qui explique que le tout se dénature en une seule phase (Figure 20C).

Les expériences de protéolyse limitée confirment la grande stabilité des polymères CHMP2A/CHMP3. Les polymères résistent à des ratios en protéase pour lesquels les monomères sont complètement digérés (Figure 21A). Les polymères résistent à des quantités de trypsine et de protéinase K relativement élevées (Figures 21C, 21D). À en juger par l'intensité des bandes résistantes sur les gels, les deux protéines sont présentes en quantité équivalente dans les polymères protéolysés. Cette observation, ainsi que la microscopie électronique confirment que les polymères protéolysés conservent leur intégrité structurale (Figure 21B). Il est intéressant de constater que quelque soient les ratios employés, la construction CHMP2A comprenant les hélices $\alpha 1$ à $\alpha 4$ reste totalement protégée. C'est aussi le cas de CHMP3 dont le plus petit fragment stable correspond à ces quatre hélices N-terminales. Cela est en accord avec le modèle de polymérisation qui stipule que les motifs en C-terminal chargés du recrutement de VPS4 sont accessibles et les parties N-terminales sont impliquées dans la formation de polymères [73], [22]. Le fait que les parties N-terminales de CHMP2A et CHMP3 soient complètement inaccessibles aux protéases met en évidence que les polymères correspondent à des structures très compactes et souligne que les interfaces d'interaction entre les protéines doivent être assez étendues. Cette dernière observation est d'ailleurs confirmée par la structure obtenue par cryo-microscopie électronique (Figure 18).

L'effet hyperchrome des polymères est un phénomène intéressant car en étant quantifié plus précisément, il pourrait être mis à profit pour enregistrer la cinétique de polymérisation des protéines CHMP en temps réel. Dans l'ADN, l'effet hyperchrome intervenant lors de la séparation des brins est bien documenté. Pour les polymères CHMP, cet effet est peut être provoqué par un arrangement particulier des acides aminés aromatiques dans la structure et/ou par la nature de leur environnement chimique immédiat. Il peut également être simplement dû à une augmentation de la turbidité du milieu lors de la formation de structures polymériques.

Dans le modèle attribuant la fission membranaire aux polymères en forme de dôme formés par CHMP2A/CHMP3, la surface d'interaction avec la membrane est localisée à l'extérieur des polymères [82]. À ce titre, la MBP offre un contrôle négatif idéal puisqu'elle couvre l'extérieur des tubes CHMP2A/CHMP3. Dans les expériences d'interaction avec les liposomes, seuls les polymères débarrassés de la MBP peuvent interagir avec les lipides (Figure 22). Ce résultat confirme que cette surface interagit spécifiquement et très fortement avec les lipides au point d'altérer complètement la forme des liposomes.

Quelques interactions entre les tubes MBP-CHMPA/CHMP3 et les liposomes ont tout de même été observées par microscopie électronique. Contrairement aux interactions visualisées avec les tubes sans MBP, elles se produisent toujours à l'extrémité ouverte des polymères tubulaires. Les tubes sont comme « posés » sur les liposomes perpendiculairement au plan formé par la membrane lipidique (Figure 22 ctrl). La MBP étant attachée à CHMP2A par un linker flexible, il est probable qu'à l'extrémité des polymères elle ne couvre pas totalement la surface externe et rende ainsi possible ce type d'interactions. Les lipides ne sont jamais présents à l'intérieur des tubes dans ce cas, ce qui indique que la surface interne des polymères n'est pas impliquée dans cette interaction, en accord avec le modèle.

Les tubes CHMP2A/CHMP3 sont très faciles à culoter, y compris avec une centrifugeuse de paillasse. Le fait de retrouver les polymères dans les fractions hautes du gradient de sucrose contenant les liposomes confirme donc sans ambiguïté l'interaction des tubes avec les membranes lipidiques (Figure 23). De plus, l'intégrité structurale des liposomes est totalement conservée en présence de tubes couverts de MBP alors que l'exposition de la surface prédite d'interaction avec la membrane (par élimination de la MBP) provoque (i) l'association très forte et très rapide des polymères avec les liposomes (ii) le déchirement des liposomes (iii) la fusion massives des structures lipidiques associées aux polymères (Figure 22). Les polymères sont donc capables de déformer et de faire fusionner les structures lipidiques *in vitro*.

3.1.3. Etude des interactions entre protéines CHMP par SPR

3.1.3.1. Introduction

L'ordre d'assemblage des protéines CHMP est relativement bien établi [8], en revanche il n'existe pas de données concernant les affinités impliquées dans ces interactions entre protéines CHMP. L'obtention d'une carte des affinités entre protéines CHMP peut permettre de mieux comprendre la cinétique et le mécanisme d'assemblage d'ESCRT-III.

Pour obtenir les affinités apparentes entre les protéines CHMP, j'ai utilisé la technique de résonance plasmonique de surface (SPR ou Biacore - Figure 24). Cette technique peut permettre d'obtenir le K_D et les constantes de vitesse des réactions d'association/dissociation. Elle peut aussi permettre d'obtenir des détails sur le mécanisme d'association dans certains cas.

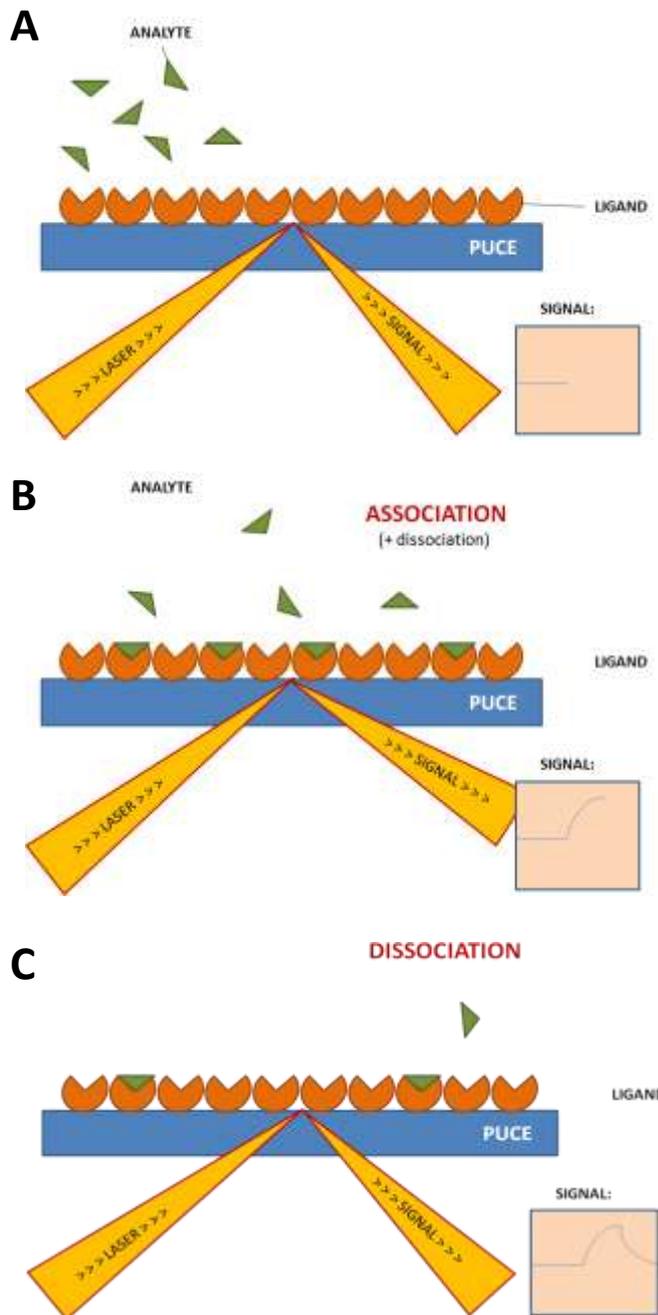


Figure 24 : Schéma illustrant le principe de la technique SPR. Le dispositif comporte une puce soumise à un flux continu de tampon sur laquelle est fixé un des deux partenaires protéiques (= ligand). L'autre partenaire protéique est injecté (= analyte) au contact de la puce. L'interaction est mesurée par le biais d'un faisceau laser qui se réfléchit en surface de la puce. L'angle de réflexion du laser change lorsque la surface est modifiée par l'interaction de l'analyte avec le ligand. **A.** Le signal enregistré reste stable tant que l'analyte n'est pas injecté ou s'il n'interagit pas avec le ligand. **B.** Pendant toute la durée de l'injection de l'analyte, l'interaction avec le ligand provoque une déviation progressive du laser (et donc une augmentation du signal) tant que l'analyte s'accumule sur la puce. **C.** En fin d'injection l'analyte se dissocie progressivement et le signal revient à sa valeur de départ.

Les courbes de SPR décrivent donc une évolution de signal (donné en unité de réponse ou « Response Units » abrégé RU) en fonction du temps (t, en secondes). Un jeu de données typique comprend plusieurs courbes issues de différentes dilutions d'analytes.

Le but de ce travail est donc d'essayer de déterminer les affinités d'interaction entre les monomères des protéines CHMP6, CHMP4B, CHMP2A et CHMP3. Pour cela j'ai purifié chacune de ces protéines et j'ai tenté d'optimiser la technique afin de mesurer des valeurs de K_D apparents qui soient fiables. Un des principaux problèmes est de s'affranchir des effets de polymérisation puisque je ne voulais quantifier que la force de l'interaction initiale entre monomères CHMP (interaction avec une stoechiométrie 1:1) sans déclencher la formation de polymères sur la puce.

3.1.3.2. Résultats

Afin d'effectuer les mesures, j'ai donc purifié CHMP6, CHMP4B, CHMP2A et CHMP3 (Figure 25) et j'ai ensuite dialysé chacune des protéines dans un tampon compatible avec la méthode SPR.

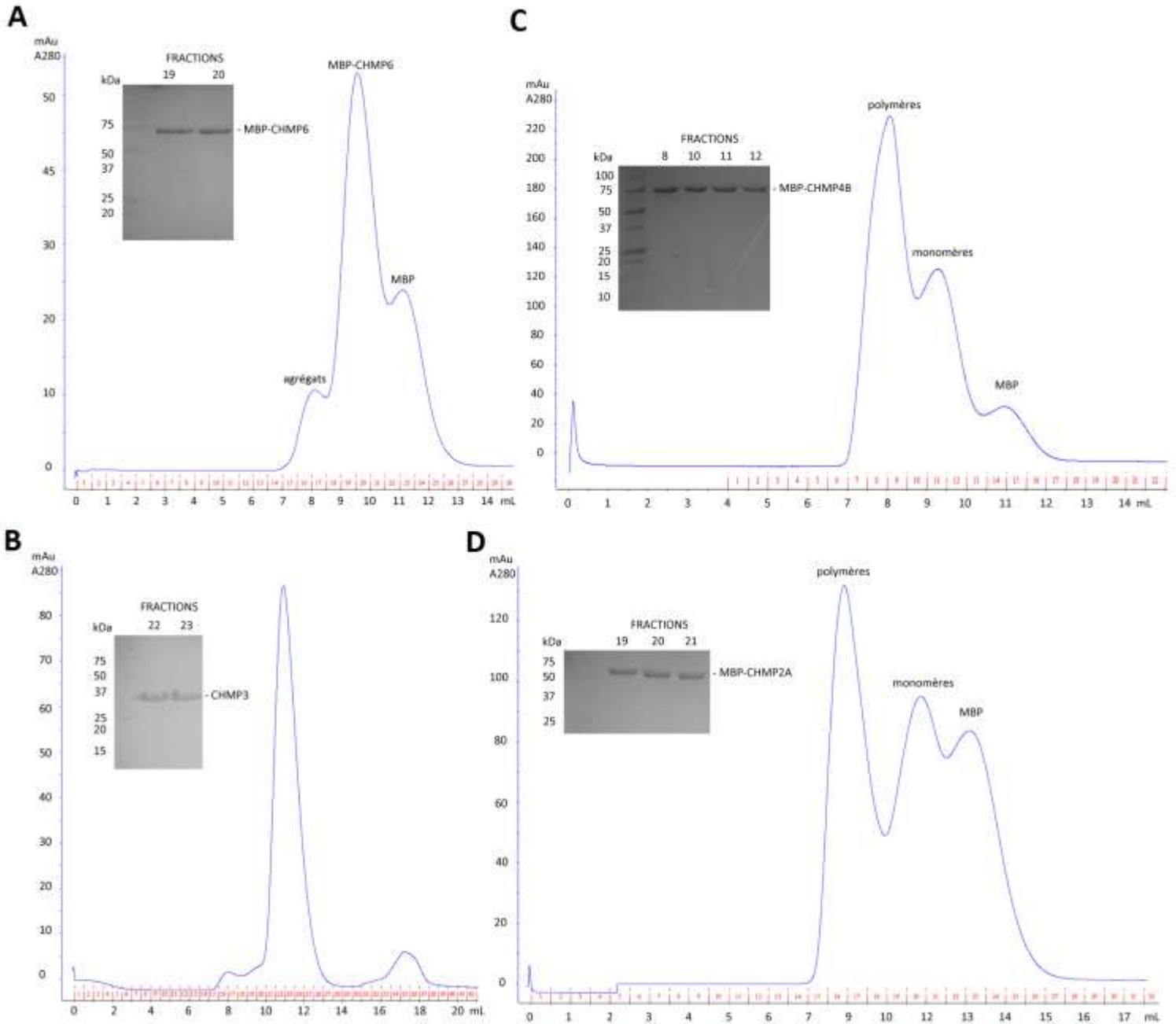


Figure 25 : Profils de purification par filtration sur gel (Superdex 75) des protéines CHMP6 (A), CHMP3 (B), CHMP2A (C) et CHMP4B (D). Seuls les monomères sont utilisés pour l'analyse par SPR.

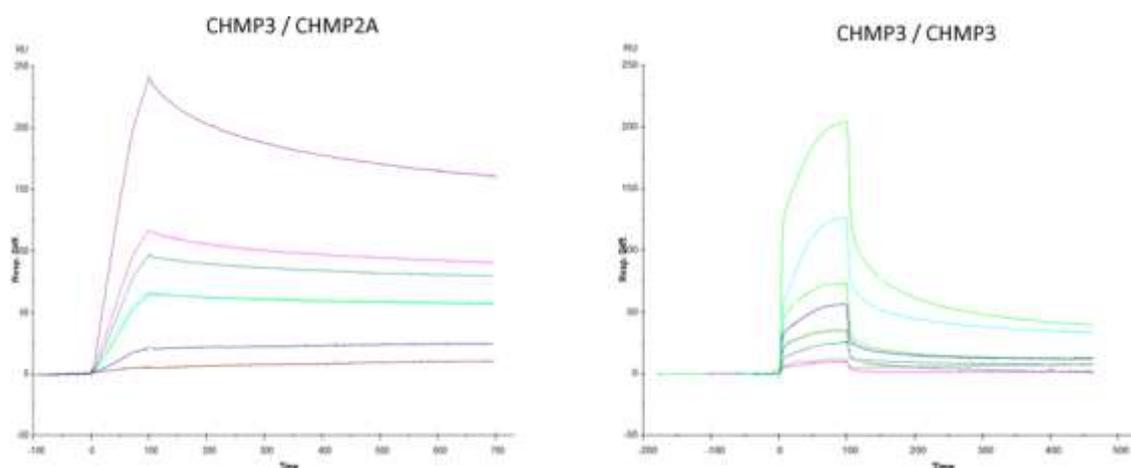
3.1.3.2.1. Analyse cinétique :

L'analyse cinétique permet d'accéder au plus grand nombre de paramètres : en plus de fournir le K_D , elle donne accès aux constantes de vitesse. Etant donné que l'on cherche à éviter les phénomènes de polymérisation, il est commode d'immobiliser CHMP2A et CHMP4B. Malheureusement, CHMP2A ne supporte pas l'immobilisation et la protéine est vraisemblablement dénaturée durant le processus. Ceci m'a contraint à utiliser CHMP2A comme analyte et à fabriquer une puce avec CHMP3.

Des interactions spécifiques ont été mesurées entre les monomères des protéines CHMP6 et CHMP4B. Les protéines CHMP4B et CHMP3 interagissent entre elles, avec CHMP2A et avec elles même (Figure 26). Bien que des jeux de données aient pu être obtenus pour chaque combinaison, il s'est avéré impossible d'appliquer le modèle mathématique décrivant une interaction avec une stœchiométrie 1:1, mis à part pour le jeu de données CHMP4B / CHMP3 (Figure 26) où un K_D de 0,54 μM a pu être déterminé.

Au départ, l'enregistrement de jeux de données satisfaisants a été rendue difficile par un manque de reproductibilité des mesures. Afin d'éviter des phénomènes parasites tels que des interactions entre analytes au niveau de la puce, les données ont été enregistrées avec un flux plus important (les protéines sont en contact de la puce moins longtemps). Pour cela, toutes les protéines ont été purifiées à nouveau afin d'enregistrer ces données. Ceci a permis de générer les courbes montrées ci-dessous. Cette optimisation a permis d'obtenir une meilleure reproductibilité des mesures mais elle ne s'est toutefois pas avérée efficace pour la modélisation des données.

Compte tenu des difficultés rencontrées par l'application de l'approche cinétique, j'ai entrepris de mesurer les données à l'équilibre.



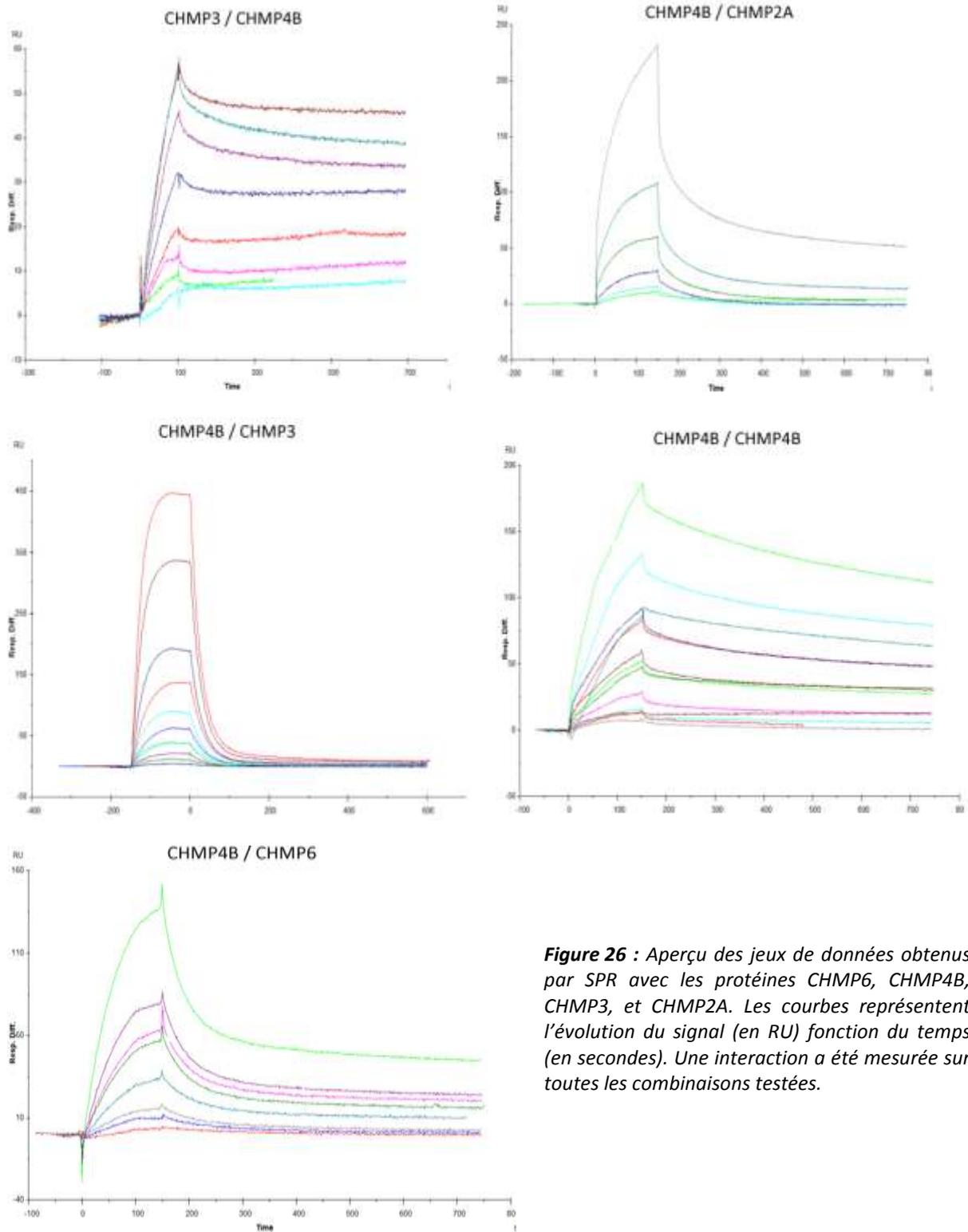


Figure 26 : Aperçu des jeux de données obtenus par SPR avec les protéines CHMP6, CHMP4B, CHMP3, et CHMP2A. Les courbes représentent l'évolution du signal (en RU) fonction du temps (en secondes). Une interaction a été mesurée sur toutes les combinaisons testées.

3.1.3.2.2. Analyse à l'équilibre :

L'analyse à l'équilibre ne permet pas d'accéder aux constantes de vitesse des réactions d'association et de dissociation. En revanche elle donne accès au K_D et elle s'avère être beaucoup plus robuste pour des systèmes délicats. Dans la pratique, on injecte l'analyte à un flux très bas et pendant une durée plus importante afin de permettre l'établissement d'un équilibre entre l'association et la dissociation de l'analyte sur la puce. L'équilibre est atteint lorsque la courbe dessine un plateau.

Si l'on considère la réaction de formation du complexe sur la puce, le signal en RU est en fait directement proportionnel à la concentration en complexe. L'établissement d'un équilibre permet de négliger les variations de concentration de l'analyte dues à l'association avec une partie du ligand. Après plusieurs optimisations, cette approche s'est finalement avérée beaucoup plus fiable que la précédente et les données enregistrées ont pu être exploitées pour la détermination d'affinités. Ces données sont correctement décrites par un modèle impliquant une stœchiométrie d'interaction de 1:1.

L'équation développée par Irving Langmuir en 1916 permet de décrire l'adsorption de molécules sur une surface. Il s'agit du modèle le plus simple pour décrire la réaction $A + B \rightleftharpoons AB$ (avec A = analyte ; B = ligand), c'est aussi le modèle qui s'applique dans la majorité des cas.

On peut écrire l'équation comme suit :

$$RU = \frac{R_{max} \cdot [A]}{[A] + K_D}$$

avec :

RU = proportionnel à la concentration en complexe $[AB]$

R_{max} = niveau de réponse maximale ; c'est-à-dire lorsque $[B] = 0$

$[A]$ = concentration en analyte ; à l'équilibre cette valeur correspond aussi à la concentration de la dilution injectée

K_D = constante de dissociation de la réaction ; il s'agit du paramètre que l'on cherche à déterminer.

Si l'on considère la réaction de formation du complexe, alors on a :

$$K_a = \frac{RU}{[A] \cdot (R_{max} - RU)}$$

où K_a = constante d'association (= $1/K_D$) et $(R_{max} - RU) = [B]$

Un des moyens les plus commodes d'analyser les données à l'équilibre est de tracer une représentation linéaire de Scatchard. Cette représentation permet de linéariser les données et de déterminer si les points expérimentaux décrivent bien le modèle (corrélation importante). La représentation de Scatchard dérive directement de l'équation précédente :

$$\frac{RU}{[A]} = -\frac{1}{K_D} \cdot RU + \frac{R_{max}}{K_D}$$

Cette représentation de type $y = a.x + b$ permet d'obtenir la valeur du K_D . L'avantage de cette méthode est qu'elle permet une visualisation simple et directe de la correspondance entre les données et le modèle. Elle permet aussi de détecter facilement la présence de plusieurs sites d'interaction.

Une seconde méthode pour représenter les données consiste à représenter le niveau de réponse à l'équilibre en fonction de la concentration de chacune des dilutions employées. Cette approche est plus précise que le graphe de Scatchard. La courbe obtenue est de forme hyperbolique et la modélisation permet de détecter la présence de plusieurs sites d'interaction ou la présence d'interactions aspécifiques.

L'équation de l'hyperbole la plus simple est de type Henri-Michaelis-Menten :

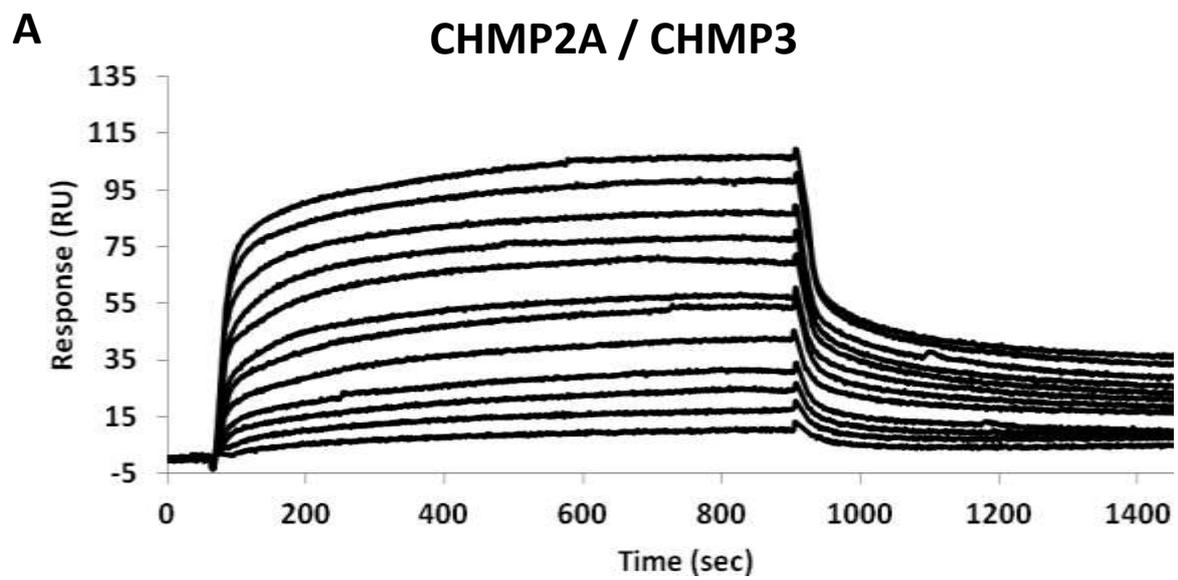
$$RU = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]}$$

Le premier jeu de données enregistré décrit l'interaction entre MBP-CHMP2A et la version full-length de CHMP3 (Figure 27). Grâce à l'utilisation d'une stratégie alternative d'immobilisation à base de streptavidine, il a été possible de fixer CHMP2A sur la puce et d'utiliser CHMP3 comme analyte.

Les courbes montrent une phase d'association rapide suivie d'une association lente jusqu'à atteindre l'équilibre. La dissociation est relativement lente (Figure 27A). La représentation de Scatchard indique une bonne corrélation avec le modèle ($R^2 = 0.969$) avec une affinité de $4,5 \mu\text{M}$. L'analyse hyperbolique donne la meilleure corrélation avec les données ($R^2 = 0.998$) pour l'équation :

$$RU = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]} + c \cdot [A]$$

L'équation de base de l'hyperbole est modifiée par le facteur $c \cdot [A]$ qui décrit l'accumulation aspécifique de CHMP3 sur la puce. Ce phénomène a été effectivement observé lors de l'enregistrement des données : les points à haute concentration sur le graphe de Scatchard dévient de la tendance linéaire. La valeur du K_D déterminée ici est de $3,24 \pm 0,25 \mu\text{M}$. Les affinités calculées par les deux méthodes indiquent donc un K_D de l'ordre du micromolaire.



B

Free CHMP3 (μM)	Bound CHMP3 (Ru)	Bound / Free ($\text{Ru} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
0.43	10.03	23.33
0.847	16.84	19.89
1.27	24.34	19.16
1.91	31.19	16.33
2.87	41.96	14.62
4.30	53.71	12.49
6.45	57.70	8.95
9.68	69.92	7.22
14.5	77.85	5.37
21.8	86.93	3.99
32.7	98.05	3.00
43	106.66	2.48

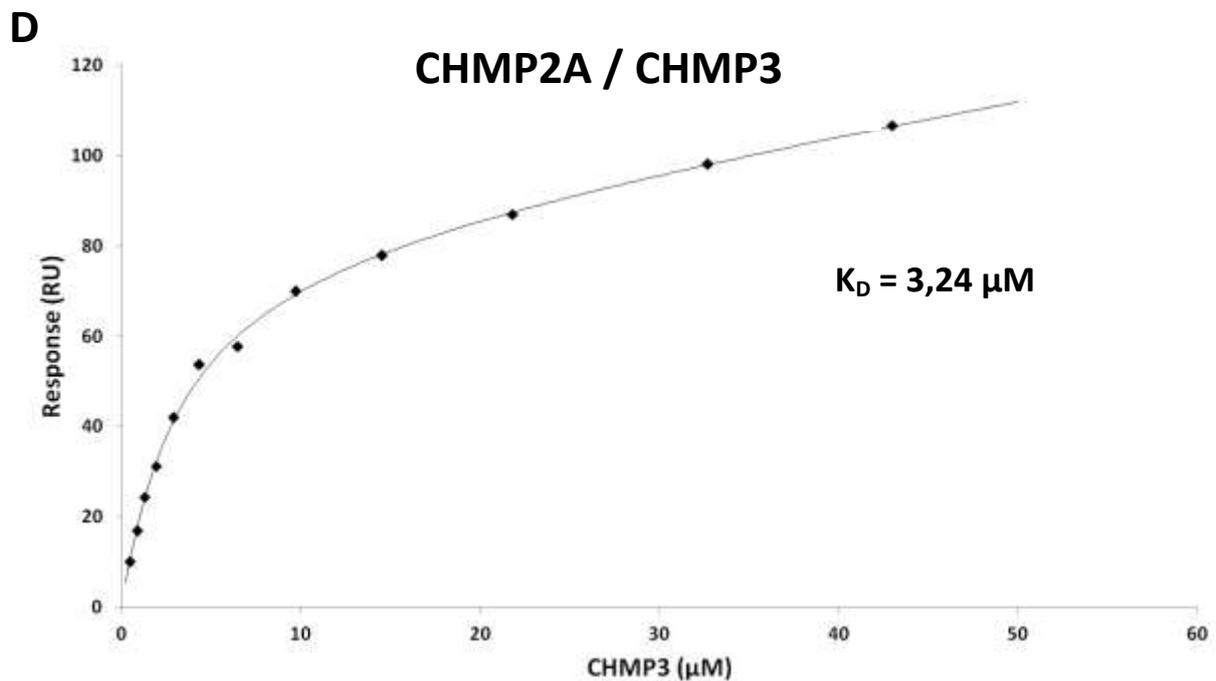
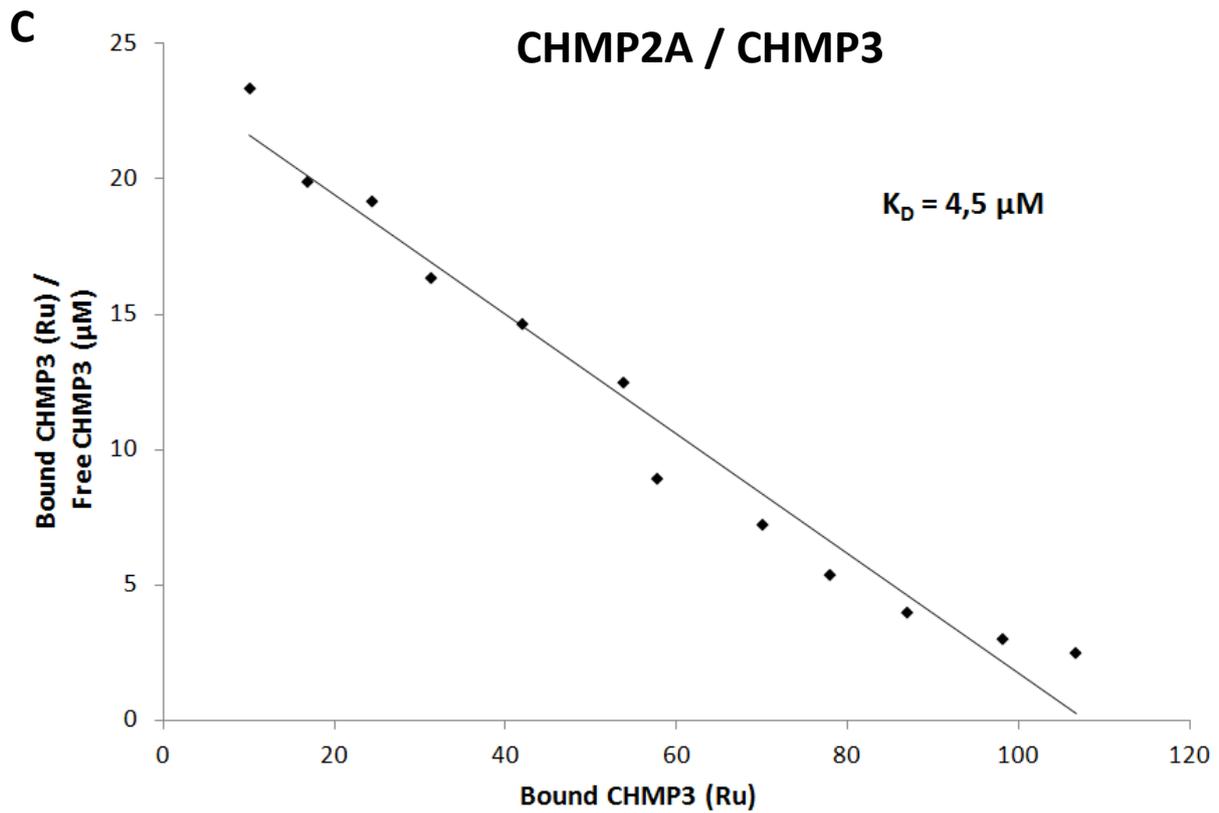
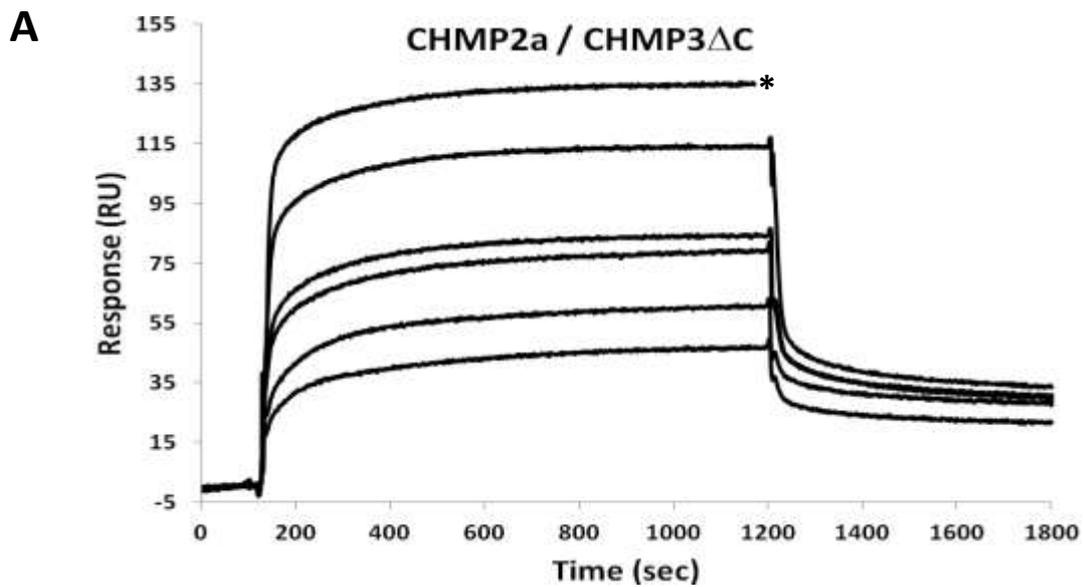


Figure 27 : Interaction entre CHMP2A (immobilisée) et CHMP3 (full-length) mesurée par SPR. **A.** Aperçu du jeu de données. **B.** Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **C.** Représentation de Scatchard. **D.** Représentation hyperbolique.

Afin d'évaluer l'influence de la délétion de la queue C-terminale de CHMP3, j'ai mesuré l'interaction entre CHMP2A et une construction CHMP3 sans queue C-terminale. Les données révèlent que la délétion de la queue C-terminale n'a pas d'influence sur l'affinité entre CHMP3 et CHMP2A (Figure 28) puisque les affinités calculées par chacune des représentations (Scatchard : $7,2 \mu\text{M}$ - $R^2 = 0,9486$; hyperbole : $3,7 \pm 1,37 \mu\text{M}$ - $R^2 = 0.9923$ - même équation que pour CHMP3 full length) sont aussi de l'ordre du micromolaire. Pour le reste des interactions, j'ai utilisé uniquement la construction CHMP3 délétée en C-terminal.



B

Free CHMP3 (μM)	Bound CHMP3 (Ru)	Bound / Free (Ru . μM^{-1})
3	46.74	15.58
4.5	60.48	13.44
6.75	78.98	11.7
10.13	84.2	8.31
22.8	114.15	5.01
34.2	134.92	3.95

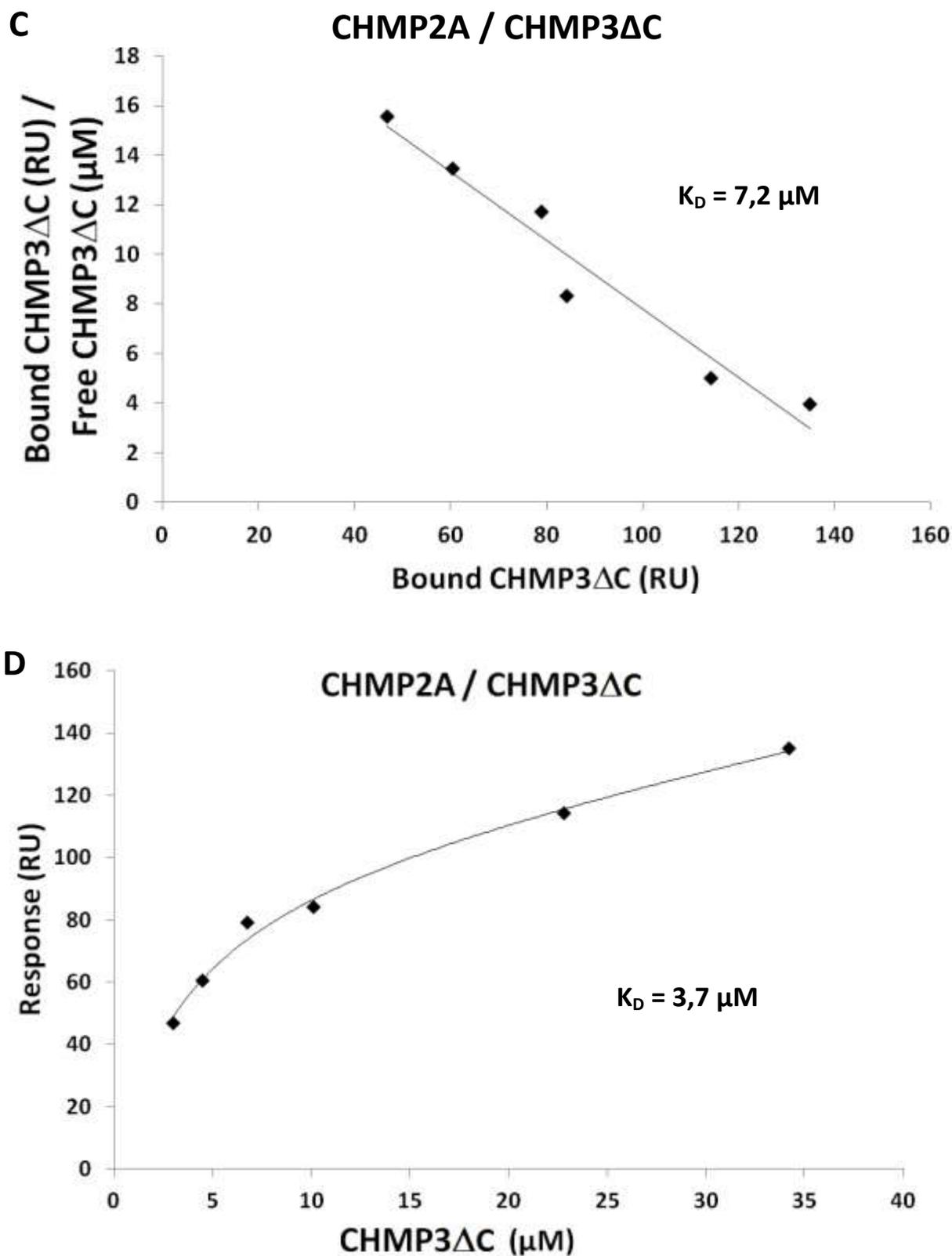
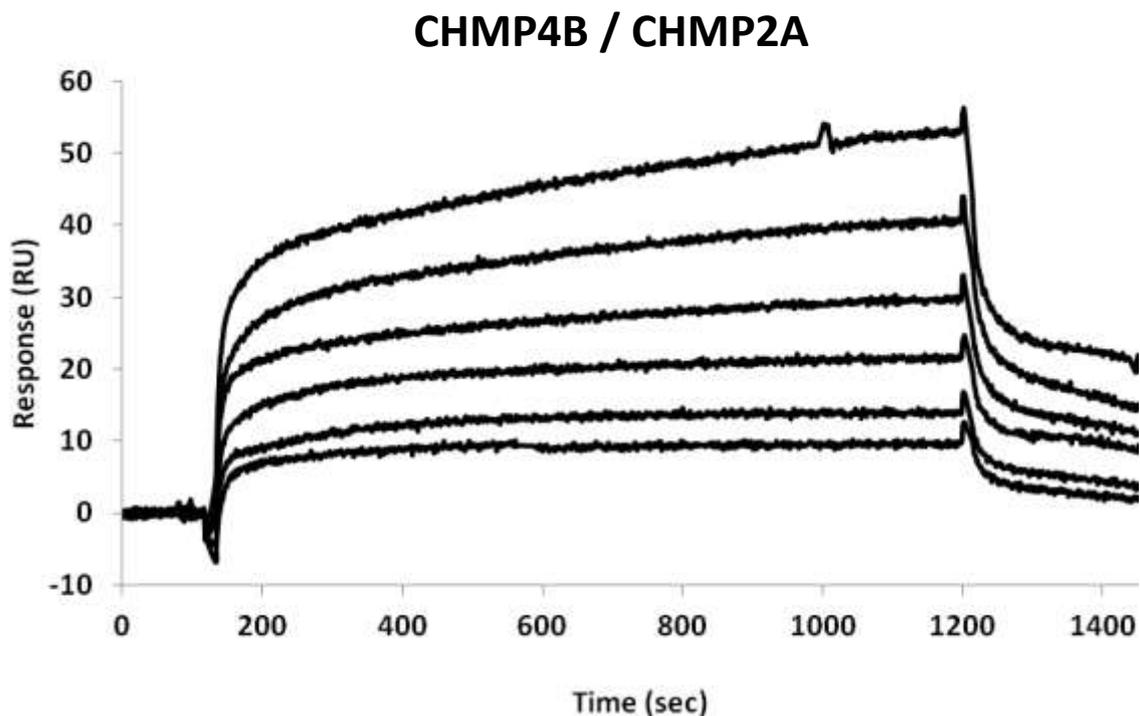


Figure 28 : Interaction entre CHMP2A (immobilisée) et CHMP3 (délétion C-terminale) mesurée par SPR. **A.** Aperçu du jeu de données. L'astérisque indique une mesure interrompue en raison d'artefacts générés par la machine. **B.** Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **C.** Représentation de Scatchard. **D.** Représentation hyperbolique.

J'ai ensuite appliqué la même stratégie pour analyser les interactions entre CHMP2A, CHMP3 et CHMP4B. Dans un premier temps, j'ai fabriqué une puce à partir des monomères CHMP4B et j'ai analysé l'interaction avec CHMP2A.

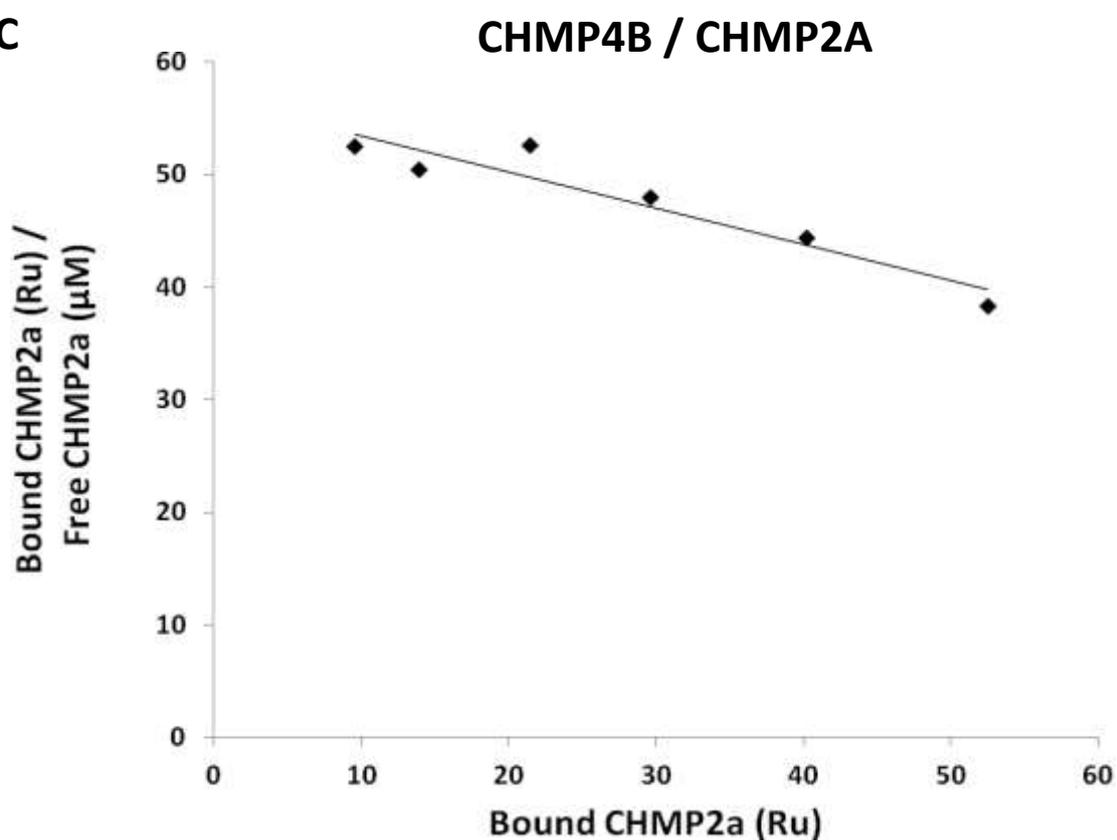
L'utilisation de CHMP2A comme analyte pose problème car il est difficile d'obtenir une reproductibilité satisfaisante avec cette protéine. Une partie des difficultés posées par CHMP2A est directement visible sur les courbes du jeu de données (Figure 29A). En effet, on observe une phase d'association rapide suivie d'une phase lente qui atteint d'autant plus difficilement un plateau que la concentration est élevée, alors que le comportement inverse est normalement attendu. Ceci explique que je n'ai pas pu collecter beaucoup de points expérimentaux (Figure 29B). Le K_D calculé est encore une fois de l'ordre du micromolaire. L'approche linéaire donne une affinité de $3.1 \mu\text{M}$ avec un coefficient de corrélation relativement faible ($R^2 = 0.901$) en raison de la relative dispersion des points expérimentaux par rapport à leur nombre. L'approche hyperbolique permet quand à elle d'obtenir une affinité de $2,42 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,999$ - là encore cette valeur est à relativiser en raison du manque de complétude du jeu de données). L'hyperbole est décrite par l'équation de type Henri-Michaelis-Menten (hyperbole simple).

A



B

Free CHMP2a (μM)	Bound CHMP2a (Ru)	Bound / Free ($\text{Ru} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
0.181	9.56	52.49
0.272	13.93	50.46
0.407	21.47	52.58
0.611	29.6	47.96
0.916	40.22	44.3
1.375	52.53	38.33

C

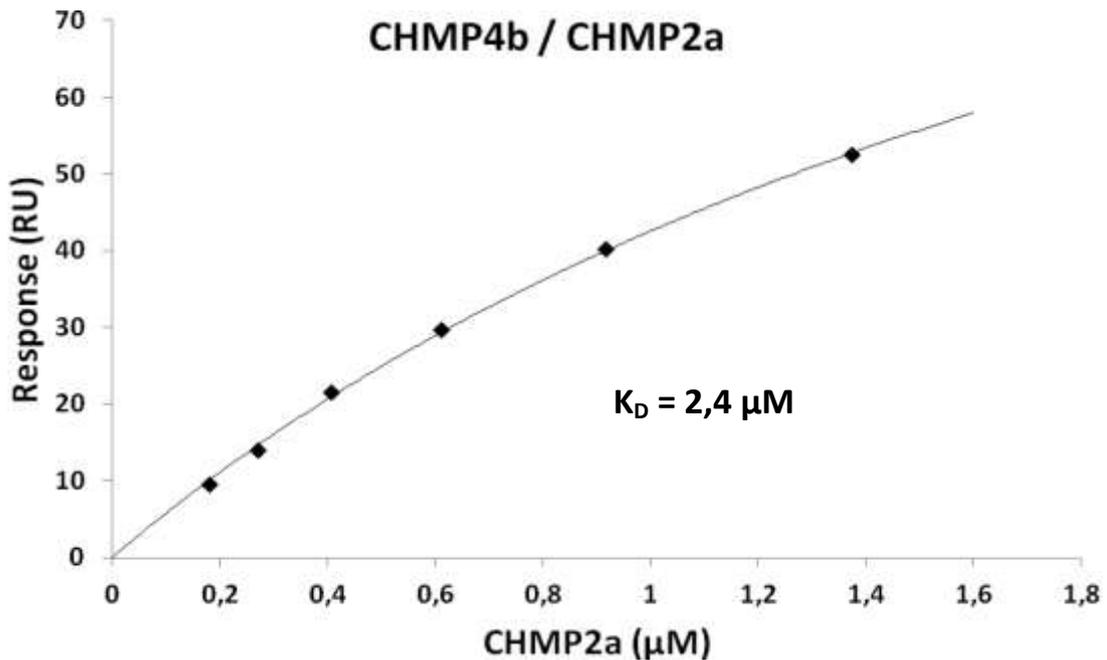
D

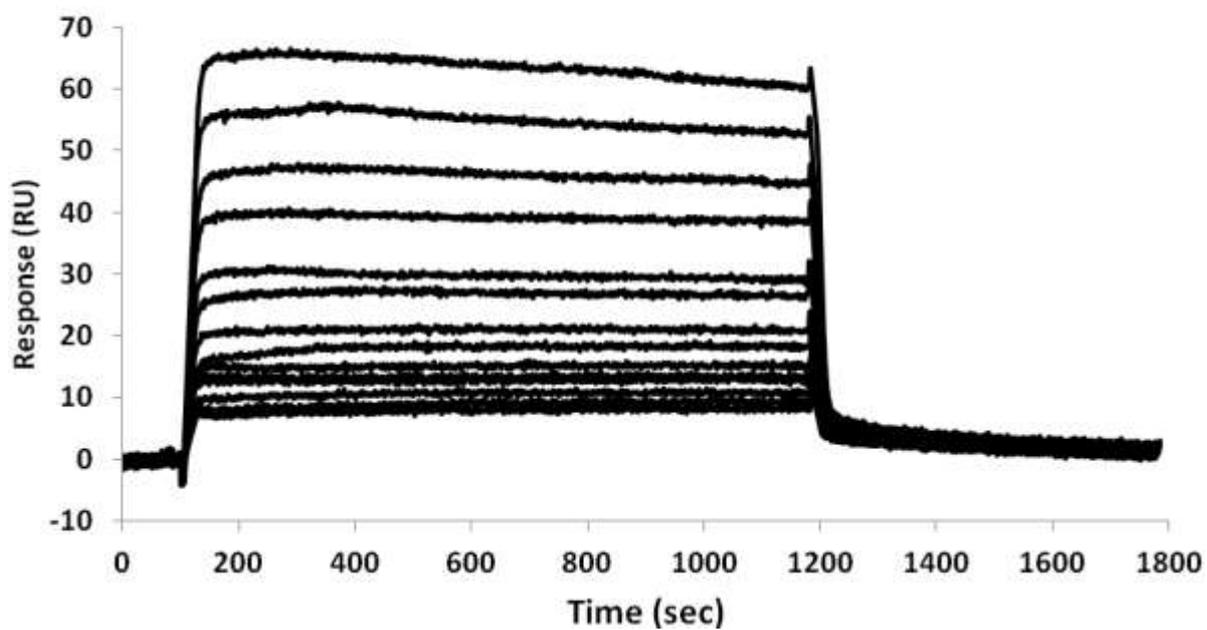
Figure 29 : Interaction entre CHMP4B (immobilisée) et CHMP2A mesurée par SPR. **A.** Aperçu du jeu de données. **B.** Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **C.** Représentation de Scatchard. **D.** Représentation hyperbolique.

L'interaction entre CHMP4B et CHMP3 (Figure 30) est caractérisée par des phases d'association/dissociation très rapides, l'équilibre est atteint très rapidement. L'analyse de Scatchard révèle la présence claire de deux sites d'interaction ; un site de forte affinité ($K_D = 370 \text{ nM}$ - $R^2 = 0,939$) ainsi qu'un site de faible affinité ($K_D = 19,57 \text{ µM}$ - $R^2 = 0,902$). On observe l'apparition de ce dernier site sur le graphe qu'à haute concentration ; c'est-à-dire seulement lorsque tous les sites à forte affinité sont saturés.

L'analyse hyperbolique révèle également une excellente concordance ($R^2 = 0,999$) entre le modèle et les données pour l'équation suivante qui décrit elle aussi la présence de deux sites d'interaction :

$$RU = \frac{R_{max1} \cdot [A]}{K_{D1} + [A]} + \frac{R_{max2} \cdot [A]}{K_{D2} + [A]}$$

Les affinités obtenues sont du même ordre de grandeur que ce que l'on obtient avec l'analyse linéaire ($K_{D1} = 0,147 \pm 0,04 \text{ nM}$; $K_{D2} = 69,27 \pm 12,05 \text{ µM}$).

A**CHMP4B / CHMP3****B**

Free CHMP3 (μM)	Bound CHMP3 (Ru)	Bound / Free ($\text{Ru} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
0.309	8.22	26.59
0.463	9.27	20.01
0.695	10.67	15.36
1.04	12.92	12.42
1.56	13.38	8.58
2.35	15.2	6.47
3.52	18.29	5.2
5.28	20.88	3.95
7.92	26.49	3.34
9.9	29.21	2.95
11.88	38.54	3.25
17.82	44.92	2.52
26.73	53.12	1.99
35.2	60.76	1.73

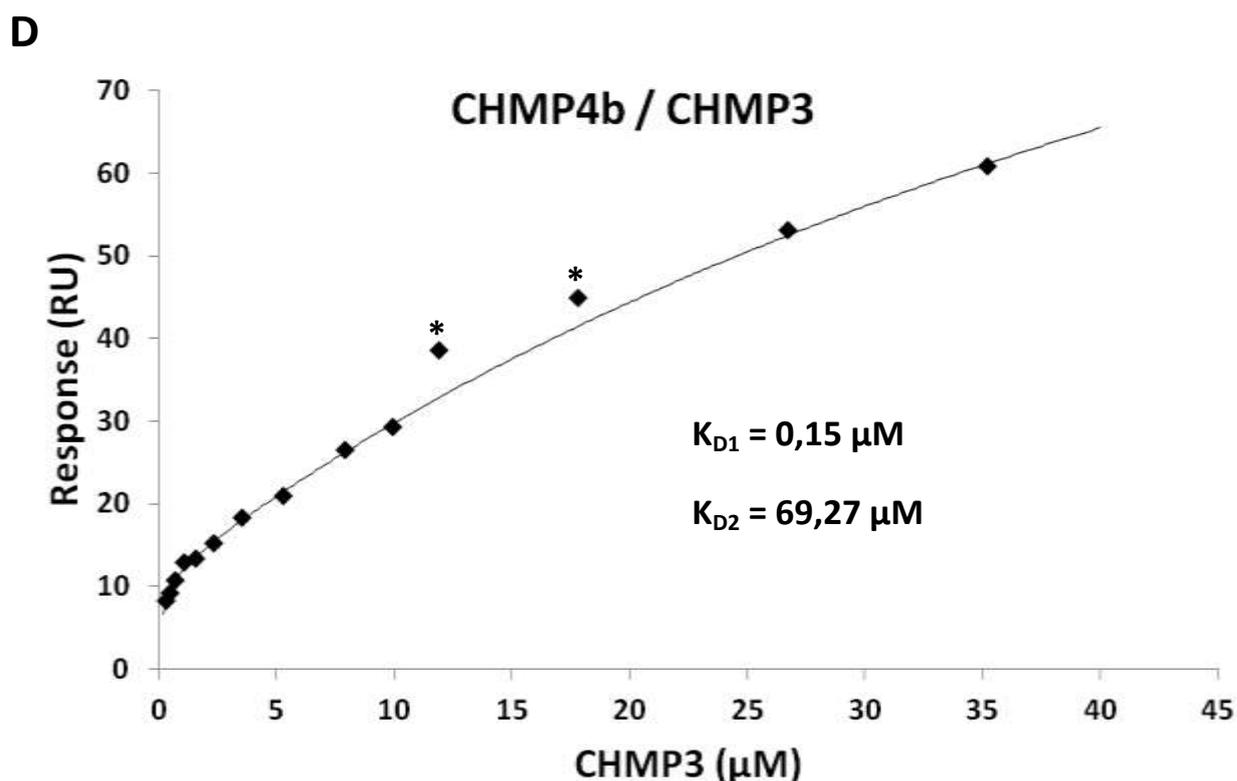
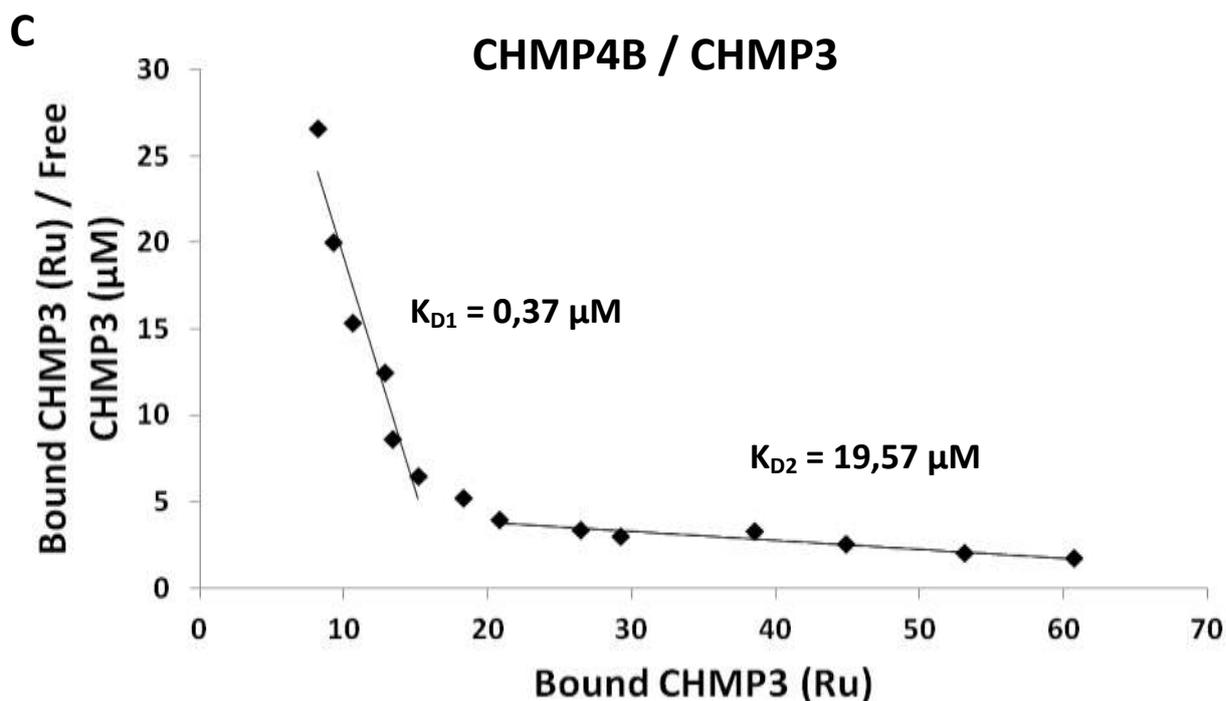
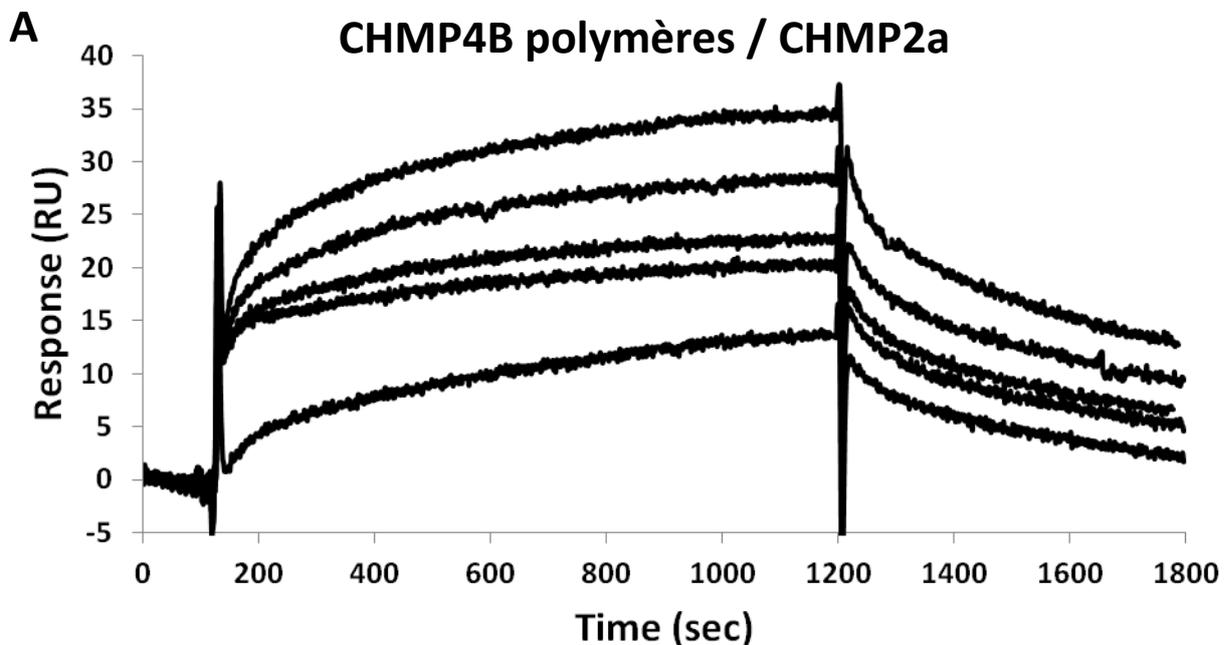


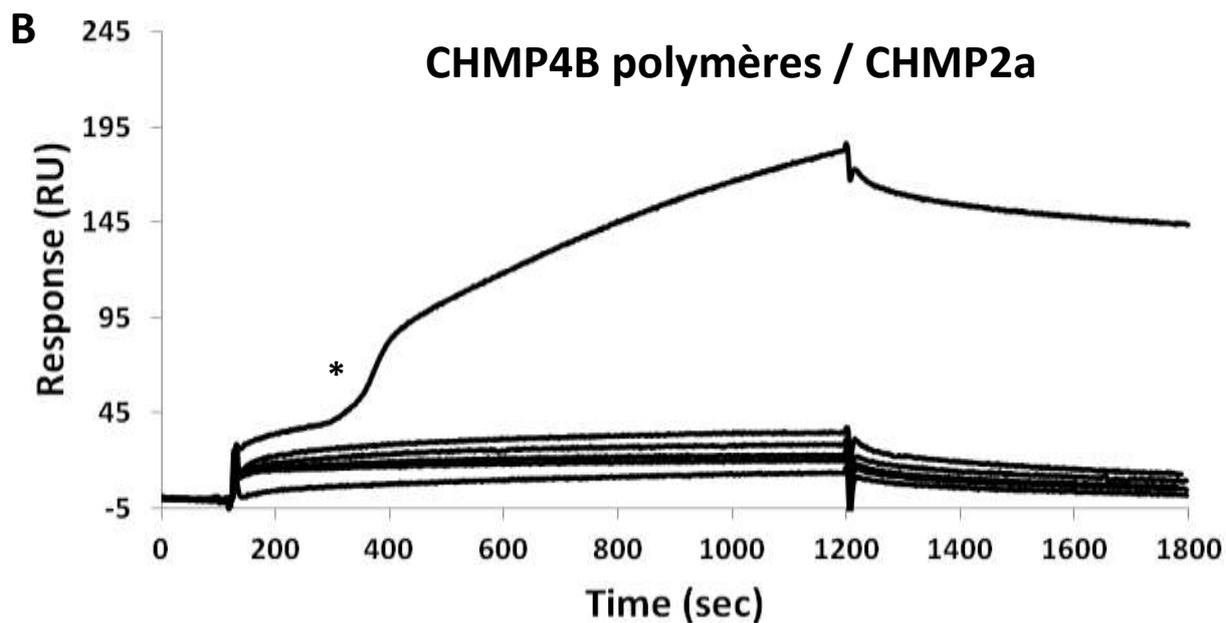
Figure 30 : Interaction entre CHMP4B (immobilisée) et CHMP3 mesurée par SPR. **A.** Aperçu du jeu de données. **B.** Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **C.** Représentation de Scatchard. **D.** Représentation hyperbolique. Les points expérimentaux correspondant aux concentrations 11,88 μM et 17,82 μM (astérisques) ont été ignorés lors du calcul de l'hyperbole car ils empêchaient l'obtention d'une corrélation satisfaisante, quelque soit le modèle testé.

Dans le modèle de formation d'ESCRT-III, CHMP3 et CHMP2A interagissent avec les polymères de CHMP4 [8], [82]. Afin de pouvoir évaluer si CHMP2A et CHMP3 présentent une différence d'affinité entre les monomères et polymères de CHMP4B, j'ai réalisé une puce à partir des polymères en anneaux CHMP4B (voir section 3.3.2.2.3. - Figure 44).

L'enregistrement du premier jeu de données obtenu avec CHMP2A a été particulièrement compliqué car la protéine interagit très fortement avec CHMP4B et atteint très difficilement l'équilibre. Qui plus est, cette forte interaction déclenche la polymérisation de CHMP2A sur la puce à partir d'environ 200 nM (Figure 31B). La cassure observable entre les points du jeu de données à hautes et basses concentrations (Figure 31D, E) est due à une diminution de la quantité totale en ligand lors de l'enregistrement des données à haute concentration. Cette diminution traduit le décrochage et/ou la dénaturation d'une partie du ligand en raison de l'emploi de tampons à pH acide pour décrocher les polymères de la puce lors des étapes de régénération.

L'analyse des données permet toutefois de mettre en évidence la présence de deux sites d'interaction, tout comme cela a été observé pour l'interaction CHMP4B (monomère) / CHMP3. Le premier site d'interaction indique un K_D de l'ordre du nanomolaire ainsi qu'un second site caractérisé par une affinité plus faible de l'ordre de la centaine de nanomolaire. La présence d'une interaction aussi forte est intéressante. Aussi, j'ai essayé de confirmer cette interaction en mélangeant des monomères CHMP2A aux polymères CHMP4B afin d'analyser les culots issus d'un gradient de sucrose sur SDS-PAGE. Cependant, seul CHMP4B est présent dans le culot après centrifugation.





C

Free CHMP2a (nM)	Bound CHMP2a (Ru)	Bound / Free (Ru . nM ⁻¹)
2.09	7.83	3.75
4.71	12.66	2.69
7.07	15.62	2.21
10.6	16.69	1.57
23.8	22.46	0.94
35.75	13.48	0.38
53.6	20.2	0.38
80.4	22.67	0.28
120.7	28.35	0.24
181	34.37	0.19

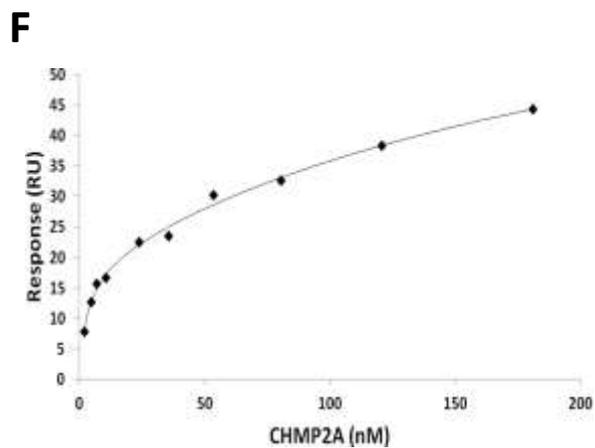
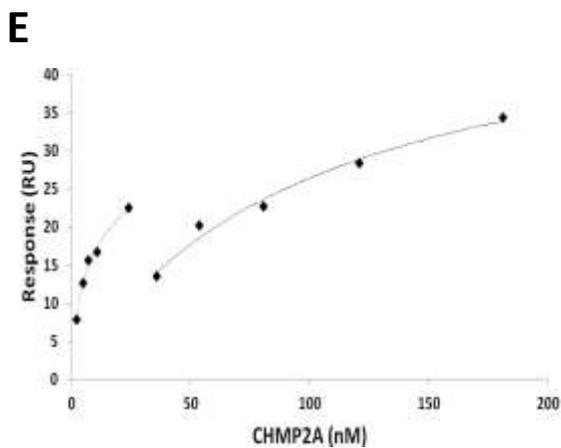
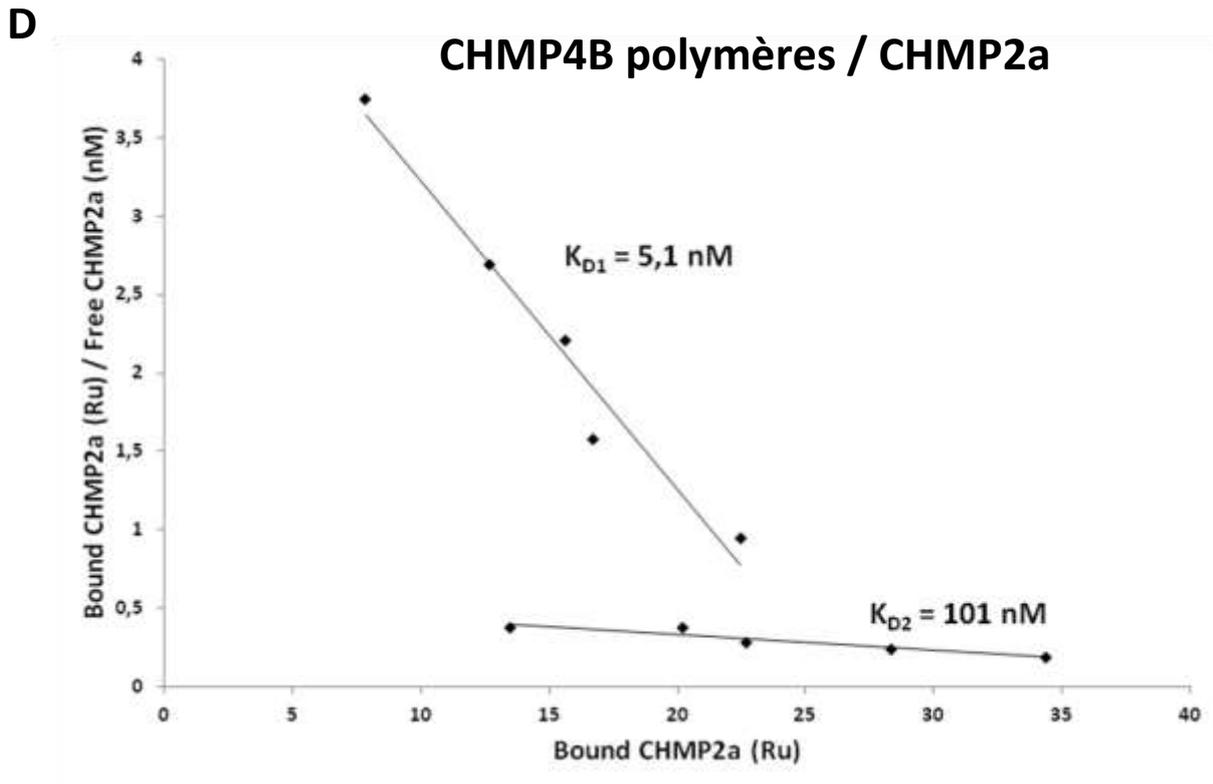
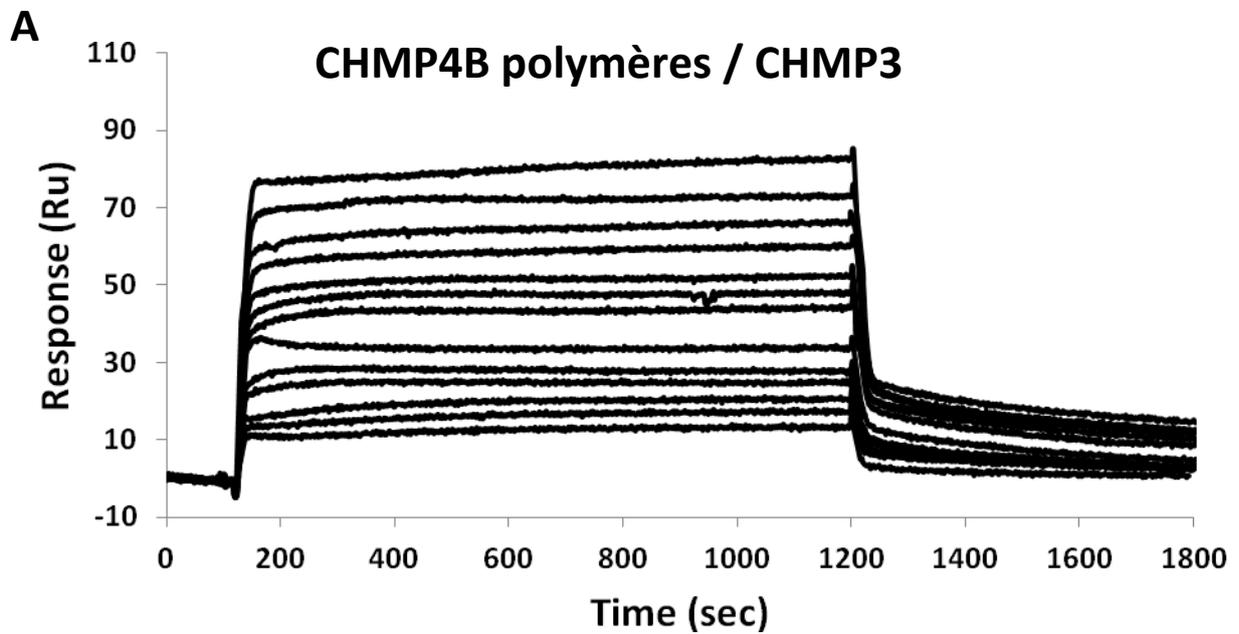


Figure 31 : Interaction entre CHMP4B (immobilisée) et CHMP2a mesurée par SPR. **A et B**. Aperçu des jeux de données à basse concentration (**A**) et haute concentration (**B**). L'astérisque met en évidence la polymérisation de CHMP2a à la concentration 270 nM. **C**. Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **D**. Représentation de Scatchard. **E et F**. Représentations hyperboliques. **E**. Jeu de données natif, les hyperboles sont tracées avec un modèle hyperbolique simple ($K_{D1} = 3,37 \pm 1,24 \text{ nM}$ - $R^2 = 0,996$ - modèle simple avec interaction aspécifique ; $K_{D2} = 96,68 \pm 17,57 \text{ nM}$ - $R^2 = 0,983$). **F**. Jeu de données corrigé en ajoutant **arbitrairement** 10 RU à toutes les valeurs à partir de la concentration 35,75 nM). L'hyperbole décrivant ce jeu de données indique la présence de deux sites d'interaction ($K_{D1} = 3,03 \pm 1,11 \text{ nM}$; $K_{D2} = 250,02 \pm 157,37 \text{ nM}$ - $R^2 = 0,995$).

Compte tenu de ce résultat, il est surprenant de constater que l'interaction de CHMP3 avec les polymères CHMP4B est en tout point similaire à l'interaction avec les monomères (Figure 32). L'association est rapide et l'équilibre atteint presque instantanément. La dissociation est plus lente qu'avec les monomères.



B

Free CHMP3 (μM)	Bound CHMP3 (Ru)	Bound / Free ($\text{Ru} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
0.206	13.25	64.32
0.309	17.31	56.02
0.464	20.51	44.25
0.695	24.81	35.69
1.04	27.89	26.81
1.56	33.7	21.61
2.35	43.93	18.69
3.52	52.12	6.58
11.88	59.78	5.03
17.82	66.05	3.71
26.7	72.88	2.73
35.2	82.33	2.34

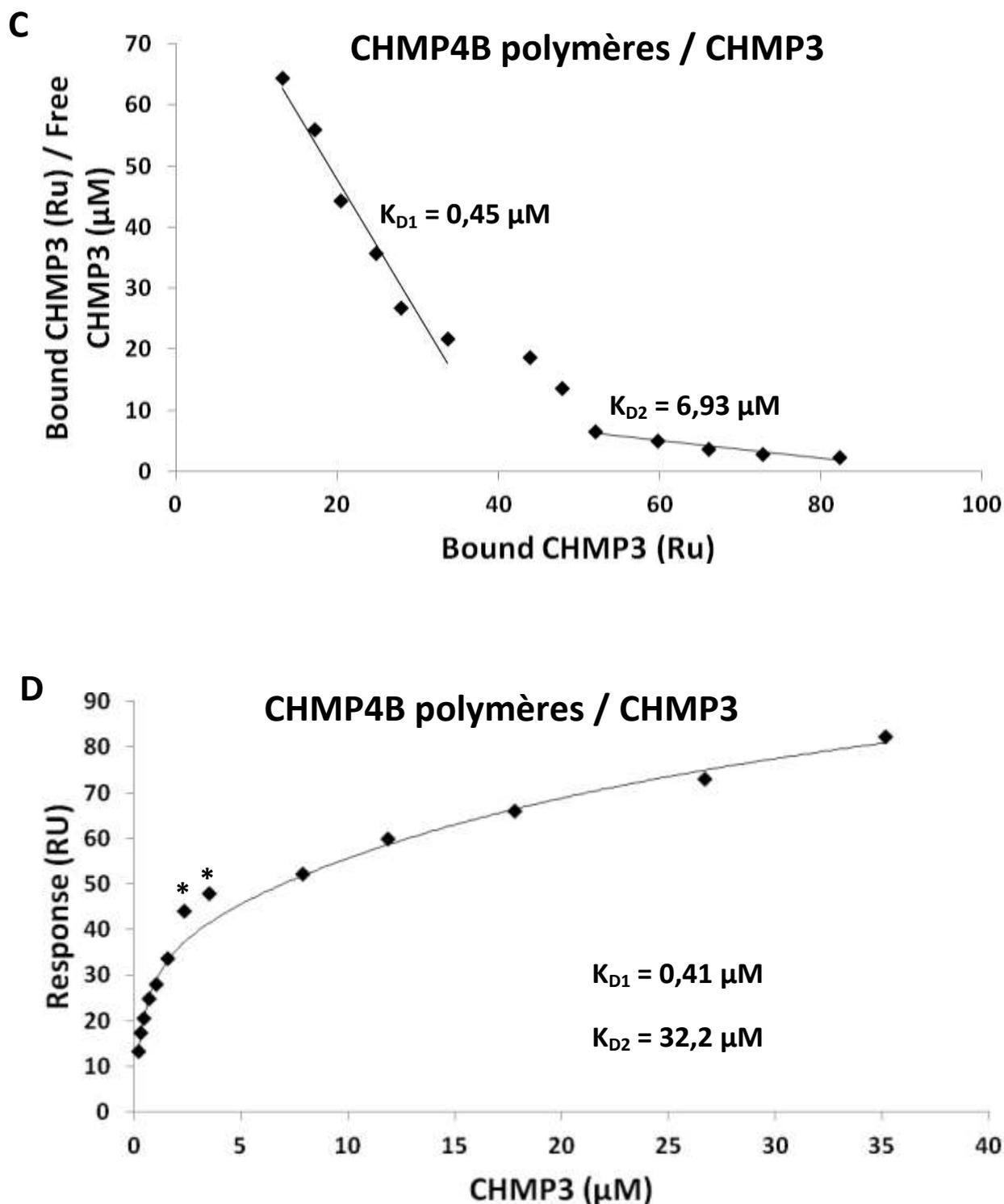


Figure 32 : Interaction entre CHMP4B (immobilisée) et CHMP3 mesurée par SPR. **A.** Aperçu du jeu de données. **B.** Tableau illustrant les valeurs des dilutions en analyte employées (« Free »), les valeurs de réponse à l'équilibre (« Bound ») ainsi que celles du rapport « Bound/Free » utilisé pour le graphe de Scatchard. **C.** Représentation de Scatchard. **D.** Représentation hyperbolique. Les points expérimentaux correspondant aux concentrations 2,35 μM et 3,52 μM (astérisques) ont été ignorés lors du calcul de l'hyperbole car ils empêchaient l'obtention d'une corrélation satisfaisante, quelque soit le modèle testé.

Les affinités obtenues entre CHMP3 et les polymères CHMP4B sont de l'ordre de la centaine de nanomolaire pour le premier site d'interaction (Scatchard : $K_{D1} = 0,45 \mu\text{M} - R^2 = 0,967$; hyperbole : $K_{D1} = 0,41 \pm 0,08 \mu\text{M} - R^2 = 0,998$) et de l'ordre du micromolaire / de la dizaine de micromolaire pour le deuxième site d'interaction (Scatchard : $K_{D1} = 6,93 \mu\text{M} - R^2 = 0,930$; hyperbole : $K_{D1} = 32,20 \pm 10,56 \mu\text{M} - R^2 = 0,998$).

J'ai enfin tenté d'étudier les interactions entre CHMP4B et la protéine CHMP2B, mais je ne suis jamais parvenu à atteindre l'équilibre avec cette protéine car elle s'accumulait constamment sur la puce, quelque soit la concentration employée lors des mesures. Ce phénomène d'accroche aspécifique pourrait aussi être expliqué par de la polymérisation.

3.1.3.3. Discussion

Je suis parvenu à adapter la technique SPR à l'étude des interactions entre protéines CHMP. Grâce au protocole utilisé ici basé sur la streptavidine ; il est possible d'immobiliser n'importe quelle protéine CHMP sur la puce. L'immobilisation par couplage covalent s'est révélée incompatible avec certaines protéines (CHMP2A et CHMP2B notamment). Etant donné que les protéines sont très basiques, le couplage covalent (utilisant les lysines) peut masquer des zones nécessaires aux interactions. Cette méthode d'immobilisation nécessite de diluer le ligand dans un tampon généralement très acide (pH 4,5) qui peut déstabiliser la structure de la protéine. La méthode employée ici permet de contourner en grande partie ces problèmes.

L'analyse cinétique n'a pas été possible. Ceci est probablement dû au fait que les protéines CHMP ont plusieurs interfaces d'interaction. Qui plus est, les phénomènes de polymérisation rendent ce type d'analyse délicat car en plus de la réaction $A + B \rightleftharpoons AB$; se produisent aussi les réactions de type $B + B \rightleftharpoons BB$; $B + BB \rightleftharpoons BBB$; etc. Cela reste vrai pour l'analyse à l'équilibre. Toutefois, l'établissement d'un équilibre permet de « moyennner » ces effets lorsqu'ils existent et ainsi de déterminer un K_D apparent. Enfin, l'analyse à l'équilibre permet, grâce au graphe de Scatchard, de détecter de manière claire la présence de phénomènes faisant dévier le jeu de données de la linéarité.

Toutes les interactions détectées ici ont été précédemment identifiées par d'autre techniques (double hybride, pulldown, etc.) [60], [77]. En revanche, les affinités régissant ces interactions étaient inconnues. Les données existant sur ESCRT-III suggèrent un assemblage ordonné où CHMP4 initie la polymérisation, CHMP3 arrive ensuite et recrute CHMP2 [8],[77], [157], [79]. Les résultats de SPR sur les monomères vont dans ce sens car l'affinité entre CHMP4 et CHMP3 est 10 fois supérieure à celle existant entre CHMP4B et CHMP2A (Figures 29, 30).

La plupart des interactions entre protéines CHMP implique des affinités d'interaction de l'ordre du micromolaire. Ceci est en accord avec les expériences d'assemblage des polymères CHMP4B et CHMP2A/CHMP3 qui requièrent quelques micromolaires de chacune des protéines pour rendre la réaction possible. A ce titre, les résultats issus de l'interaction entre les polymères CHMP4B et CHMP2A sont surprenants. CHMP2A forme très clairement des polymères sur la puce contenant les

polymères CHMP4B (Figure 31B). Aussi, bien que la très forte affinité détectée lors de ces expériences n'ait pas pu être confirmée biochimiquement, il ne s'agit probablement pas d'un artefact. Même en utilisant des dilutions extrêmement basses (nanomolaire), le signal est toujours mesurable et spécifique. Il est possible que la concentration locale de CHMP2A soit nettement plus élevée sur la puce que la dilution initialement injectée. Le fait que les polymères CHMP4B soient immobilisés peut aussi faciliter l'interaction avec CHMP2A. C'est d'ailleurs une situation proche de ce qui se produit dans la cellule où les polymères sont fixés sur la membrane... Enfin, le fait que CHMP2A interagisse plus fortement avec les polymères CHMP4B qu'avec les monomères est en accord avec le modèle actuel qui stipule que CHMP2A soit recrutée après formation des polymères CHMP4 [8], [79], [82], [157] (Figure 10).

La multiplicité des interactions ainsi que l'étendue des interfaces au sein des tubes CHMP2A/CHMP3 explique la grande stabilité de ces polymères (section 3.1.1 et 3.1.2). L'interaction entre CHMP2A et CHMP3 est caractérisée par un K_D de quelques micromolaires (Figure 27). La relative faiblesse de cette interaction permet certainement un désassemblage plus aisé par l'ATPase VPS4 en fin de réaction.

La protéine CHMP4B assure le rétrécissement initial du col membranaire reliant la vésicule lipidique à la membrane [8], [78], [157]. La protéine CHMP3 peut fournir un lien entre CHMP4B et CHMP2A bien que CHMP2A et CHMP4B puissent interagir directement (Figures 26, 29 et 30). La présence de CHMP3 au site de polymérisation pourrait éventuellement forcer le système à former un hétéropolymère CHMP2A/CHMP3 plutôt qu'un polymère CHMP2A seul si l'affinité de cette dernière pour elle-même est plus faible que pour CHMP3. CHMP3 semble donc intervenir à l'interface entre CHMP4 et CHMP2, sur la base des affinités déterminées avec les monomères CHMP4B ainsi que sur de précédents résultats [157]. La capacité de CHMP2A à former seule des polymères (Figure 19) tend à montrer son rôle essentiel en fin de réaction lors de la formation du polymère [8], [157], [79], [88].

L'analyse des interactions entre protéines CHMP par SPR a permis d'identifier clairement la présence de deux sites d'interaction dans presque tous les cas. Le graphe de Scatchard est commode car il permet de détecter aisément ce type de cas. L'analyse linéaire reste néanmoins imparfaite car elle oblige de traiter indépendamment les deux sections de droite. Ainsi, cette méthode considère que l'interaction sur chacun des deux sites ne se produit pas simultanément mais séquentiellement, c'est qui est évidemment faux. L'analyse hyperbolique permet de pallier cette approximation.

La présence de deux sites d'interaction n'est pas surprenante puisqu'il s'agit d'un prérequis à la formation de polymères tels que les tubes CHMP2A/CHMP3 comme le confirme la structure obtenue par cryo-microscopie électronique (Figure 18). A chaque fois, la différence d'affinité entre les deux sites est très marquée avec de l'ordre d'un facteur 100 séparant les deux constantes de dissociation. Cette séparation très nette entre les deux affinités doit probablement avoir une implication fonctionnelle. L'assemblage en polymère se produit donc vraisemblablement selon un mécanisme très ordonné : le monomère arrive sur le site d'assemblage du polymère et interagit dans un premier temps via une interface à forte affinité. Puis, lorsque ce recrutement a eu lieu, l'interaction via la deuxième interface est alors rendue possible (Figure 31, 32). La somme cumulée de toutes ces interactions confère au polymère une stabilité accrue et permet de poursuivre le processus de polymérisation. De plus, la faible affinité de la seconde interface autorise probablement une certaine

plasticité et ainsi la formation de structures alternatives entre filaments (comme cela est observé pour les tubes CHMP2A/CHMP3).

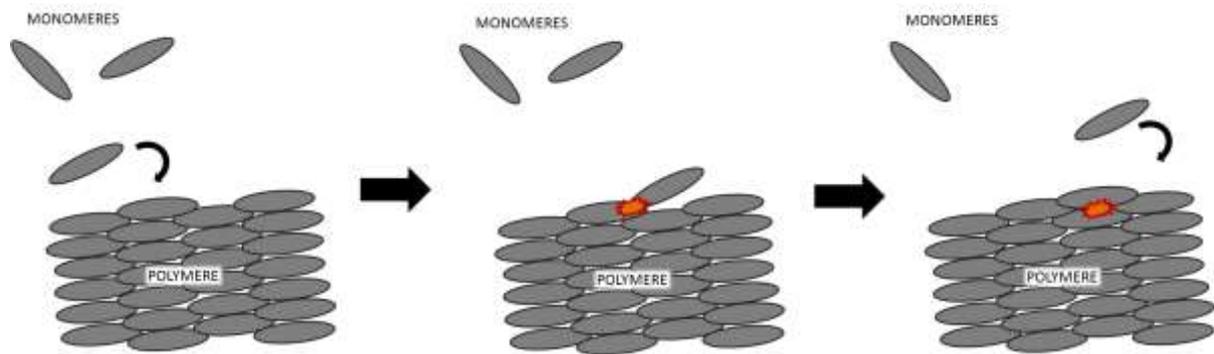


Figure 33 : Modèle de polymérisation des protéines CHMP basé sur les données de SPR. Les monomères sont recrutés et positionnés au sein du polymère grâce à une interface à haute affinité. Une seconde interface de faible affinité consolide l'assemblage en permettant l'accrochage du monomère à la couche inférieure du polymère. Le monomère suivant est alors prêt à être recruté.

Il est surprenant de constater l'absence apparente d'un deuxième site d'interaction entre CHMP3 et CHMP2A. Il est possible que la différence d'affinité entre les deux sites soit plus marquée. Si tel est le cas, le second K_D est trop faible pour être mesuré précisément avec la méthode employée ici. C'est peut être cette seconde interaction qui se cache derrière la contribution des interactions considérées comme aspécifiques dans l'équation de l'hyperbole. Enfin, le jeu de données CHMP4B monomères / CHMP2A n'est quand à lui pas assez complet pour permettre de voir la seconde interaction (Figure 27).

La méthodologie employée pose des bases expérimentales pour l'étude des interactions au sein d'ESCRT-III par SPR. Cette méthode a enfin permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux interfaces d'interaction entre protéines CHMP probablement impliquées dans la formation de polymères.

3.2. Article : ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers *in vitro* and act synergistically during HIV-1 budding

Grégory Effantin*, **Aurélien Dordor***, Virginie Sandrin*, Nicolas Martinelli, Wesley I. Sundquist, Guy Schoehn and Winfried Weissenhorn.

Cellular Microbiology - soumis.

* : la contribution des auteurs est similaire.

- **Résumé de l'article:** Cet article présente la structure par cryo-microscopie électronique des polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3. Il met en évidence que CHMP2A et CHMP3 peuvent former des structures hélicoïdales de symétrie variable mais qui présentent une grande stabilité. Des expériences de knockdown montrent qu'il existe une synergie entre CHMP2A et CHMP3 lors du bourgeonnement du VIH et suggèrent une redondance fonctionnelle entre CHMP2A/CHMP3 d'une part et CHMP2B d'autre part. Enfin, les interactions entre CHMP4B, CHMP3 et CHMP2A sont analysées et quantifiées par SPR.

- **Contribution personnelle:** J'ai produit les polymères CHMP2A/CHMP3 et CHMP2A pour permettre la reconstruction de structure par cryo-microscopie électronique, j'ai réalisé les tests de résistance aux protéases présentés en figure 6 et j'ai produit toutes les données de SPR présentées dans la partie « Supplementary data ».

ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers *in vitro* and act synergistically during HIV-1 budding

Grégory Effantin^{1,7}, Aurélien Dordor^{1,7}, Virginie Sandrin^{2,7}, Nicolas Martinelli¹, Wesley I. Sundquist², Guy Schoehn^{1,3,4,5} and Winfried Weissenhorn^{1,6}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Department of Biochemistry, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah 84112-5650, U.S.A.

³CNRS, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

⁴CEA, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

⁵UJF-Grenoble-1, Institut de Biologie Structurale-Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

⁶Correspondence: weissenhorn@embl.fr

⁷These authors contributed equally

Running title: Structure of CHMP2A-CHMP3 tubes and HIV-1 budding

Abstract

The endosomal sorting complex (III) required for transport (ESCRT-III) is essential for budding of some enveloped viruses, the formation of intra luminal vesicles at the endosome and for the abscission step of cytokinesis. ESCRT-III proteins form polymers that constrict membrane tubes, leading to fission. We have used cryo-EM to determine the molecular organization of pleiomorphic ESCRT-III CHMP2A-CHMP3 polymers. The three-dimensional reconstruction at 22 Å resolution reveals a helical organization of filaments of CHMP molecules arranged in a head to tail fashion. Protease susceptibility experiments indicate that polymerization is achieved via conformational changes that increase the protomer stability. Combinatorial siRNA knockdown experiments indicate that CHMP3 contributes synergistically to HIV-1 budding, and the CHMP3 contribution is ~10-fold more pronounced in concert with CHMP2A than with CHMP2B. This is consistent with SPR affinity measurements that suggest sequential CHMP4B-CHMP3-CHMP2A recruitment while showing that both CHMP2A and CHMP2B interact with CHMP4B, in agreement with their redundant functions in HIV-1 budding. Our data thus indicate that the CHMP2A-CHMP3 polymer observed *in vitro* contributes to HIV-1 budding by assembling on CHMP4B polymers.

Keywords: CHMP2A/CHMP2B/CHMP3/ESCRT/HIV-1

3.3.

Introduction

Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) were first discovered in yeast, where they catalyze membrane protein sorting into intra-luminal vesicles at the endosomal membrane. This process creates multivesicular bodies, which ultimately fuse with the vacuole/lysosome and thereby target the proteins for lysosomal degradation (Henne et al., 2011). The ESCRT system is highly conserved in all eukaryotes and comprises five different complexes that are assembled sequentially (Saksena et al., 2007). ESCRT-0 recognizes ubiquitylated cargo (Ren and Hurley, 2010), ESCRT-I and -II have a role in vesicle formation; and ESCRT-III constitutes the fission machinery (Wollert and Hurley, 2010), with support from the VPS4 complex, which also recycles ESCRT-III from cellular membranes (Babst et al., 2011; Baumgartel et al., 2011; Shestakova et al., 2010). Selected ESCRTs are further recruited during budding of some enveloped viruses including HIV-1 (Martin-Serrano and Neil, 2011; Morita and Sundquist, 2004; Usami et al., 2009) and during cytokinesis of eukaryotes (Carlton et al., 2012; Guizetti and Gerlich, 2010; McDonald and Martin-Serrano, 2009). Even Crenarchaea, which lack endosomes, employ ESCRT-III- and VPS4-like proteins for cell division (Ghazi-Tabatabai et al., 2009; Lindas et al., 2008). All known ESCRT-catalyzed processes employ ESCRT-III and VPS4, consistent with their requirement for a final common membrane fission step (Guizetti and Gerlich, 2012; Hurley and Hanson, 2010; Peel et al., 2011).

S. cerevisiae express six ESCRT-III proteins, which form at least 2 subcomplexes composed of Vps20-Snf7 and Vps2-Vps24 (Babst et al., 2002); Vps20 recruits Snf7, which in turn recruits Vps24 followed by Vps2, to form a large ESCRT-III core complex that can deform membranes *in vitro* (Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008). The four core yeast ESCRT-III proteins have been shown to trigger vesicle fission from GUV membranes, with Vps20 and Snf7

playing central roles in fission in the *in vitro* system, and Vps24 rendering fission more efficient (Wollert and Hurley, 2010). Mammalian cells express 12 ESCRT-III-like proteins, termed CHMP (*CH*arged *M*ultivesicular body *P*rotein), which have the potential to form analogous core complexes composed of CHMP6 (Vps20), a member of the CHMP4 (A, B, or C) family (Snf7), CHMP3 (Vps24), and a member of the CHMP2 (A or B) family (Vps2). Other ESCRT-III-like proteins (CHMP1A, B, CHMP5, CHMP7, and IST1) appear to play regulatory roles both in yeast and higher eukaryotes (Babst et al., 2011; Henne et al., 2011; Hurley and Hanson, 2010; Peel et al., 2011).

ESCRT-III members share a common architecture for their N-terminal core domain (Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006; Xiao et al., 2009). The C-terminus folds back onto the core in the auto-inhibited cytosolic form, and CHMP activation entails its' displacement (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008a; Lin et al., 2005; Shim et al., 2007; Zamborlini et al., 2006). Activation is thought to favor membrane binding and polymerization (Peel et al., 2011). Only CHMP4 and CHMP2 polymers have thus far been observed *in vivo*, which form either CHMP4-containing plasma membrane tubes upon co-expression with dominantly inhibitory VPS4B protein (Hanson et al., 2008) or plasma membrane tubes decorated with helically arranged CHMP2B (Bodon et al., 2011). Helical structures of CHMP2A, albeit with a smaller diameter, have been imaged by cryo electron tomography at the midbody of HeLa cells (Guizetti et al., 2011). *In vitro*, several types of polymers have been observed in the absence of membranes, including two or three stranded filaments of yeast Vps24 (Ghazi-Tabatabai et al., 2008), circular arrays of CHMP4B (Pires et al., 2009) and tubular polymers of IST1, CHMP1A (Bajorek et al., 2009) and CHMP2A/CHMP3 complexes (Lata et al., 2008b). In particular, human CHMP2A and CHMP3 co-assemble into regular straight or cone-shaped tubular helical

structures, in good agreement with the yeast subcomplex of Vps24-Vps2 (Babst et al., 2002), (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008b). Based upon the observation that some of these tubes are closed at one end, a model for ESCRT-III-driven neck closure has been proposed in which ESCRT-III spiraling filaments could catalyze membrane fission by spiraling closed and drawing the opposing membranes together (Fabrikant et al., 2009; Lata et al., 2008b).

Although nearly all ESCRT-III members play pivotal roles during cell division (Morita et al., 2010), siRNA depletion experiments indicate that HIV-1 budding has a strong requirement for only one CHMP4 family member together with either CHMP2A or B (Morita et al., 2011). The VPS4 complex is also essential for budding (Kieffer et al., 2008; Strack et al., 2003; von Schwedler et al., 2003) and functions as a component of the fission machinery in higher eukaryotes (Baumgartel et al., 2011; Jouvenet et al., 2011). During HIV-1 budding, CHMP4 assembles first within the neck of a budding virion where it can apparently recruit either CHMP2A or B by direct interaction leading to virion release (Morita et al., 2011). Thus, in contrast to the yeast system (Wollert and Hurley, 2010), CHMP2 isoforms appear to play a key role in the mammalian fission process during HIV-1 budding (Morita et al., 2011).

Here we present a helical reconstruction of the ESCRT-III CHMP2A-CHMP3 polymer by cryo-EM. The reconstruction revealed a linear arrangement of CHMP proteins into filaments that interact laterally to produce the tube-like structures. CHMP2A-CHMP3 polymerization increased the thermostability and protease resistance of the subunits as compared to the monomeric proteins, suggesting that polymerization generates free energy that might be employed for membrane remodeling. The physiological importance of the CHMP2A-CHMP3 combination is supported by observation that CHMP3 acts synergistically with CHMP2A and, to a lesser extent, with CHMP2B during HIV-1 release. We find that CHMP4B binds ~16 fold

more tightly to CHMP3 than CHMP2A, supporting the idea that recruitment at the HIV-1 budding site normally follows the order CHMP4B:CHMP3:CHMP2A.

Results.

Cryo-EM analyses and 2D classification of CHMP2A-CHMP3 polymers. Tubular polymers composed of MBP-CHMP2A Δ C (residues 9-161) and CHMP3 (residues 1-222) were assembled as described (Lata et al., 2008b) and MBP was then removed by proteolysis to optimize data quality (Figure S1). Although MBP cleavage from CHMP2A Δ C induced aggregation of CHMP2A Δ C-CHMP3 tubes, single tubes could still be imaged by cryo-EM (Figure 1A). The CHMP2A Δ C-CHMP3 tubes are pleiomorphic with regard to: 1) length, 2) diameter and 3) straight, curved or cone-shaped walls (Figure 1A). We collected three datasets, two of which were from tubes in which MBP was completely removed from CHMP2BA Δ C (collected on a FEI Tecnai G2 Polara microscope) and one that was collected on tubes in which the MBP was partially removed, (FEI CM200 microscope). Tube images were cut into short segments and classified by a reference-free approach, resulting in a large number of two-dimensional (2D) class averages of tubes with variable diameters between 445 and 545 Å (Figure 1B). These 2D class averages could be sorted into two general groups that exhibited two different types of internal striations. One group showed continuous parallel transversal striations, (termed the “line pattern”) (Figure 1C), while the second group displayed interrupted segments perpendicular to the tube axis that packed in parallel to form vertical column-like features (Figures 1C and D). The column-like pattern predominated in two of the three data sets. Because the line-pattern classes were only frequent in the sample in which the MBP moiety had been partially removed, we compared the 2D class averages obtained after reference-free classification of MBP un-

cleaved and cleaved tubes derived from the same purification batch. Both classifications produced class averages that had the same column-pattern, implying that MBP removal had no significant effect on the structural organization of the tubes (**Figure S2**). This experiment confirmed that the line- and column-patterns observed in the 2D-classes arise from genuinely different types of CHMP2AΔC-CHMP3 tubes.

CHMP2AΔC and CHMP3 can form helical polymers of different symmetries. 2D Fourier transformations of classes displaying the line-like and column-like patterns show layer lines at ~ 30.9 and 30.1 Å, respectively. The small difference in their heights is most likely due the fact that the images were taken on different electron microscopes at different magnifications (**Figures 2A and B**). However, the horizontal position of the maximum amplitude of the layer line in both Fourier transformations differed and corresponded to a Bessel function of the order $n=1$ for the line-pattern and $n=6$ for the column-pattern. To characterize these differences further, we set up a systematic test of helical symmetry parameters to probe which pitch of a putative helix is the most consistent with the 2D class average (Desfosses et al., 2011). The correlation between the class average and the 2D projection of a 3D model revealed the maximum correlation for a pitch of 30.9 Å in case of the line-pattern (**Figure S3A**). This suggests a 1-start helix with a pitch of 30.9 Å consistent with the Bessel order $n=1$ calculated from the 2D Fourier transform. Following the same approach, the search for the best pitch for the 5 column-like pattern class average (**Figure 2B**) showed a maximum correlation at 181 Å and lower correlation peaks for pitches, multiples of 30 Å (**Figure S4A**). The correctness of the model was validated by calculating an isosurface of the 3D model with a 181 -Å-pitch and by comparing its 2D projections shown at different out-of-plane angles with the best matching reference-free 2D class averages (**Figure**

S4C). Thus, the 5 column-like pattern class average (**Figure 2B**) can be best described by a 6-start helix having a 181-Å-pitch. Other 2D class averages having different diameters and different column numbers (**Figure 1D**) can also be explained by an n-start helix (n is an integer) model having an n-times 30-Å-pitch (data not shown). In addition, the 2D projections calculated at different out-of-plane angles of the 3D model of the 1-start helix match the *ab-initio* reference-free 2D class averages representing the line-pattern (**Figure S3C**). In summary, CHMP2AΔC and CHMP3 can form tubes with different helical packing described by an n-start helix with a $n \cdot 30$ Å pitch ($1 \leq n \leq 7$ for the data analyzed in this study).

3D reconstruction of CHMP2A-CHMP3 tubes. Cyclic symmetry of the order n around the helical axis of the tubular structures is further corroborated by the presence of either inversion or mirror symmetry in some 2D class averages (**Figure S4D**). We therefore used the *Iterative Helical Real Space Reconstruction* (IHRSR) algorithm (Egelman, 2007) to calculate a 3D reconstruction on the most populated class (mean diameter of 485 Å), which is best described by a 6-start helix with a 181-Å-pitch (**Figure S4B**). Upon testing various cyclic symmetries, only C6 produced reliable results. IHRSR converged to a final solution having an axial rise per subunit z of 6.03Å and an azimuthal angle ϕ of 11.9° for a resolution of 22Å at a Fourier shell correlation (FSC) of 0.5 (**Figure S5A**). The 3D reconstruction shows a 6-stranded helical structure with each filament being separated by ~30Å and made up by 30.2 asymmetric units per turn. The asymmetric unit is well defined and elongated in shape (**Figure 3, red and green densities**). On the inside of the structure, clear grooves separate each strand (**Figure 3B-D**). In between strands, there are also lower density zones (appearing as holes at the threshold used in the isosurface representation of **Figure 3**). The long axis of the asymmetric unit is tilted by ~45°

with respect to the tube axis such that lateral interactions between units produce a tube width of ~ 40 Å as well as the external 40 Å dimension of the asymmetric unit (**Figure 3C**). The surface making up the lateral interactions between filaments is substantially smaller than that of linear inter-monomer interactions (**Figures 3C and D**).

Despite the intermediate resolution of the cryo-EM reconstruction, the CHMP3 monomer containing helices 1 to 4 could be docked inside the map with the 70-Å-long helical hairpin positioned diagonal with the tip of the helical hairpin pointing towards the inside of the tube. This predicts that the CHMP filament is made up by head to tail interactions of successive CHMP2A and CHMP3 monomers (**Figures 4A-C**). Even though the asymmetric unit appears slightly too large for a single monomer at this resolution (**Figure 3**), it is not big enough to fit a CHMP dimer model (Lata et al., 2008b) without steric clashes. Thus the interpretation of the density of the asymmetric unit (**Figure 4D**) might be better explained with a different CHMP conformer model (even though the core monomer (helices 1-4) lacks ~ 20 amino acids) that drives polymerization. Even though attempts to calculate a 3-D reconstruction from the data representing the 1-start helix model (**Figure S3**) did not converge to a reliable model, probably due to the limited data available for analysis, we propose that the conformation of the CHMP filament is the same.

Molecular architecture of CHMP2A polymers. CHMP2A Δ C assembled into coil-like structures as determined by negative staining electron microscopy (**Figure 5A**). Some of these filaments almost close at one end by successively narrowing the coil diameter as viewed from the top (**Figures 5B and C**). The CHMP2A coils are ~ 30 Å in width, which is similar to the CHMP filaments observed in the CHMP2A-CHMP3 polymer, the CHMP2B membrane tubes

(Bodon et al., 2011) as well as in CHMP4B polymers (Pires et al., 2009). This suggests that CHMP2A, CHMP2B, CHMP3 and CHMP4B employ similar structural principles to form linear filaments of constant width.

ESCRT-III CHMP2A-CHMP3 stability. Trypsin treatment of CHMP2A Δ C-CHMP3 polymers did not reduce the size of CHMP2A Δ C significantly as judged from the SDS-PAGE analysis (**Figure 6A**), while full length CHMP3 proteolyzed to a fragment migrating at ~25 kDa (**Figure 6A, right panel, asterisk**), which contained residues 7 to 183 as determined by mass spectrometry. Proteinase K digestion of CHMP2A Δ C-CHMP3 tubes reduced the size of CHMP3 further to produce fragments corresponding to residues 2 to 168 (**Figure 6A, right panel, asterisk**) and residues 8 to 160, (**Figure 6A, right panel, triangle**) while CHMP2A Δ C stayed largely resistant (**Figure 6A, circle**). In contrast, monomeric CHMP3 and MBP-CHMP2A were degraded by trypsin and proteinase K (**Figures 6B and C**), indicating that polymer formation rendered CHMP3 and CHMP2A Δ C protease resistant. Trypsin-treated CHMP2A Δ C-CHMP3 polymers were undistinguishable from wild type polymers, suggesting that CHMP2A and CHMP3 helices 1 to 4 plus the connecting region to helix 5 form the core of the tubular polymer. Circular dichroism thermostability measurements showed a melting temperature (TM) of ~64°C for MBP-CHMP2A (MBP has a TM of 55°C), a TM of 60°C for CHMP3 and an increase of the TM to 70°C for the CHMP2A Δ C-CHMP3 tubular polymer. Taken together, these observations indicate that polymer formation renders CHMP2A and CHMP3 more stable.

CHMP3 exerts a synergistic effect on CHMP2A during HIV-1 budding. Morita and colleagues have reported that HIV-1 release from host cells requires a CHMP4 family member,

together with either CHMP2A or B (Morita et al., 2011). Here we extended the siRNA knockdown study to double knock-downs of CHMP2A-CHMP3 and CHMP2B-CHMP3. As expected from previous results, single knock-downs of CHMP2A, CHMP2B and CHMP3 had only modest effects on virion release and infectivity. Knock-down of CHMP2A and CHMP3 reduced infectious units by a factor of ~1.4 and CHMP2B knock-down produced a ~ 2.5-fold reduction (**Figures 7A and B**). The double knock-down of CHMP2A and CHMP3 reduced infectivity 2.6-fold, while the double knockdown of CHMP2B-CHMP3 reduced infectivity 17-fold and the CHMP2A-CHMP2B double knockdown reduced infectivity 46 fold (**Figures 7A and B**). Detection of cellular Gag, CA, MA and GAPDH demonstrated similar protein concentrations (**Figure 7C**) and efficient single and double knock-downs were verified by western blot analyses (**Figure 7D**). Our data indicate that loss of CHMP3 synergizes slightly with loss of CHMP2A in inhibiting HIV-1 release (1.9-fold reduction vs. depletion of either CHMP3 or CHMP2A alone) but shows much greater synergy with loss of CHMP2B (6.8-fold reduction vs CHMP2B depletion alone, 12-fold reduction vs. CHMP3 depletion alone). Thus our data suggest that during HIV-1 budding, CHMP3 synergizes more efficiently with CHMP2A than with CHMP2B.

ESCRT-III interactions *in vitro* support their redundant function during HIV-1 budding. It was shown previously that CHMP2A can interact directly with CHMP4B, which is required for HIV-1 budding (Morita et al., 2011). Because CHMP3 depletion synergized with CHMP2 proteins in inhibiting HIV-1 budding, we extended previous CHMP-CHMP interaction studies (Martin-Serrano et al., 2003; von Schwedler et al., 2003) to analyze the pair-wise interactions of CHMP4B between CHMP3, CHMP2A and CHMP2B using biosensor analyses. Because some

of the binding data could not be satisfactorily analyzed by the Langmuir model, binding curves were recorded until equilibrium was reached and the equilibrium data was evaluated by non-linear least squares fitting to hyperbolic binding models. This analysis revealed a K_D of 2.4 ± 0.2 μM for CHMP2A monomer binding to immobilized CHMP4B monomers (**Figure S6A**). At low concentrations, CHMP3 monomers bound to CHMP4B monomers with an approximate 16-fold tighter K_{D1} of 0.15 ± 0.04 μM . At higher concentrations, a second K_{D2} of 69 ± 12 μM was observed, which might indicate CHMP3 polymerization upon saturation of the CHMP4B binding sites (**Figure S6B**). CHMP2A and CHMP3 interacted with a K_D of 3.2 ± 0.2 μM (**Figure 6C**), which is in agreement with the requirement of ~ 7 μM concentrations of CHMP2A and CHMP3 for polymer formation (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008b). Finally, CHMP4B and CHMP2B interacted with a K_D of 0.56 μM and CHMP2B-CHMP3 interacted with a K_D of 1.4 μM (**Figure S6D**). These data confirm that CHMP4B can directly recruit CHMP2A or CHMP2B (Morita et al., 2011). However, if CHMP3 is present, the higher affinity of CHMP4B for CHMP3 may indicate that CHMP3 is preferentially recruited by CHMP4B, and can then subsequently engage CHMP2A or CHMP2B.

Discussion

We have developed a low-resolution structural model for ESCRT-III CHMP2A-CHMP3 polymers, which form pleomorphic tube-like structures that are straight or cone-shaped and sometimes have closed, dome-like end caps (Bajorek et al., 2009; Fabrikant et al., 2009; Lata et al., 2008b). The variability of the tube diameters is restricted, with a full range of 44.5 to 54.5 nm, and the majority of tubes falling into the narrow range of 47 to 51 nm. In contrast, helical CHMP2B membrane tubes show a larger diversity, with diameters ranging from 100 to 400 nm

(Bodon et al., 2011). Despite their variability, we were able to use 2D classification of cryo-EM images of tube segments to isolate homogenous classes of CHMP2A-CHMP3 tubes. The 2D classes showed two types of tube morphology, which we refer to as line pattern and column pattern, respectively. Both patterns produced reliable layer lines at $\sim 30\text{\AA}$ in Fourier transformation analyses, indicating the helical pitch. The line pattern is best described by a 1-start helix model, while the column patterns fit multiple (n) start helix models, with pitches of n times 30\AA . Because the group representing $n=6$ (i.e., the 6-start helix model) was the most populated among the 2-D classes, we reconstructed it to a model having a resolution of 22\AA . The model revealed an elongated asymmetric unit that fits the 70\AA long helical hairpin structure of CHMP3 diagonally, although some ambiguity remains about the actual content of the asymmetric unit at this resolution. The map differs from a previous reconstruction, which however was obtained at a lower 30\AA resolution and employing data collected from MBP-CHMP2A Δ C-CHMP3 polymers that produced limited data quality (Lata et al., 2008b). Although the data corresponding to the 1-start helix model did not converge to a reliable structural model, we hypothesize that the molecular interactions making up the polymer string are the same. In fact, it is most likely that the 1-start helix is the physiologically relevant assembly, consistent with EM tomography data of a potential CHMP2 polymer present at the midbody (Guizetti and Gerlich, 2012). Furthermore, 2D classification of CHMP2B membrane tubes produced the line pattern morphology consistent with a 1-start helix model. Because the Fourier transform of the CHMP2B data revealed a layer line at 32\AA corresponding to its helical pitch (Bodon et al., 2011), we suggest that CHMP2A-CHMP3 and CHMP2B employ similar structural principles to assemble into tubes *in vitro* and *in vivo*. The same linear assembly mode is most likely used by CHMP4 polymers that produce $\sim 30\text{\AA}$ thick loose coils with no lateral interactions evident *in*

vitro (Pires et al., 2009). Notably, the length of the repeating unit of the CHMP4B polymers was estimated at 40 Å (Pires et al., 2009), which is consistent with the length of the CHMP2A-CHMP3 asymmetric unit. Similar sized CHMP4 strings have been observed *in vivo* (Hanson et al., 2008), indirectly supporting the physiological relevance of the head-to-tail interaction of ESCRT-III monomers seen in our study. We demonstrate further that CHMP2A can also form linear strings or coils on its own in the absence of membrane, which have the same width as CHMP2A-CHMP3, CHMP2B (Bodon et al., 2011) and CHMP4 strings (Pires et al., 2009). These narrow coils appear to interact laterally and constrict to nearly closed structures as viewed end on. In contrast larger spiral filaments were observed at the midbody, which were hypothesized to be formed by CHMP2 (Guizetti et al., 2011). It is also notable that there are other cases in which ESCRT-III filaments can have a much thicker appearance by negative staining electron microscopy (Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Pires et al., 2009) and image analysis of such yeast Vps24p filaments produced a two-stranded helical structure (CHMP3) (Ghazi-Tabatabai et al., 2008). Such alternative assemblies might either solely reflect the general polymerization propensities of ESCRT-III proteins or could have roles during earlier events of mitosis such as centrosome and spindle maintenance (Morita et al., 2010) or abscission control (Carlton et al., 2012).

Although we were able to fit the crystal structure of the CHMP3 core (helices 1 to 4) into the asymmetric unit of our reconstruction, it is possible that the structure is not present in this conformation for several reasons. First, we showed that CHMP2A and CHMP3 became protease resistant upon polymer formation. In contrast, the docked crystal structure still exposes several potential accessible trypsin cleavage sites in the current model. Second, CHMP2A residues such as V59 and V62 implicated in tube formation and thus CHMP3 interaction (Bajorek et al., 2009)

do not interact with neighboring molecules in the docked model. In addition, the cluster of basic residues on helix 1 implicated in membrane binding (Muziol et al., 2006) are exposed, but it is difficult to imagine how the surface of the pseudo-atomic model that produced a step-like or staggered appearance (data not shown) could mediate efficient membrane interaction. Thus both CHMP2A and CHMP3 may undergo conformational changes that render them protease resistant and increase their thermostability when they co-polymerize. Notably, the increased stability could provide free energy for membrane bending.

Protease K digestion of CHMP2A-CHMP3 tubes left CHMP2A (residues 9-163) unchanged and trimmed CHMP3 residues 8 to 160, indicating that helices 1 to 4 including the linker region to helix 5 form the core of the polymer. This result is consistent with the results showing that CHMP3 residues 1 to 150 suffice to form tubes (Bajorek et al., 2009), but it is remarkable that the linker region connecting helices 4 and 5, a region which is disordered in the crystal structures of CHMP3 (Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006), becomes resistant to protease K digestion within the CHMP2A-CHMP3 polymer. This observation provides further support for the idea that CHMP3 undergoes a conformational change upon polymerization.

The asymmetric unit exposes a rather flat surface on the tube exterior, which presumably corresponds to the membrane binding surface. Contacts between filaments are made in the peripheral adjacent region, but the overall contact surface is limited. In contrast, interactions between asymmetric units or monomers along the filament are more extensive. This arrangement permits transitions to smaller tube diameters as observed in cone-shaped tubes and end-capped dome-like structures (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008b) by successively reducing the number of monomers per turn while maintaining the minimal lateral inter-strand interactions and requiring relatively few adjustments in the relative monomer orientations. Based on the

similarities between images obtained for several CHMPs as well as their structural homology (Bajorek et al., 2009; Martinelli et al., 2012; Muziol et al., 2006; Xiao et al., 2009), we conclude that all CHMP polymers acting directly on membranes likely have the same molecular architecture whether they form hetero-polymers such as CHMP2A-CHMP3 or CHMP2A, CHMP2B and CHMP4 homo-polymers.

HIV-1 budding requires only one CHMP4 and one CHMP2 family member out of the 12 human ESCRT-III proteins for efficient budding (Morita et al., 2011), in contrast to cytokinesis (Morita et al., 2010). Importantly, CHMP3 depletion had a minor effect and reduced virus titer production only two-fold (Morita et al., 2011), despite the fact that C-terminally truncated CHMP3 and CHMP3-GFP exert potent dominant negative effects on HIV-1 budding (Muziol et al., 2006; Strack et al., 2003; Zamborlini et al., 2006). We extended the previous siRNA study to double knock-downs of CHMP2A, or CHMP2B and CHMP3, which confirmed that CHMP3 acts synergistically with CHMP2 proteins during HIV-1 budding. Notably, the synergy with CHMP2A is significantly higher than that with CHMP2B. Although a direct interaction between CHMP4B and CHMP2A is required for budding in the absence of CHMP3 (Morita et al., 2011), K_D measurements revealed that CHMP3 has a ~ 16-fold higher affinity for CHMP4B than does CHMP2A. In addition, CHMP2A interacts with similar micromolar K_D with both CHMP3 and CHMP4B. Thus our data indicate that when all the ESCRT-III subunits are present, CHMP3 probably preferentially interacts with CHMP4B, which then subsequently recruits CHMP2A. This sequence matches the sequence of yeast ESCRT-III recruitment (Teis et al., 2008). We showed further that CHMP2B also interacts directly with both CHMP4B and CHMP3, and again the dissociation constants are similar to the CHMP2A-CHMP4B interaction. However, we suggest that CHMP3 may be less important for CHMP2B function than for CHMP2A function as

supported by its lower synergistic effect in HIV-1 budding and by the higher affinity of CHMP4B for CHMP2B (vs. CHMP2A). This is consistent with the observation that CHMP2B membrane tube formation from the plasma membrane depends largely on CHMP4 (Bodon et al 2011). Although we showed here that CHMP2B can interact with CHMP3, CHMP3 is not important for CHMP2B membrane tube formation *in vivo*, and the two proteins did not form hetero-polymers *in vitro* (Bodon et al., 2011). These observations are in agreement with the idea that CHMP2A may function preferentially in combination with CHMP3, while CHMP2B function relies much less on CHMP3. Finally, although it is clear that the structural heterogeneity of the CHMP2A-CHMP3 polymers constituted the main limitation for cryo-EM image analysis, this heterogeneity may be important for ESCRT-III function. ESCRT-III polymer(s) presumably cannot be too static; because they may need to be remodeled by VPS4, and/or slide along membranes in order to remodel membranes in a process leading to fission (Elia et al., 2012). Furthermore the CHMP4 filaments appear to be ideally suited to form loose coils whose diameters can vary considerably and thus induce initial constriction that sets the stage for CHMP3-CHMP2A or CHMP2B (CHMP3-CHMP2B) recruitment. These latter polymers form more rigid structures such as dome-like end caps that may be required for the final constriction step (Fabrikant et al., 2009; Lata et al., 2008b). The tilted, lateral interactions between asymmetric units observed in our EM reconstruction permit the build-up of a dome-like or nearly closed cone-like structure that can constrict a membrane bud to a small diameter of 6 nm (**Figure 8**). Such a dome is stabilized via lateral interactions of helical CHMP filaments observed in CHMP2A-CHMP3 and CHMP2B membrane tubes as well as potentially looser interfilament interactions as present in CHMP2A polymers that suffice to spiral the filaments into a constriction dome that can catalyze membrane fission (Fabrikant et al., 2009).

Materials and methods

Protein expression and purification. Expression and purification of full-length CHMP3, CHMP3 Δ C (residues 9-183) (Muziol et al., 2006), MBP-CHMP2A Δ C (residues 9-161) (Lata et al., 2008b) and MBP-CHMP4B Δ C- Δ His (Pires et al., 2009) were performed as described. A final purification step included gel filtration on a superdex 75 column (GE Healthcare) in a buffer containing 20 mM Hepes pH 7.6, 150 mM NaCl. For MBP-CHMP2A Δ C-CHMP3 tube assembly, 10 to 15 μ M of monomeric MBP-CHMP2A Δ C were mixed with 20 to 30 μ M of monomeric CHMP3 as described (Lata et al., 2008b). MBP-CHMP2A Δ C-CHMP3 tubes were separated from monomeric protein by ultracentrifugation or by sucrose gradient centrifugation as described (Lata et al., 2008b). For cryo-EM, MBP was removed from the tubes by incubation with TEV protease at a molar ratio of 1: 5 (TEV:MBP-CHMP2A Δ C). Full length CHMP2B was cloned into the expression vector pETM13 and expressed with a C-terminal His₆ tag. Protein expression was induced in BL21 codon plus cells (Invitrogen), which produced a small amount of CHMP2B in the soluble fraction and the majority in the insoluble fraction. Cell pellets were sonicated in a buffer containing 50 mM Tris pH 7.4, 1M NaCl, 1M KCl, and soluble CHMP2B Δ C was purified by Ni²⁺ chromatography and eluted in a buffer containing 50 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl and 300 mM imidazole. Final purification of the monomeric subunits was achieved by gel filtration on a superdex 75 column (GE Healthcare) in a 20 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl buffer.

Biosensor Binding Experiments. Biosensor binding experiments were performed with SPR detection on a Biacore X instrument (GE Healthcare). Flow rates were 5 μ l/min in a running

buffer containing 20 mM Hepes pH 7.6, 150 mM NaCl, 50 μ M EDTA, 0.005% P20. MBP-CHMP2A Δ C and MBP-CHMP4B Δ C-*Aflx* were biotinylated with biotin sulfo-LC-NHS (Thermo Scientific) for 1h at 4°C at a molar ratio of 1:5 (labeling only 1/5th of the total available lysine residues). Free biotin was removed by extensive dialysis. A CM5 chip (GE Healthcare) was coated with streptavidin (Sigma) (0.1 μ g/ml) to ~ 6000-8000 response units in both flow cells, followed by ethanolamine injection. One of the flow cells containing the streptavidin-derivatized chip received approximately 200 RU of either biotinylated MBP-CHMP2A or 800-1000 RU of biotinylated MBP-CHMP4B Δ C-*Aflx*. His-CHMP3 and MBP-CHMP2A analytes were dialyzed against running buffer. 70 or 90 μ l of CHMP solution dilutions (430 nM to 43 μ M) were injected at the concentrations indicated (Figure S6). Global fitting of the curves using the BiaEvaluation software package (BIAcore Inc) and a 1:1 Langmuir model did not produce satisfactory fits, so we therefore averaged the equilibrium plateau responses of the binding curves (658 to 830 seconds for (CHMP2A-CHMP3); 1057 to 1197 seconds (CHMP4B-CHMP2A) and 1030 to 1170 seconds (CHMP4B-CHMP3)). The resulting RU values were used for non-linear least squares analyses to determine equilibrium binding constants. Chips were regenerated by 60 seconds washes in 20 mM Hepes pH 7.6, 1 M NaCl at a flow rate of 50 μ l/min.

Interactions between CHMP2B-His₆, with MBP-CHMP4B Δ C-*Aflx* and CHMP3 Δ C were performed in a buffer containing 10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20. MBP-CHMP4B Δ C-*Aflx* and CHMP2B-His₆ were immobilized at levels of 500 and 600 RU in a sodium acetate buffer, pH 4.5, on an activated CM-5 sensor chip according to the manufacturer's instructions. Specific binding to the target protein was corrected for nonspecific binding to the deactivated control channel. The flow rate was 10 μ l/min and dissociation was recorded over 10 minutes. The sensor chip was regenerated with 2 M NaCl for 60 seconds at a

flow rate of 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Binding kinetics were evaluated using the BiaEvaluation software package (BIAcore, Inc.) using a Langmuir model 1:1 with no mass transfer.

HIV-1 Production from Cells Depleted of CHMP2 and CHMP3 Proteins. siRNA depletion experiments followed the protocol given in Morita et al. 2011 (Morita et al., 2011), and the following siRNAs were used: CHMP2-395A (AGGCAGAGAUCAUGGAU AUtt), CHMP2B-45 (GGAACAGAAUCGAGAGUUAtt), and CHMP3-474 (GGAAGAAGCA GAAAUGGAAtt), where "tt" denotes two overhanging deoxyribothymidines. Each siRNA was used at 10nM final concentrations in 2ml cultures (i.e., 20 nM total siRNA in the co-transfection reactions).

Cryo-EM image acquisition. 3.5 μl sample was applied on the carbon side of a quantifoil grid, previously glow discharged for 1 min. The sample was then blotted and plunge-frozen in liquid ethane using a vitrobot Mark II (FEI). Grids were stored in a liquid nitrogen dewar until they were loaded either in a Philips CM200 with LaB₆ filament operating at 200kV or in a FEI Polara with a FEG operating at 300kV. Images were acquired under low dose conditions at magnifications of 39.5k for data recorded on CM200 (dataset 1), and 39k (dataset 2) or 59k (dataset 3) for data recorded on the FEI Polara. Cryo-EM micrographs were recorded on KODAK SO-163 Film.

Image preprocessing. Negatives were checked for drift and good spreading and tubes numbers. Films were digitized on a Zeiss scanner at either 14 μm for dataset 1 or 7 μm for datasets 1 and 2, giving pixel sizes of 3.54, 1.79 and 1.19 $\text{\AA}/\text{pixel}$ respectively at the specimen level. Scanned

images were screened by evaluating their power spectra for the absence of drift or excessive astigmatism. Segments of tubes were picked from micrographs in consecutive overlapping (96.5% overlap) boxes of 200, 400 and 600 pixels with *boxer* from the EMAN package, giving 17942, 23265 and 9184 boxes for datasets 1, 2 and 3, respectively (Ludtke et al., 1999). CTF parameters were determined for each micrograph using CTFFIND3 (Mindell and Grigorieff, 2003) and extracted images were phase-flipped with *bctf*, bandpass filtered to 20Å and normalized with *bfilter* from the BSOFIT package (Heymann and Belnap, 2007). The images were made vertical by calculating the in-plane rotation angle using the coordinates of the extremities of the tubes calculated from the *boxer* parameter file. A soft-edge mask was applied prior to further processing.

2D image classification. The same method was applied for the 3 datasets, but datasets 2 and 3 were binned 2 and 3 times, respectively. The vertical images were initially classified in SPIDER (Shaikh et al., 2008) by correspondence analysis, hierarchical clustering by the ward criteria, and averaging to generate first crude classes. These classes were used as references for a multi-reference alignment (Adams et al., 2009; Effantin et al., 2009; Hierro et al., 2007). An integer value was derived from the alignment parameter file for the translation in X and applied to the raw images to improve their centering. The same procedure of classification, multi-reference alignment and application of X shifts was repeated a second time. The vertically centered images were then classified in IMAGIC (van Heel et al., 1996) by multivariate statistical analysis, classification, averaging and multi-reference alignment. In the final round, the datasets were classified into 150 classes.

Helical symmetry analysis. 2D Fourier transforms were calculated with *bfft* from BSOFIT. Positions (from the equator and the meridian) and phase differences (0 or 180°) of the strongest layer line were measured in *bshow*. The first maximum of the Bessel function (hence its order n using the phase difference) was estimated according to the formula $J_{\max} = 2\pi rR$ with r : distance from the meridian to the first major layer line in \AA^{-1} and R : real space radius in \AA .

To estimate the pitch of the structure, we follow a previously described method (Desfosses et al., 2011). The selected 2D class average was first carefully centered, vertically aligned and a soft-edged mask was applied. The method probes iteratively which pair of helical parameter (axial rise per subunit/azimuthal angle or pitch/number of subunit per pitch) gives the best match with the class average. For pitch estimation, we fixed the number of subunits per turn to 100 and varied only the pitch. Then, the helically related copies of the class average were generated using the helical parameter pair to be tested, and the stack of images was used to calculate a 3D reconstruction. 2D projections of the 3D model were computed and compared to the original stack of images to calculate an overall normalized correlation coefficient. The same procedure was repeated for all the pitch value to be tested and the maximum correlation is taken as the most likely pitch for the selected class average.

3D reconstruction. Dataset 2, being the largest, was selected for further processing. The 485 \AA diameter group was the most populated among the dataset after 2D classification. This group was combined with the 480 \AA group to give a 4910 segment dataset that was used for 3D reconstruction. The best 3D model derived from the pitch search described above was used as an initial reference for a projection matching approach in SPIDER, implementing *hsearch* and *himpose* programs from the IHRSR approach (Egelman, 2007; Egelman, 2010). The 3D

reconstruction was arbitrarily chosen as right handed. Great care was taken to check that segments belonging to the same tube had the same polarity (or else they were discarded). Raw vertical images were used and images having an in-plane angle larger than 5° were also removed. Consecutive segments from the same tube that matched the same reference projection were also discarded. The distribution of the number of particles per reference was plotted at each iteration and any over represented views were truncated. The Fourier Shell Correlation between two independent reconstructions was calculated at each iteration and the 3D reconstruction filtered to the value found at $FSC=0.5$ before the helical symmetry search and imposition. Despite changing the starting value for the number of subunits per turn, the IHRSR helical parameter search converged repeatedly to an axial rise $z = 6.03 \text{ \AA}$ and an azimuthal angle $\phi = 11.9^\circ$. The final 3D reconstruction includes 2145 segments, (corresponding to 19274 unique asymmetric units) for a calculated resolution of 22 \AA at $FSC = 0.5$.

Docking. The fitting of CHMP3 core domain (residues 1-140, PDB: 2GD5 (Pettersen et al., 2004) was performed with CHIMERA (Pettersen et al., 2004) and the SITUS package (Wriggers et al., 1999). The CHMP3 monomer was cropped to residues 1 – 140 to remove the auto-inhibitory region which was shown to prevent polymer formation and first placed semi-automatically in the cryo-EM density map using the *Fit in map* tool of CHIMERA. This position was then refined in SITUS. Helically symmetric copies of the monomer were generated with the *pdbsymm* command and the position of the individual copies was refined with the *collage* program. The two commands were repeated 10 cycles to ensure that the position of the fitted molecule did not change from iteration to iteration.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-01; W.W. and G.S.), the DFG SPP1175 (W.W.), the Labex GRAL (G.S.; W.W.) and NIH grants ROI AI051174 and P50 6M 082545 (W.I.S). G.E. is supported by a post doctoral fellowship from the Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS). We thank D. Lutje-Hulsik for help with SPR measurements and A. Desfosses for help and suggestions on helical image analysis. We acknowledge the Partnership for Structural Biology (PSB; <http://www.psb-grenoble.eu>) for access to the electron microscopy and biophysics platforms. The Polara microscope is part of the IBS Structural Biology and Dynamics GIS-IBISA-labeled platform.

Author contributions. W.W, G.S. and W.I.S. conceived the experiments. G.E, A.D, V.S. and N.M. performed experiments. G.E. performed the electron microscopy analyses. W.W., G.S., G.E., V.S. and W.I.S. analyzed data. G.E. and W.W. wrote the paper with help from G.S. and W.I.S.

References

- Adams, P., Kandiah, E., Effantin, G., Steven, A.C. and Ehrenfeld, E. (2009) Poliovirus 2C protein forms homo-oligomeric structures required for ATPase activity. *J Biol Chem*, **284**, 22012-22021.
- Babst, M., Davies, B.A. and Katzmann, D.J. (2011) Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic*, **12**, 1298-1305.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T. and Emr, S.D. (2002) ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell*, **3**, 271-282.
- Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.M., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P. and Sundquist, W.I. (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 754-762.

- Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P.W., Krausslich, H.G., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D.C. (2011) Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol*, **13**, 469-474.
- Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Lutje Hulsik, D., Belly, A., Goldberg, Y., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Schoehn, G., Weissenhorn, W. and Sadoul, R. (2011) Charged Multivesicular Body Protein 2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) Polymerizes into Helical Structures Deforming the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 40276-40286.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M. and Martin-Serrano, J. (2012) ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*, **336**, 220-225.
- Desfosses, A., Goret, G., Farias Estrozi, L., Ruigrok, R.W. and Gutsche, I. (2011) Nucleoprotein-RNA orientation in the measles virus nucleocapsid by three-dimensional electron microscopy. *J Virol*, **85**, 1391-1395.
- Effantin, G., Rosenzweig, R., Glickman, M.H. and Steven, A.C. (2009) Electron microscopic evidence in support of alpha-solenoid models of proteasomal subunits Rpn1 and Rpn2. *J Mol Biol*, **386**, 1204-1211.
- Egelman, E.H. (2007) The iterative helical real space reconstruction method: surmounting the problems posed by real polymers. *J Struct Biol*, **157**, 83-94.
- Egelman, E.H. (2010) Reconstruction of helical filaments and tubes. *Methods Enzymol*, **482**, 167-183.
- Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M.M. and Lippincott-Schwartz, J. (2012) Computational Model of Cytokinetic Abscission Driven by ESCRT-III Polymerization and Remodeling. *Biophysical Journal*, **102**, 2309-2320.
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A., Weissenhorn, W. and Kozlov, M.M. (2009) Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol*, **5**, e1000575.
- Ghazi-Tabatabai, S., Obita, T., Pobbati, A.V., Perisic, O., Samson, R.Y., Bell, S.D. and Williams, R.L. (2009) Evolution and assembly of ESCRTs. *Biochem Soc Trans*, **37**, 151-155.
- Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J.M., Pobbati, A.V., Veprintsev, D.B., Crowther, R.A., Emr, S.D., Egelman, E.H. and Williams, R.L. (2008) Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure*, **16**, 1345-1356.
- Guizetti, J. and Gerlich, D.W. (2010) Cytokinetic abscission in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*, **21**, 909-916.
- Guizetti, J. and Gerlich, D.W. (2012) ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol*, **22**, 133-140.
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Muller-Reichert, T. and Gerlich, D.W. (2011) Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments. *Science*, **331(6024)**, 1616-1620.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y. and Heuser, J.E. (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*, **180(2)**, 389-402.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J. and Emr, S.D. (2011) The ESCRT pathway. *Dev Cell*, **21**, 77-91.

- Heymann, J.B. and Belnap, D.M. (2007) Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol*, **157**, 3-18.
- Hierro, A., Rojas, A.L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A.V., Steven, A.C., Bonifacino, J.S. and Hurley, J.H. (2007) Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*, **449**, 1063-1067.
- Hurley, J.H. and Hanson, P.I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 556-566.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D. and Simon, S.M. (2011) Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol*, **13**, 394-401.
- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J. and Sundquist, W.I. (2008) Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell*, **15**, 62-73.
- Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H.G., Svergun, D.I. and Weissenhorn, W. (2008a) Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol*, **378**, 818-827.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G. and Weissenhorn, W. (2008b) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science*, **321**, 1354-1357.
- Lin, Y., Kimpler, L.A., Naismith, T.V., Lauer, J.M. and Hanson, P.I. (2005) Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem*, **280**, 12799-12809.
- Lindas, A.C., Karlsson, E.A., Lindgren, M.T., Etema, T.J. and Bernander, R. (2008) A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(48), 18942-18946.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. and Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, **128**, 82-97.
- Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguet, N., Avilov, S.V., Ribeiro, E.A., Jr., Gottlinger, H. and Weissenhorn, W. (2012) CC2D1A Is a Regulator of ESCRT-III CHMP4B. *J Mol Biol*, **419**, 75-88.
- Martin-Serrano, J. and Neil, S.J. (2011) Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol*, **9**, 519-531.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D. and Bieniasz, P.D. (2003) Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12414-12419.
- McDonald, B. and Martin-Serrano, J. (2009) No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J Cell Sci*, **122**, 2167-2177.
- Mindell, J.A. and Grigorieff, N. (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol*, **142**, 334-347.
- Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K. and Sundquist, W.I. (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Nat Acad Sci. U.S.A.*, **107**, 12889-12894.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I. and Sundquist, W.I. (2011) ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host Microbe*, **9**, 235-242.
- Morita, E. and Sundquist, W.I. (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 395-425.

- Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H. and Weissenhorn, W. (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell*, **10**, 821-830.
- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N. and Weissenhorn, W. (2011) Divergent pathways lead to ESCRT-III catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci*, **36**, 199-210.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605-1612.
- Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D.I., Gottlinger, H.G. and Weissenhorn, W. (2009) A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*, **17**, 843-856.
- Ren, X. and Hurley, J.H. (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J*, **29**, 1045-1054.
- Saksena, S., Sun, J., Chu, T. and Emr, S.D. (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci*, **32**, 561-573.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E. and Emr, S.D. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, **136**, 97-109.
- Shaikh, T.R., Gao, H., Baxter, W.T., Asturias, F.J., Boisset, N., Leith, A. and Frank, J. (2008) SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nat Protoc*, **3**, 1941-1974.
- Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B.A., Katzmann, D.J. and Babst, M. (2010) Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol Biol Cell*, **21**, 1059-1071.
- Shim, S., Kimpler, L.A. and Hanson, P.I. (2007) Structure/Function Analysis of Four Core ESCRT-III Proteins Reveals Common Regulatory Role for Extreme C-Terminal Domain. *Traffic*, **8**, 1068-1079.
- Strack, B., Calistri, A., Popova, E. and Gottlinger, H. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689 - 699.
- Teis, D., Saksena, S. and Emr, S.D. (2008) Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Dev Cell*, **15**(4), 578-589.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W. and G., G.H. (2009) The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem Soc Trans*, **37**, 181-184.
- van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E.V., Schmidt, R. and Schatz, M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J Struct Biol*, **116**, 17-24.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimborra, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G. and Sundquist, W.I. (2003) The protein network of HIV budding. *Cell*, **114**, 701-713.
- Wollert, T. and Hurley, J.H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, **464**(7290), 864-869.
- Wriggers, W., Milligan, R.A. and McCammon, J.A. (1999) Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J Struct Biol*, **125**, 185-195.

- Xiao, J., Chen, X.W., Davies, B.A., Saliel, A.R., Katzmann, D.J. and Xu, Z. (2009) Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol Biol Cell*, **20**, 3514-3524.
- Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G. and Gottlinger, H. (2006) Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19140-19145.

Figure legends

Figure 1: Structural diversity of CHMP2AΔC-CHMP3 co-polymers.

- (A) Cryo-EM raw image of CHMP2AΔC-CHMP3 tubes after removal of MBP from CHMP2AΔC reveals the structural heterogeneity; (*) highlights a cone shaped structure and (^) highlights a tube with continuous variation in dimensions.
- (B) Histogram of the number of tubes with each diameter from one dataset after 2D classification by multivariate statistical analysis.
- (C) Representative 2D class averages obtained after 2D classification of one of the three datasets. Brackets delineate classes with typical line and column patterns.
- (D) Representative class averages for a second dataset (corresponding to the histogram shown in B). The numbers on top of each image mark the position of the different columns seen in each class. The number of columns increased with the diameter of the tubes, but could also vary for classes having the same diameter. Diameters of each class are indicated on each individual image. Scale bars in A, C and D are 400 Å.

Figure 2: 2D Fourier transform provides evidence for differences in helical packing.

(A) 2D class averages representing the line-pattern and (B) the column pattern, and their corresponding 2D Fourier transformations. The heights of the first layer line seen in the 2D Fourier transformations and the measured Bessel order (n) are indicated.

Figure 3: 3D reconstruction of CHMP2A-CHMP3 tubes (column pattern, $n=6$)

(A) Isosurface representation (blue) of the 3D reconstruction of a tube having a 485 Å average diameter. The raise of 1 helical turn is indicated in pink and two helically related asymmetric units are colored green and red, respectively. (B) Same isosurface as shown in (A) rotated by 30° provides insight into the tube. Scale bar is 100 Å.

(C-D) Close-up of the linear monomer-monomer interaction and the lateral inter-filament contacts. C is the same view as B and D the same as A, but looking from the inside. Scale bar is 50 Å

Figure 4: Docking of the CHMP3 structure (helices 1 to 4) into the cryo-EM map.

(A – D) Zoomed views on the docked monomers inside the cryo-EM map. The cryo-EM density is shown as an isosurface in transparent grey color. Adjacent CHMP3 monomers are shown in green and red ribbons. (A) Front view. (B) Same orientation as shown in (A) viewed from the inside; the dotted lines mark the positions of grooves between consecutive strands. (C) Top view, the curved line indicates the membrane binding surface. (D) Part of a grey-scaled 2D section from the cryo-EM map viewed along the helical axis (corresponding to the orientation in C). One helical asymmetric unit is highlighted (contoured line). Scale bars are respectively 50 Å in panels A to C and 100 Å in panel D.

Figure 5: Conserved filament organization of ESCRT-III.

(A) Negative stained image of CHMP2B Δ C polymers. (B) Gallery of spiral structures formed by CHMP2A Δ C obtained by negative staining electron microscopy and cryo-EM (C). CHMP2A Δ C forms 30 Å-thick strings, which are similar to the width of CHMP2B and CHMP2A Δ C-CHMP3 filaments. Scale bars are 400 Å.

Figure 6: CHMP2A Δ C-CHMP3 polymerization into tubes renders CHMP2A and CHMP3 protease resistant.

(A) Trypsin and proteinase K proteolysis of CHMP2A Δ C-CHMP3 tubes. Right panel: lane 1, no trypsin; lanes 2 to 4 trypsin: CHMP2A Δ C-CHMP3 tube ratios of 1:70; 1:35 and 1:20 (w/w), respectively. Right panel: lane 1, no proteinase K; lanes 2-5, proteinase K ratios of 1:500, 1:250, 1:100 and 1:50 (w/w), respectively. (CHMP2A Δ C (°); CHMP3 bands produced by trypsin (*) and Proteinase K (Δ) digestion)

(B) Trypsin and proteinase K proteolysis of CHMP3. Right panel: lane 1, no trypsin; lanes 2-4, trypsin: CHMP3 ratios of 1:70, 1:35 and 1:20 (w/w), respectively.

(C) Trypsin and proteinase K proteolysis of MBP-CHMP2A Δ C. Lane 1, no trypsin; lanes 2 and 3 trypsin/MBP-CHMP2A Δ C ratios of 1:100 and 1:50 (w/w); lanes 4 and 5, proteinase K/MBP-CHMP2A Δ C ratios 1:100 and 1:50 (w/w). (MBP bands after proteolysis (*)).

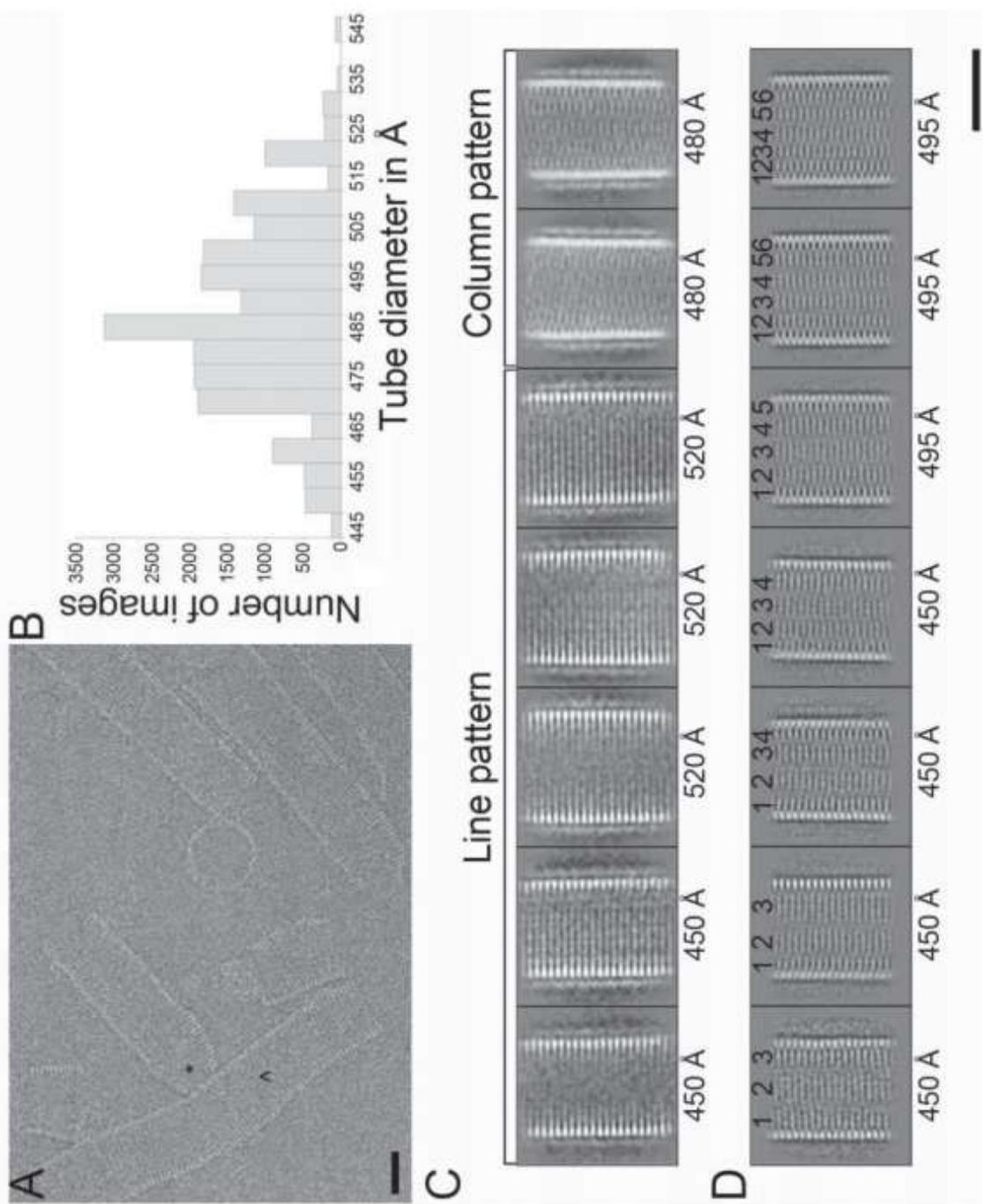
Figure 7: ESCRT-III CHMP3 exerts a synergistic effect on ESCRT-III CHMP2A and CHMP2B during HIV-1 budding.

293T cells expressing HIV-1 were treated either with control siRNAs (lanes 1 and 2) or with siRNAs that target the indicated ESCRT-III CHMP family members (lanes 3-8). (A) viral titers,

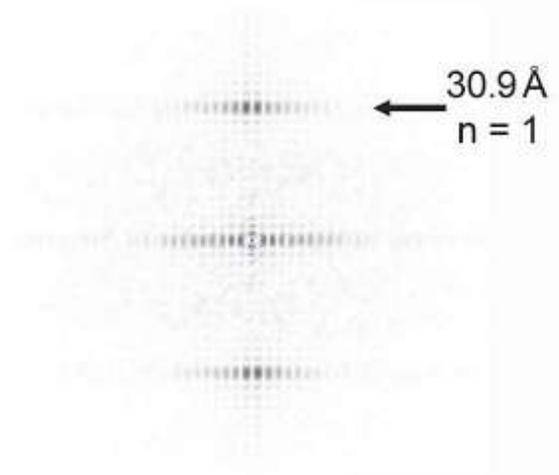
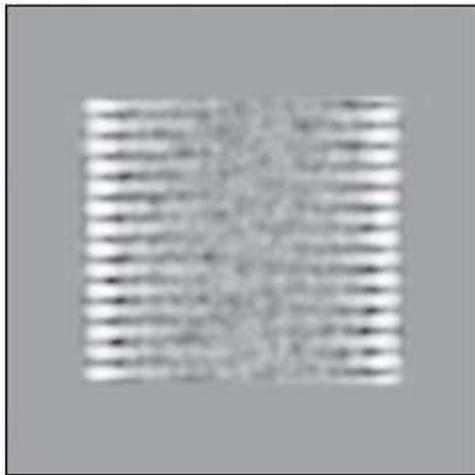
n=6 titer measurements from two independent experiments; (B) western blot analyses of virion-associated CA and MA proteins released into the cell culture supernatant; (C) western blot analyses of intracellular viral Gag derived proteins (panels B and C, anti-MA and anti-CA Abs) and expression levels of cellular GAPDH (loading control); (D) Western blot analyses of endogenous cellular ESCRT-III CHMP2A, CHMP2B and CHMP3 protein levels, corresponding to the designated lanes of the upper blots.

Figure 8. Model of a CHMP2A-CHMP3 dome-like polymer constricting a membrane bud.

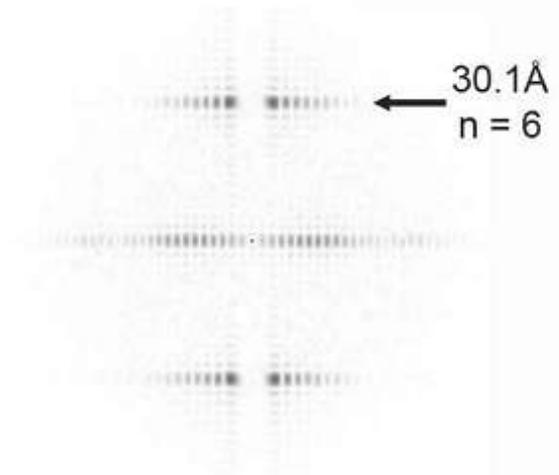
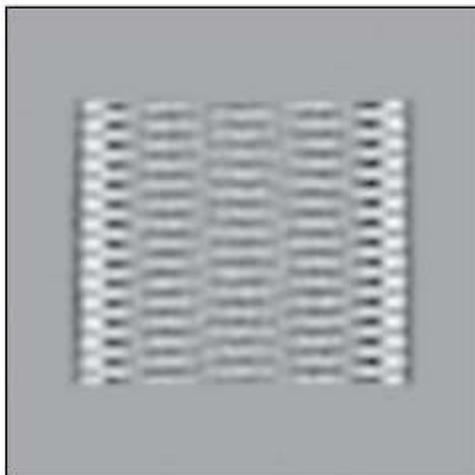
(A) The arrangement is based on the EM reconstruction and indicates that the individual asymmetric units may induce constriction via variations in their lateral interactions. Constriction is limited by the external length of the asymmetric unit. (B) View inside the polymer that shows the long axis of the asymmetric unit perpendicular to the cone axis.

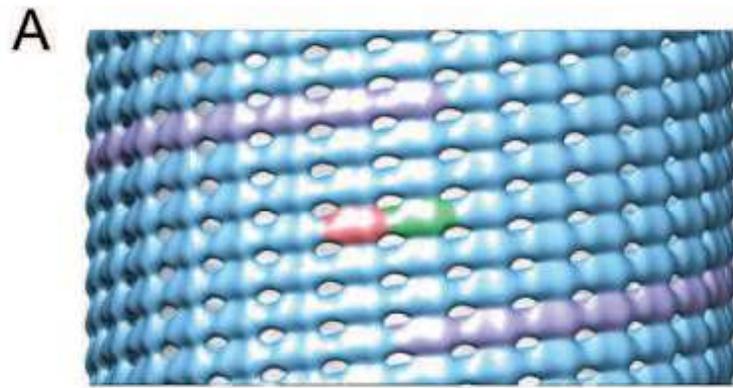


A

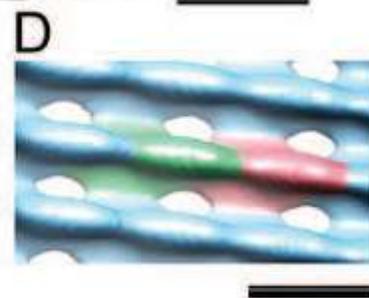
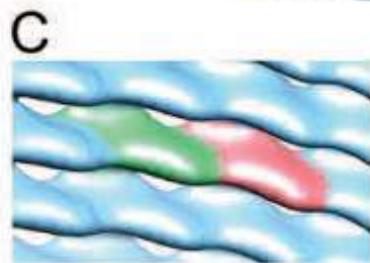
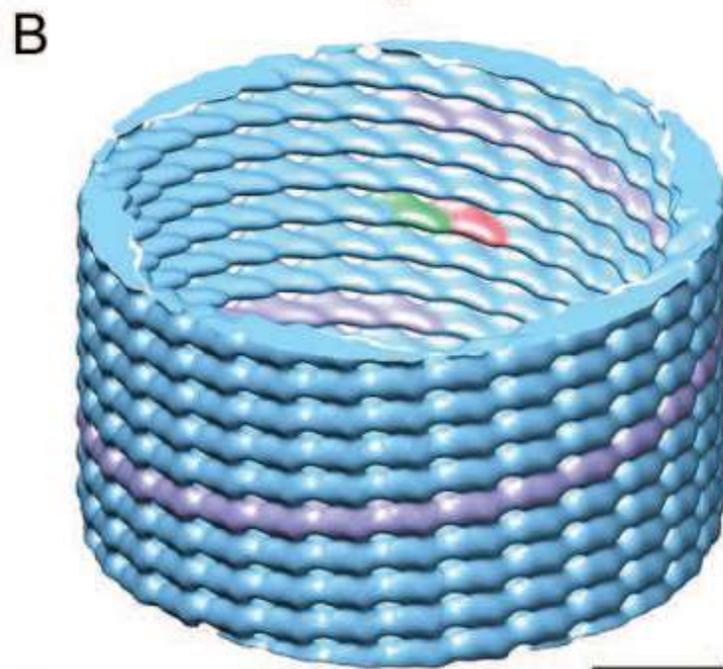


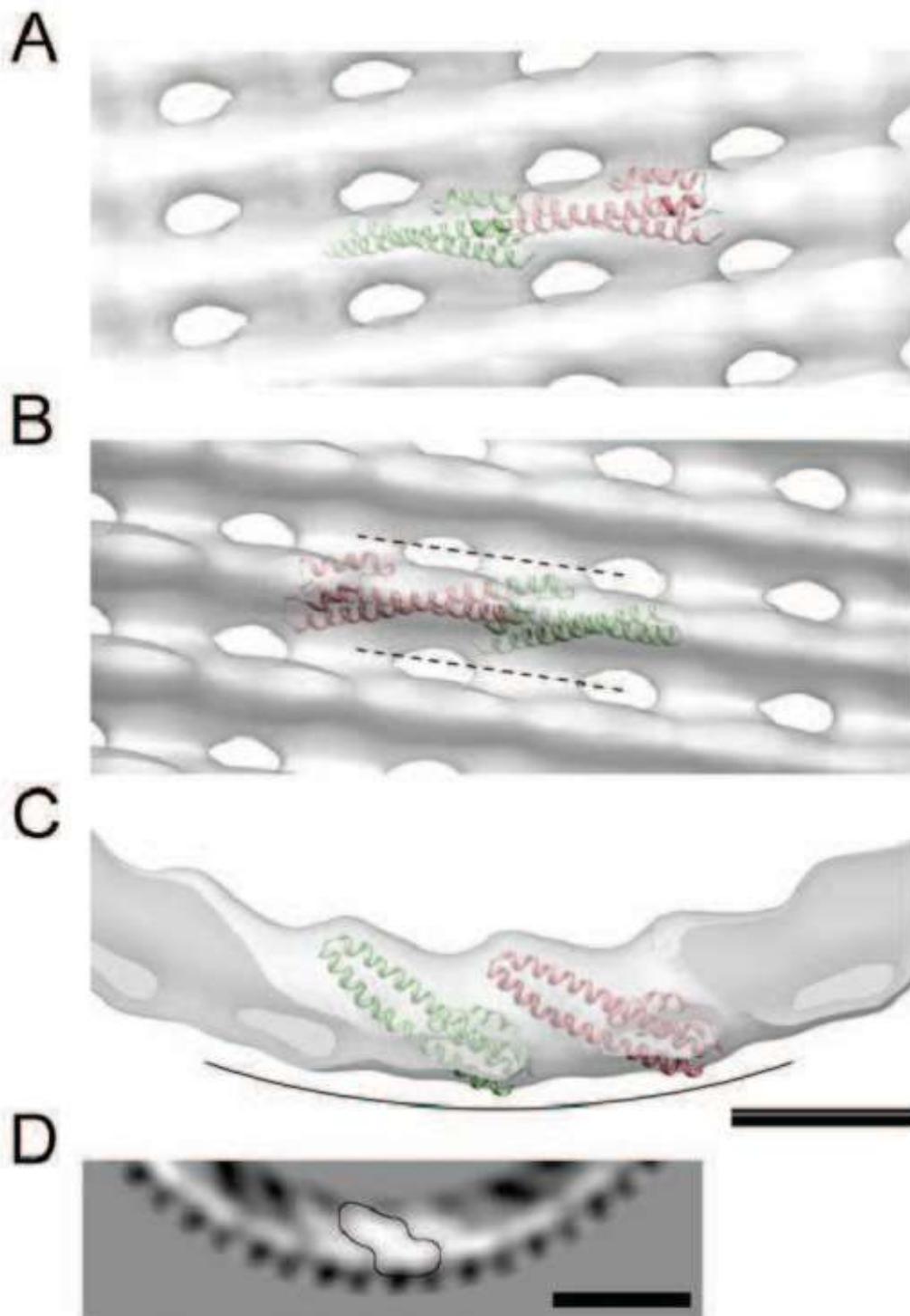
B

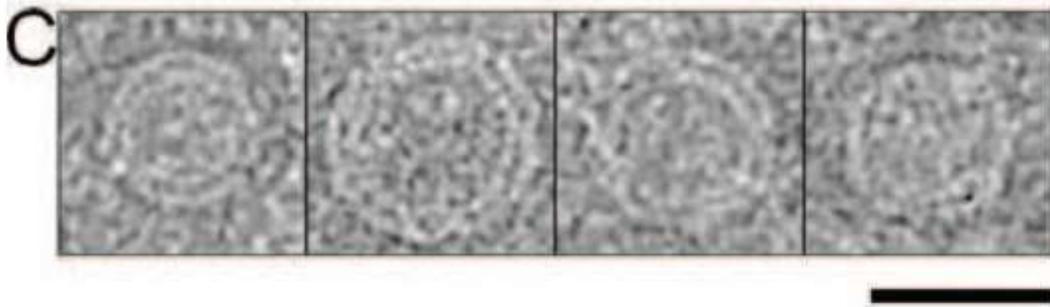
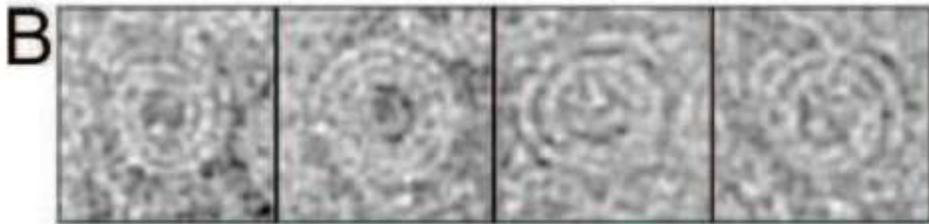
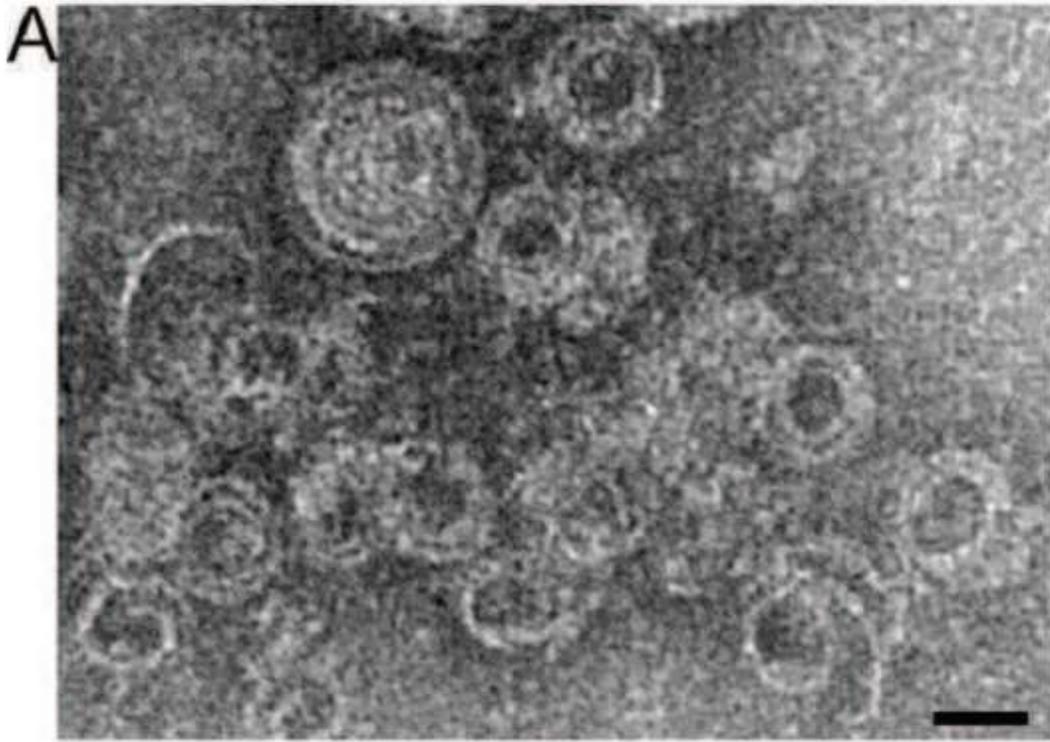


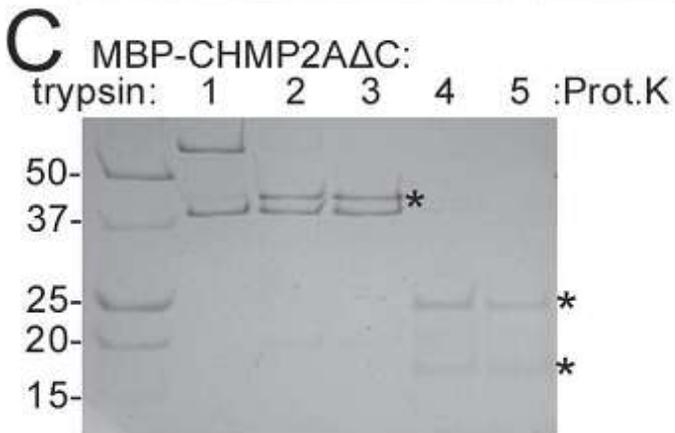
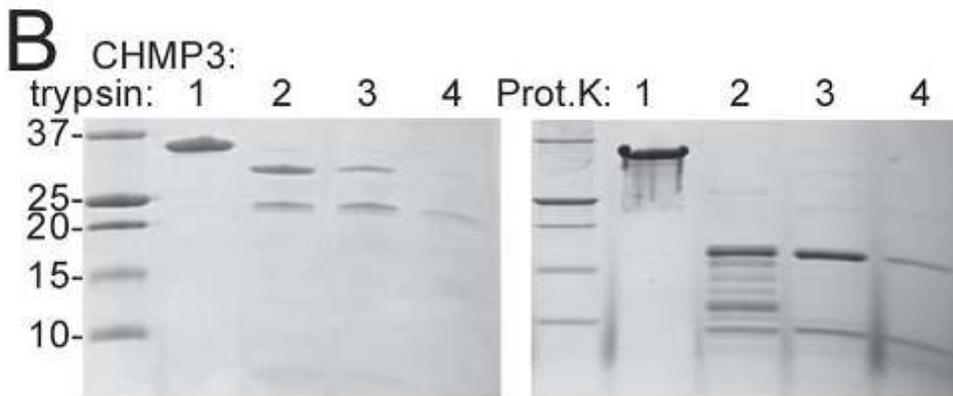
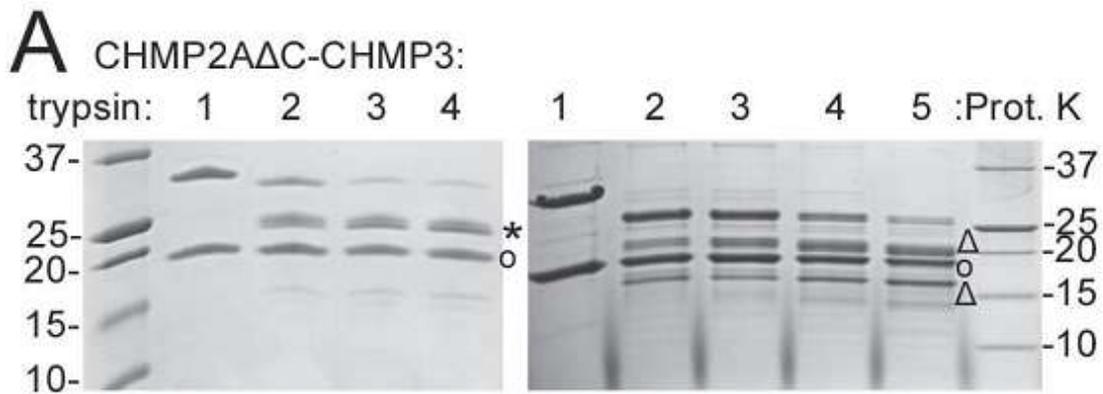


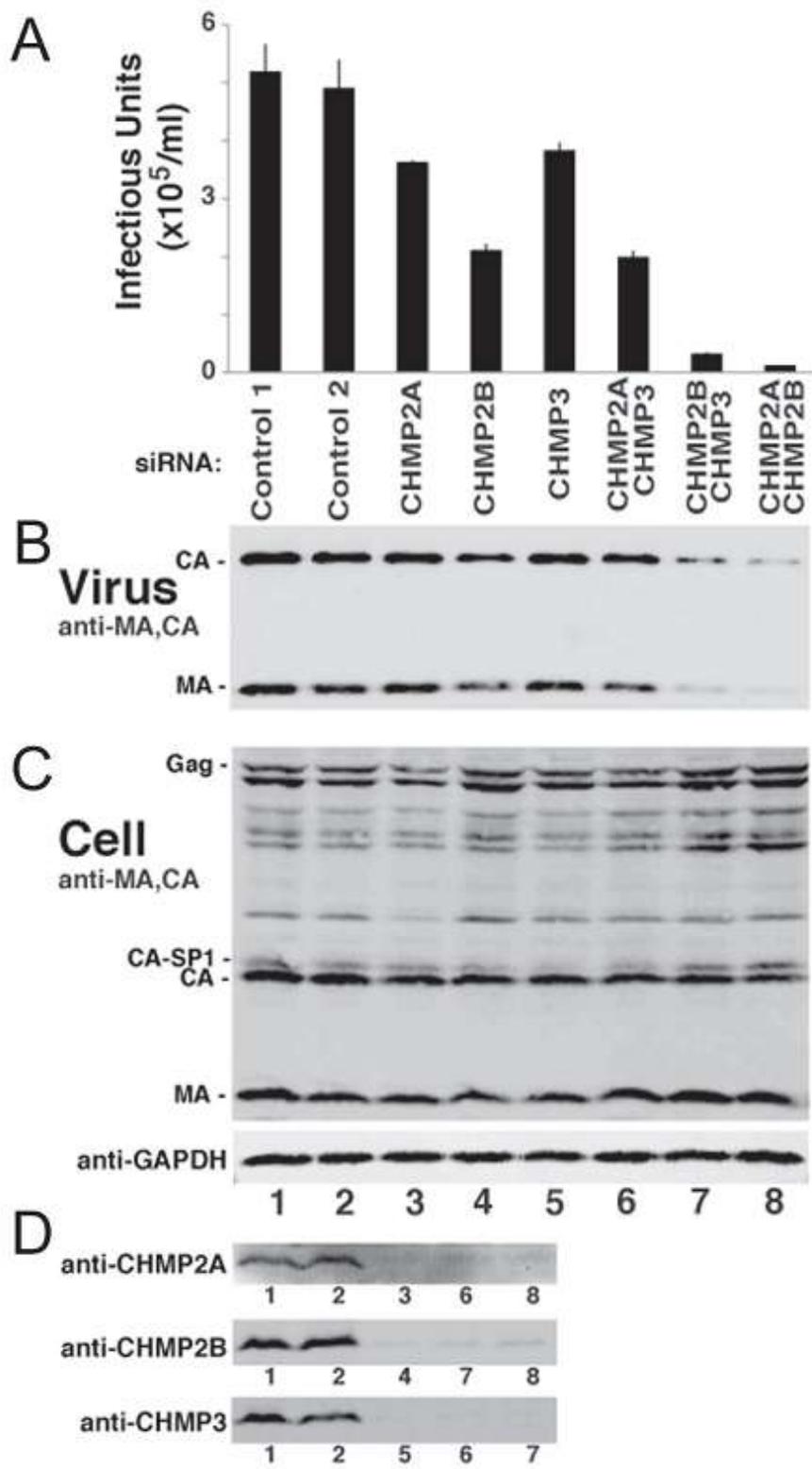
ψ

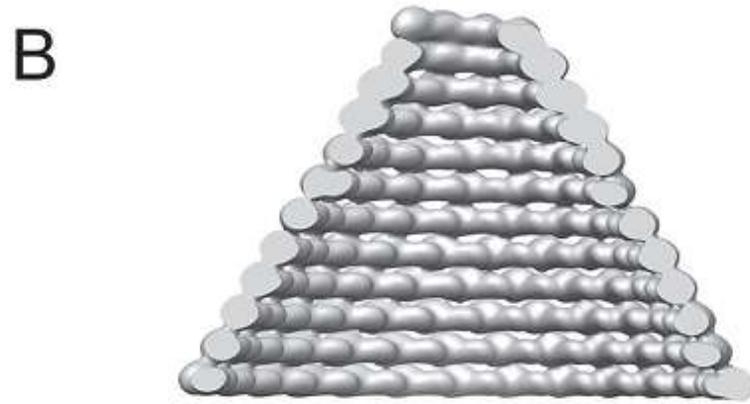
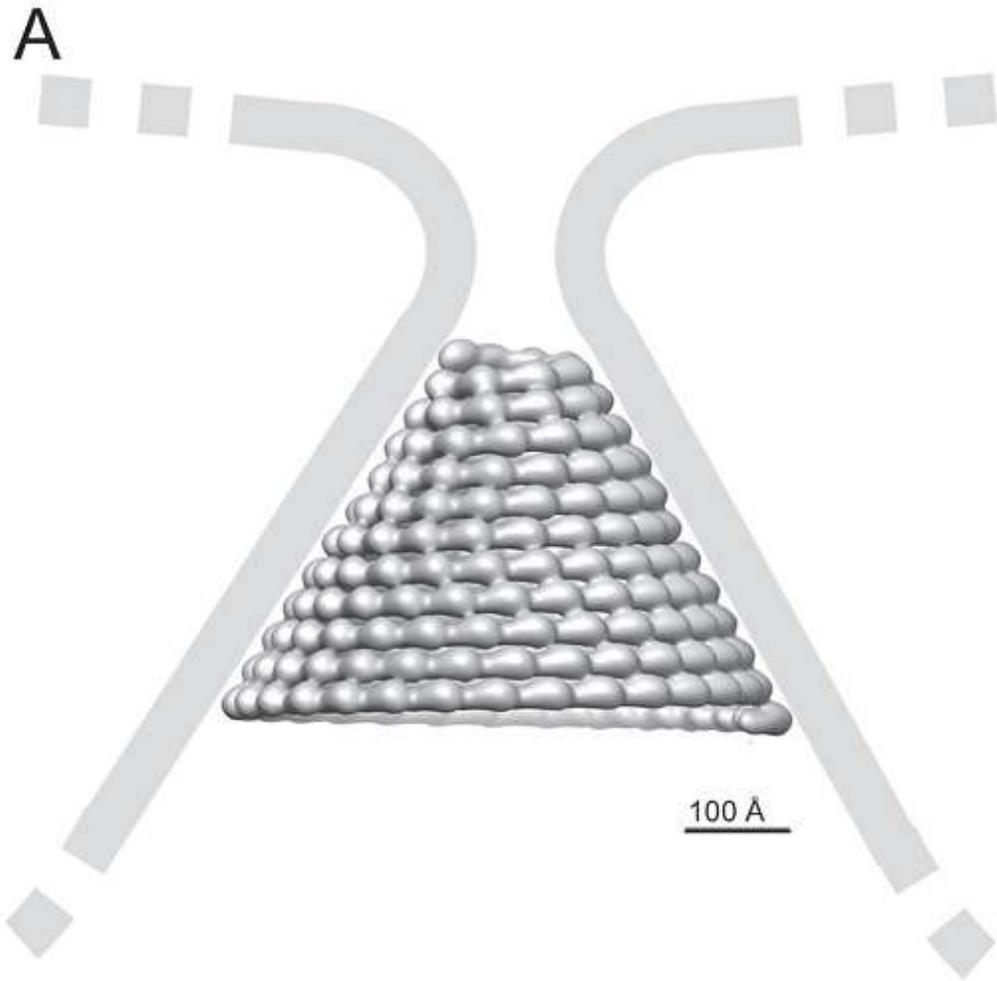












Supplementary material for:

ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers *in vitro* and act synergistically during HIV-1 budding

Grégory Effantin^{1,7}, Aurélien Dordor^{1,7}, Virginie Sandrin^{2,7}, Nicolas Martinelli¹, Wesley I. Sundquist², Guy Schoehn^{1,3,4,5} and Winfried Weissenhorn^{1,6}

Inventory of Supplementary Material:

Supplementary Figures 1 - 6

Figure S1:



Figure S1: TEV protease removes MBP and the His tag efficiently from MBP-CHMP2AΔC-His-CHMP3 tubes. Removal of MBP cleavage from MPB-CHMP2AΔC by TEV protease was monitored over a period of 4 hours by SDS PAGE analysis. The identity of each band is labeled on the right and the molecular weight markers are indicated.

No significant differences in tube diameters were observed when tubes with completely removed MBP were compared to tubes with partially (~70%) removed MBP (data not shown).

Figure S2:

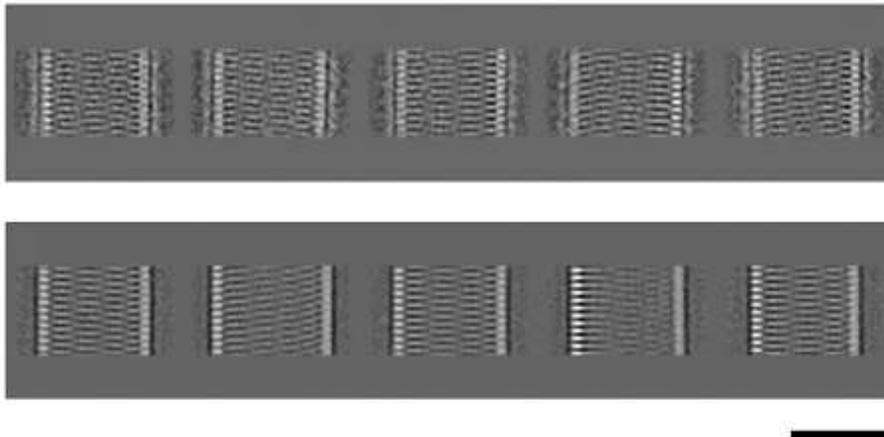


Figure S2: The presence or absence of MBP does not change the 2D class averages of CHMP2AΔC-CHMP3 tubes. Examples of five 2D class averages of CHMP2AΔC-CHMP3

tubes obtained after 2D classification of cryo-EM images of tubes with MBP attached to CHMP2A Δ C (upper panel) and tubes in which MBP was removed by TEV protease cleavage (lower panel). Both tube populations (uncleaved and cleaved) derived from the same purification batch. Scale bar is 400 Å.

Figure S3:

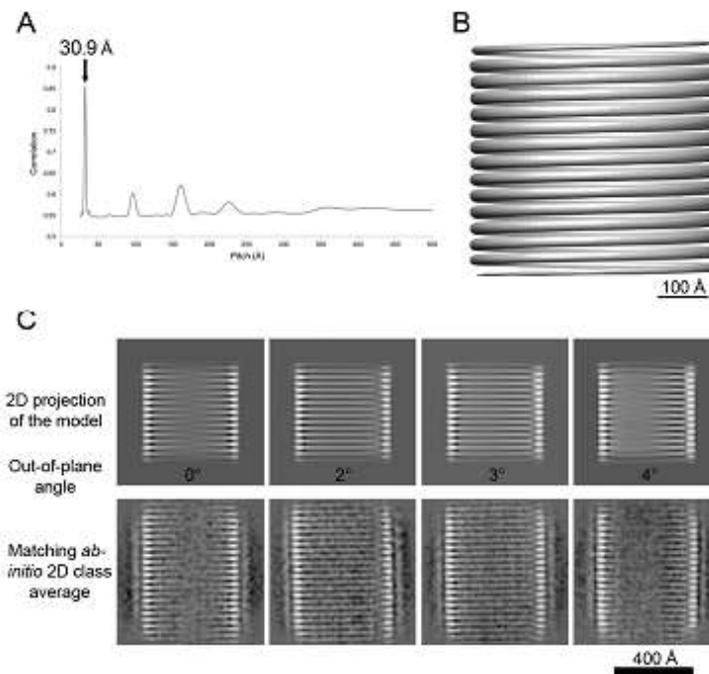


Figure S3: CHMP2A-CHMP3 tubes giving rise to the line-like pattern class average are best described by a 1-start helix with a 30.9-Å-pitch.

(A) Correlations calculated between the 2D class average (shown in Figure 2A) and the in-plane 2D projections of 3D models as a function of the pitch of the computed 3D models. The value of the pitch resulting in the highest correlation is indicated.

(B) Structural model of a helical tube with a pitch of 30.9 Å, producing a maximum correlation (as indicated in A) is shown as an isosurface in grey; the surface of the model appears smooth as an arbitrary 100 subunits per turn have been imposed.

(C) Examples of 2D projections of the 3D model shown in (B) calculated at different out-of-plane angles (indicated at the bottom of each 2D projection image). *Ab-initio* 2D class averages calculated independently from the 3D model that match well with some of the out-of-plane 2D projections are also shown to further highlight the correctness of the pitch estimated in Å.

Figure S4:

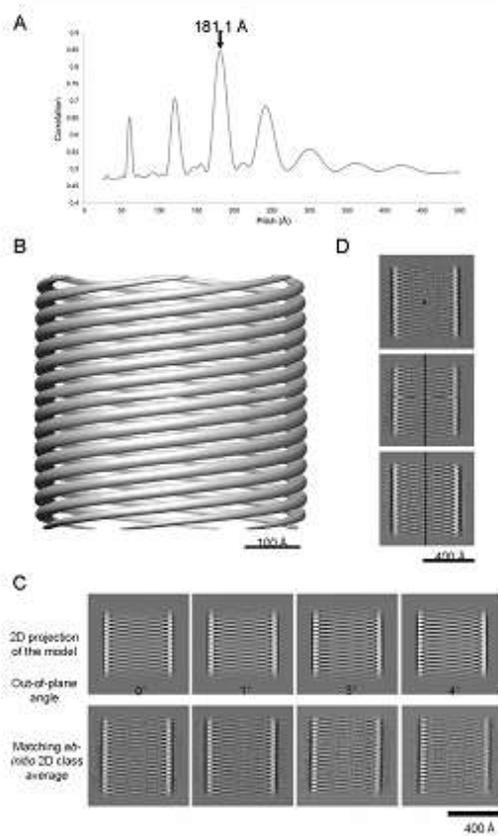


Figure S4: CHMP2A-CHMP3 tubes giving rise to the column-like pattern class average with 5 columns are best described by a 6-start helix having a 181-Å-pitch. (A) Calculated correlations between the 2D class average (shown in Figure 2B) and the in-plane 2D projections of 3D models as a function of the pitch of the computed 3D models. The value of the pitch resulting in the highest correlation is indicated.

(B) Structural model of a helical tube with a pitch of 181.1 Å, producing a maximum correlation (as indicated in A) is shown as an isosurface in grey; the surface of the model appears smooth because an arbitrary 100 subunits per turn were imposed.

(C) Examples of 2D projections of the 3D model shown in (B) calculated at different out-of-plane angles (indicated at the bottom of each 2D projection image). *Ab-initio* 2D class averages calculated independently from the 3D model and matching well with some of its out-of-plane 2D projections are also shown to further highlight the correctness of the pitch estimated in Figure 2.

(D) Evidence of rotational symmetry of the order n (C_n) along the helical axis of the tube; 2D class averages displaying inversion symmetry (the inversion center is represented as a dot) and mirror symmetry (the mirror plane is represented as a continuous line).

Figure S5: Characteristics of 3D reconstructions of CHMP2AAC-CHMP3 tubes.

(A) Plot of the Fourier Shell Correlation (FSC) as a function of resolution (in log scale) calculated between two independent 3D reconstructions. The resolution at $FSC=0.5$ is 22.4 Å.

(B) In plane 2D projection of the 3D reconstruction shown in Figure 3 and its corresponding 2D Fourier transform showing a single layer line at 30 Å.

(C) Central section of the final 3D reconstruction shown in Figure 3 viewed from the top. The half image at the left shows the structure prior to imposition of helical symmetry (in IHRSR) and the right half image shows the structure after imposition of helical symmetry.

Figure S5:

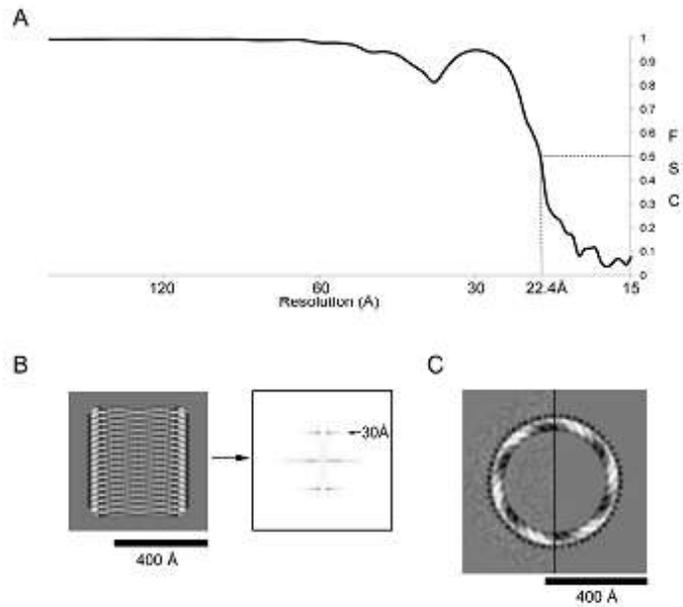
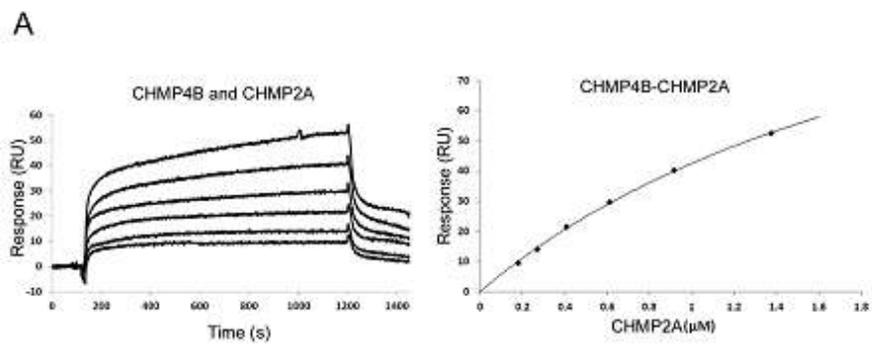
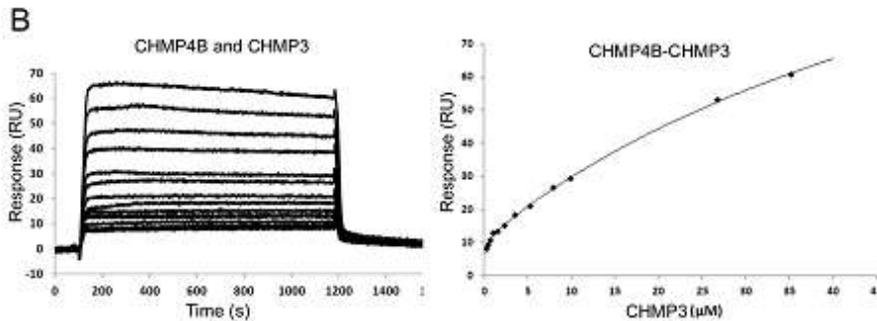


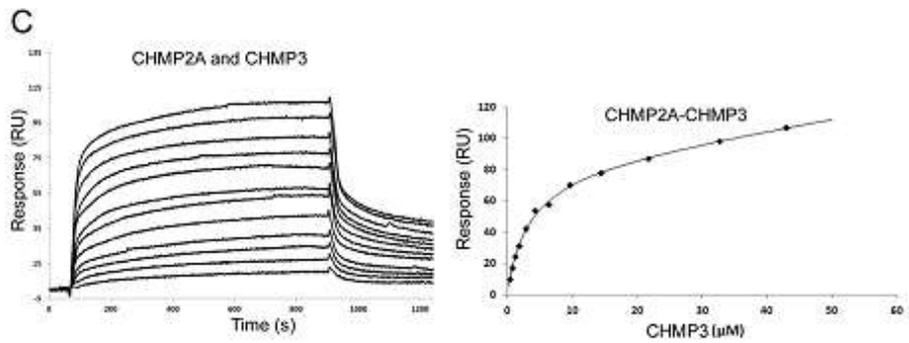
Figure S6: Biosensor analyses of binary CHMP2A, CHMP2B, CHMP3 and CHMP4B interactions.



(A) Left Panel: Biosensor binding analysis of the CHMP4B-CHMP2A interaction. Sensorgrams from different CHMP2A dilutions (181 nM, 271.5 nM, 407 nM, 611 nM, 916.4 nM, 1.375 μ M) binding to immobilized CHMP4B.
 Right Panel: Hyperbolic fitting of equilibrium responses from the sensorgrams at left resulted in a K_D of $2.43 \pm 0.21 \mu$ M.

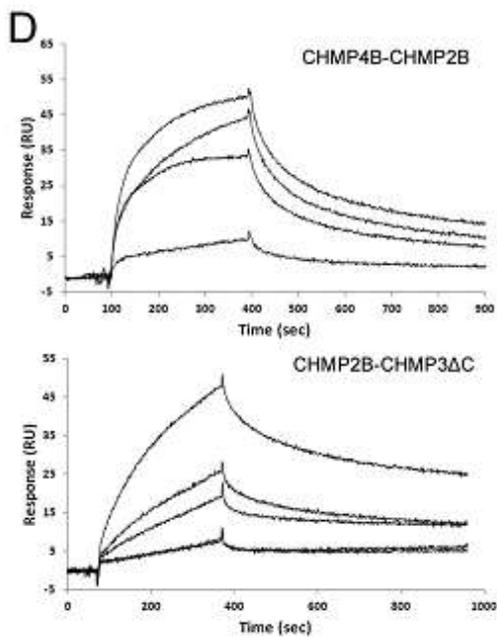


(B) Left Panel: Biosensor binding analysis of the CHMP4B-CHMP3 interaction. Sensorgrams from different CHMP3 dilutions (309 nM, 463 nM, 695 nM, 1.04 μ M, 1.56 μ M, 2.35 μ M, 3.52 μ M, 5.28 μ M, 7.92 μ M, 9.9 μ M, 11.88 μ M, 17.82 μ M, 263 μ M and 35.2 μ M) with immobilized CHMP4B.
 Right Panel: Hyperbolic fitting of equilibrium responses from the sensorgrams at left resulted in two K_{D1} , $K_{D1} = 0.15 \pm 0.04 \mu$ M and a lower affinity binding as evident from $K_{D2} = 69 \pm 12 \mu$ M, which probably reflects CHMP3 polymerization at high concentrations. Data points corresponding to 11.88 and 17.82 μ M were removed as they were impacting strongly the standard error values of the dissociation constants.



(C) Left Panel: Biosensor binding analysis of the CHMP2A-CHMP3 interaction. Sensorgrams of different CHMP3 dilutions (430 nM, 847 nM, 1.27 μ M, 1.91 μ M, 2.87 μ M, 4.3 μ M, 6.45 μ M, 9.68 μ M, 14.5 μ M, 21.8 μ M, 32.7 μ M, 43 μ M) binding to immobilized CHMP2A.

Right Panel: Hyperbolic fitting of equilibrium responses from the sensorgrams at left resulted in a K_D of $3.2 \pm 0.2 \mu$ M.



Analyte	Ligand	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (μM)	χ^2
CHMP2B	CHMP4B	6.9 ± 0.2	3.9 ± 0.05	0.56	1.43
CHMP3ΔC	CHMP2B	1.9 ± 0.07	2.6 ± 0.04	1.4	0.38

(D) Biosensor binding analyses of the CHMP2B-CHMP4B interaction (upper panel). The analyte CHMP2B was injected at increasing concentrations from 0.144, 0.576, 0.72 to 0.96 μM and the globally fitted kinetic constants are listed below.

Middle panel: SPR analysis of the CHMP2B-CHMP3ΔC interaction; the analyte CHMP3ΔC was injected at concentrations of 0.0975, 0.130, 0.195, 0.390 and 0.780 μM .

Lower panel: Table listing the kinetic constants of the interactions shown in the upper panels.

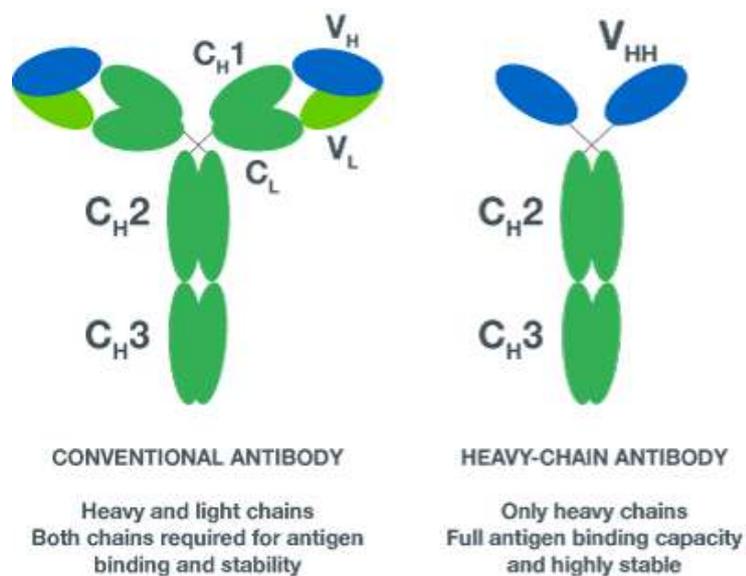
3.3 Développement d'anticorps spécifiques des polymères ESCRT-III

3.3.1. Sélection d'anticorps de lama contre les polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 par Phage Display

3.3.1.1. Introduction

Afin d'obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre les polymères CHMP2A/CHMP3, j'ai été amené à produire environ 200 µg de polymères, de chacun des monomères CHMP2A et CHMP3 et de MBP pour la technique du Phage Display. J'ai ensuite utilisé la plateforme de Phage Display couplée à l'utilisation d'anticorps de lama disponible dans le laboratoire du Dr. Theo Verrips à Utrecht (Pays Bas) afin de sélectionner des clones intéressants que j'ai par la suite testé individuellement pour leur spécificité envers les polymères.

L'intérêt d'utiliser des anticorps de lama est directement lié à leur structure. En effet, chez les Camelidae, en plus des IgG que l'on retrouve communément chez les autres organismes, il existe des



immunoglobulines composées uniquement de chaînes lourdes (Figure 34). Ces anticorps possèdent la même aptitude à reconnaître des épitopes que les anticorps conventionnels mais présentent l'avantage de posséder des fragments variables (responsable de la reconnaissance de l'antigène) uniquement composés d'un seul polypeptide. De cette manière, il est possible d'exprimer les fragments variables (appelés VHH) comme des domaines protéiques isolés de manière recombinante.

Figure 34 : Comparaison d'un anticorps conventionnel avec un anticorps de lama composé uniquement de chaînes lourdes. Contrairement à un anticorps classique, le domaine variable fonctionnel d'un anticorps de lama (V_{HH}) est issu d'une seule chaîne polypeptidique. C_H/V_H : fragment constant/variable de la chaîne lourde ; C_L/V_L : fragment constant variable de la chaîne légère (schéma d'après : www.ablynx.com).

De cette manière, l'obtention d'un clone VHH spécifique des polymères CHMP2a/CHMP3 par Phage Display permettrait une expression dans des cellules transfectées de manière à visualiser les polymères endogènes directement sur des cellules vivantes.

La technique du Phage display repose sur l'utilisation de bactériophages modifiés. Le gène correspondant au fragment variable d'un anticorps donné est inséré dans le génome du phage (on utilise un génome viral modifié et défectif appelé phagemide comportant un gène de résistance à un antibiotique). La particule virale affiche l'anticorps en question (couplé au gène d'une protéine de capsid) et de cette manière le génotype est couplé au phénotype au sein même d'une particule virale. Pour générer une bibliothèque de phages, on extrait les lymphocytes B d'un organisme, puis on en récupère les cDNAs des fragments variables des anticorps et ces derniers sont ensuite clonés en phagemides. Les phagemides sont enfin transformés dans des bactéries puis convertis en phages à l'aide d'un virus « helper » qui complète les délétions des phagemides.

Le Phage Display permet de sélectionner et enrichir les anticorps spécifiques d'un antigène donné à partir d'une bibliothèque de départ très diversifiée (typiquement jusqu'à 10^{12} clones différents) (Figure 35).

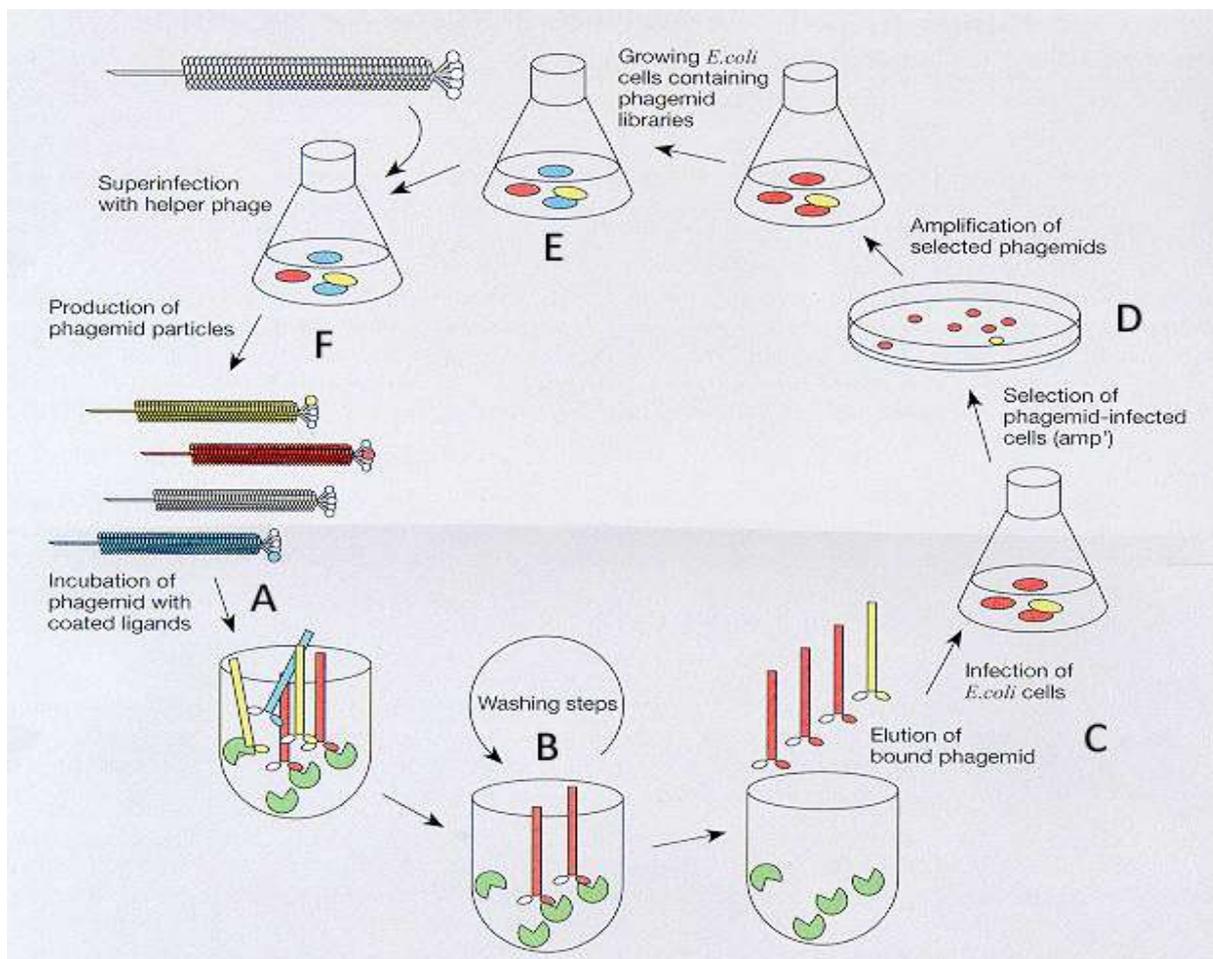


Figure 35 : Aperçu du processus de sélection d'anticorps par Phage Display. **A.** La protéine d'intérêt contre laquelle on souhaite isoler des anticorps spécifiques est adsorbée dans des puits où l'on applique la bibliothèque de phages-anticorps. **B.** Plusieurs lavages sont réalisés afin de ne retenir que les phages spécifiquement accrochés à la protéine d'intérêt. **C.** Les phages sont élués, puis mis en contact de bactéries afin de leur transférer les phagemides. **D.** Les bactéries ainsi transformées sont ensuite sélectionnées puis amplifiées ; **E.** à ce stade des clones peuvent être isolés et utilisés pour l'expression d'anticorps recombinants. **F.** Si la spécificité des clones ainsi isolés n'est pas satisfaisante, il est possible de les infecter avec un phage « helper » afin de générer une nouvelle librairie enrichie et recommencer un cycle de sélection (schéma adapté de : www.utminers.utep.edu).

Les hétéropolymères CHMP2a/CHMP3 imposent plusieurs contraintes pour l'obtention d'un anticorps satisfaisant par phage display :

- 1- L'immunisation préalable d'un lama étant impossible en raison du faible rendement en polymères à l'issue de la purification, cela impose d'utiliser une bibliothèque de phages issue de cellules B naïves. Par conséquent, les anticorps spécifiques issus de la sélection posséderont certainement une affinité moindre pour la cible.
- 2- La présence de MBP en surface des polymères nécessite de réaliser des contre sélection avec de la MBP libre afin d'éliminer tout phage reconnaissant cette protéine.
- 3- Etant donné que l'on cherche à obtenir des anticorps ne reconnaissant que le polymère, tout anticorps reconnaissant un épitope commun aux formes monomérique et polymérique doit être éliminé par contre sélection avec chacun des deux monomères CHMP2A et CHMP3.
- 4- Idéalement, l'anticorps devra être utilisé en immunofluorescence sur des cellules vivantes. La stratégie envisagée consiste à transférer l'anticorps couplé à un tag fluorescent afin de visualiser sa relocalisation aux sites où les polymères s'assemblent dans les cellules. Pour des raisons d'accessibilité, cela implique que l'anticorps sélectionné reconnaisse un épitope présent à l'intérieur des polymères coniques puisque la partie externe de ces derniers est en interaction avec la membrane. Concrètement cela signifie que lors de la sélection par Phage Display, les phages puissent avoir accès aux épitopes présents dans la partie interne des polymères. Ceci est en théorie possible puisque les polymères sont ouverts au moins à une extrémité et leur diamètre interne est d'environ 50 nm alors que celui des phages n'est que de 6-9nm. Cependant, comme les phages sont très longs, il est probable que l'entrée d'un phage dans la partie ouverte d'un tube formé par CHMP2A/CHMP3 soit un événement rare, surtout si l'on considère les perturbations induites par les mouvements Browniens.
- 5- En plus d'être spécifique, l'anticorps devra présenter une affinité suffisante et être compatible avec une utilisation en immunofluorescence.

3.3.1.2. Résultats

3.3.1.2.1. Premier round de sélection :

Lors du premier round de sélection, on adsorbe différentes dilutions des hétéropolymères MBP-CHMP2A/CHMP3 sur une plaque 96 puits. Etant donné que CHMP2A est également capable de former des polymères en forme d'anneaux seule (Figure 14B), on l'utilise également afin de maximiser les chances d'obtenir un anticorps intéressant. En guise de contrôle, un premier round est aussi entrepris sur les monomères CHMP2A et CHMP3. Enfin, dans le but de neutraliser les phages capables d'interagir avec la MBP, le mélange de phages est préincubé 15 min en présence de MBP avant d'être mis en contact avec les protéines adsorbées.

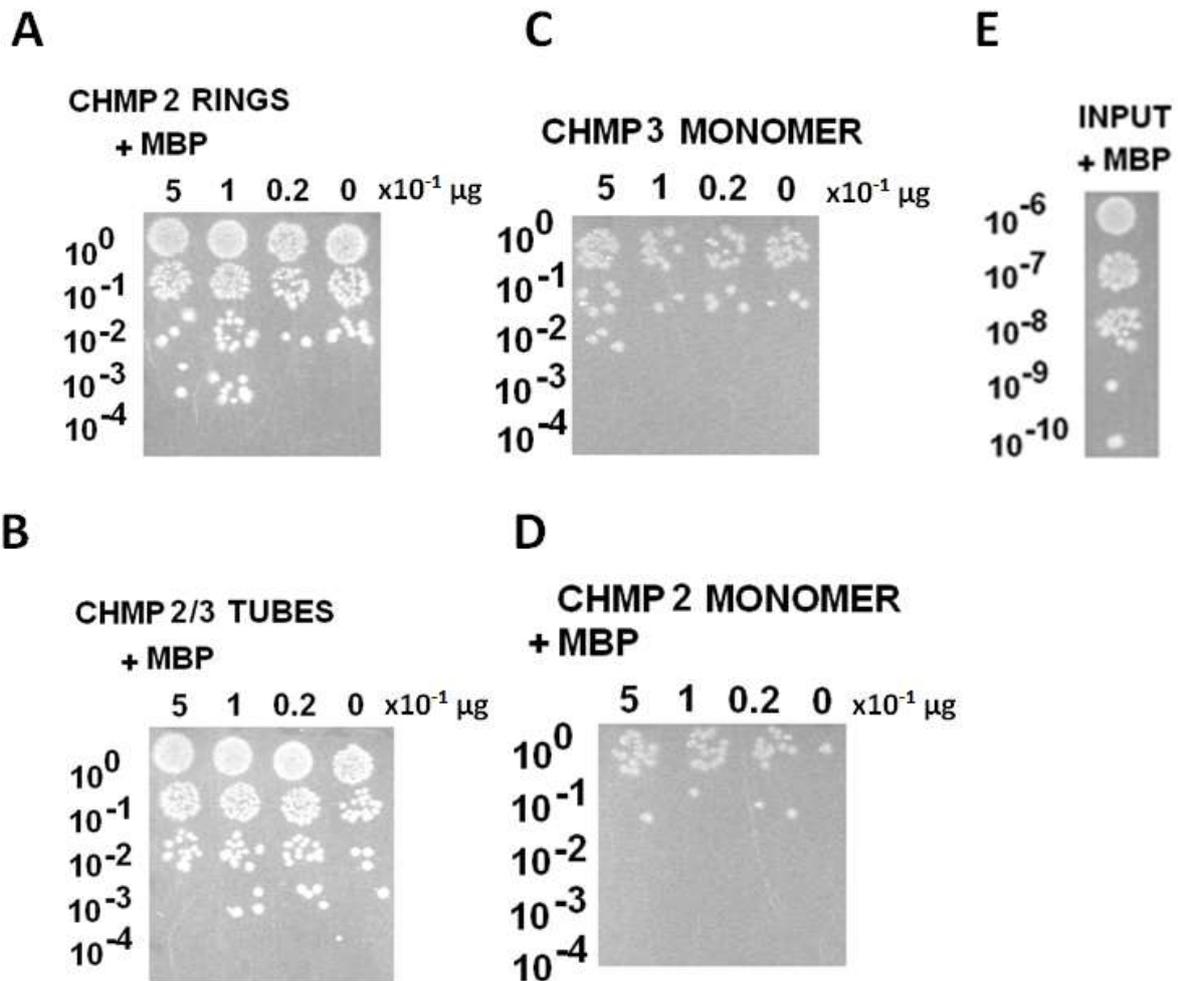


Figure 36 : Résultats du premier round de sélection. Les dilutions des bactéries infectées par les phages issus de la sélection sont disposées en « spots » sur gélose ampicilline. **A, B, C, D, et E** représentent différentes conditions de sélection. Pour chaque condition, plus la dilution où l'on trouve encore des colonies est grande, et plus il y a de bactéries résistantes (c'est-à-dire plus il y a de cellules infectées ; ou encore plus il y avait de phages à l'issue de la sélection). Les nombres à gauche en face de chaque ligne indiquent la valeur de la dilution ; les nombres en face de chacune des colonnes indiquent la quantité de protéine adsorbée par puits lors de la sélection (en μg). L'enrichissement relatif en phages reconnaissant spécifiquement la protéine d'intérêt s'obtient par comparaison des valeurs de la dernière dilution contenant encore des colonies entre les puits contenant de la protéine (0,5 ; 0,1 et 0,02 μg) adsorbée et celui n'en contenant pas (0 μg). Toutes les sélections sont réalisées en préincubant les phages avec de la MBP (+MBP) afin d'éviter de récupérer des phages reconnaissant cette protéine à l'issue de la sélection.

A. Sélection réalisée avec les polymères en forme d'anneaux (« Rings ») de MBP-CHMP2A.

B. Sélection réalisée avec les polymères tubulaires (« Tubes ») de MBP-CHMP2A/CHMP3.

C. Sélection réalisée avec les monomères de la protéine CHMP3.

D. Sélection réalisée avec les monomères de la protéine MBP-CHMP2A.

E. Contrôle sans sélection : la librairie totale est mise directement en contact de bactéries pour infection après l'étape de préincubation avec la MBP.

Après avoir mis la bibliothèque de phages en contact avec les protéines cible, on élimine tous les phages non accrochés spécifiquement puis on élue les phages spécifiques et les utilise pour

infecter des bactéries. Etant donné que les phagemides contiennent le gène de résistance à l'ampicilline, on sélectionne donc les cellules infectées et on compare ensuite des dilutions en série (de 10^{-1} à 10^{-10}) de ces mêmes cellules sur gélose pour évaluer l'enrichissement relatif en phages. Pour cela, on compare la plus grande dilution présentant encore des colonies dans chacune des conditions aux cellules infectées par des phages issus d'un puits ne contenant pas de protéine adsorbée (Figure 36).

Les résultats du premier round indiquent que la sélection a bien fonctionné puisque d'une part la diversité de la bibliothèque de phages a été réduite de l'ordre de dix millions (plus grandes dilution présentant des colonies (Figure 36) : A, B, C et D : 10^{-2} - 10^{-3} contre E : 10^{-9} - 10^{-10}). D'autre part, On constate un enrichissement en phages spécifiques d'un facteur 10 dans toutes les conditions à l'exception des polymères MBP-CHMP2A/CHMP3 (Figure 36 A, B, C et D). En comparant le nombre de cellules infectées entre les monomères et les polymères, on constate qu'il y a entre 10 et 100 fois plus de phages spécifiques des polymères. Ce résultat est plutôt encourageant car il indique que des phages semblent avoir reconnu les polymères sans reconnaître les monomères.

3.3.1.2.2. Deuxième round de sélection :

L'enrichissement global obtenu pour chacune des conditions n'étant pas suffisant pour commencer à essayer d'isoler des clones, un second round est entrepris. Les bactéries résistantes issues de chacune des conditions de sélection sont infectées par des phages « helper » qui permettent de générer une nouvelle bibliothèque, de diversité moindre, enrichie en phages spécifiques. Une seconde sélection en plaque 96 puits est ensuite réalisée à partir de ces nouvelles bibliothèques.

Lors du premier round effectué avec les tubes MBP-CHMP2A/CHMP3, il n'y avait pas d'enrichissement visible (Figure 36B). Le nombre de phages spécifique était donc relativement faible au départ.

Cette deuxième sélection a permis un enrichissement d'un facteur 1000 à 10000 en phages spécifiques des tubes (Figure 37A). Afin de déterminer la proportion de phages reconnaissant la MBP ainsi que les monomères au sein de la bibliothèque, j'ai utilisé d'autres conditions de préincubation.

Dans un premier temps, j'ai préincubé la mixture de phages avec chacun des monomères MBP-CHMP2A et CHMP3. Cette condition révèle que sans les phages reconnaissant les monomères, l'enrichissement en phage spécifiques n'est que d'environ 10 à 100 fois supérieur à la même condition sans protéine adsorbée (Figure 37B). Cet enrichissement est suffisant pour isoler des clones spécifiques et tend à confirmer la présence d'anticorps spécifiques d'épitopes présents au sein des polymères.

Au lieu d'effectuer une préincubation des phages avec de la MBP en solution, j'ai également adsorbé de la MBP dans un puits, incubé la bibliothèque dans ce même puits et j'ai ensuite récupéré le surnageant (les phages non accrochés) afin de l'incuber avec un puits contenant des polymères. Cette stratégie est plus efficace que la préincubation avec la MBP soluble en ce sens que les phages s'accrochant à la MBP sont directement soustraits de la bibliothèque avant d'être en contact avec les polymères. Cette condition élimine le « bruit de fond » constitué par des interactions non spécifiques des phages avec le puits mais n'impacte pas l'enrichissement global en phages spécifiques (Figure

37C). Il apparaît donc que la proportion de phages reconnaissant la MBP au sein de cette bibliothèque semble relativement faible.

- Sélection avec les tubes CHMP2a/CHMP3 :

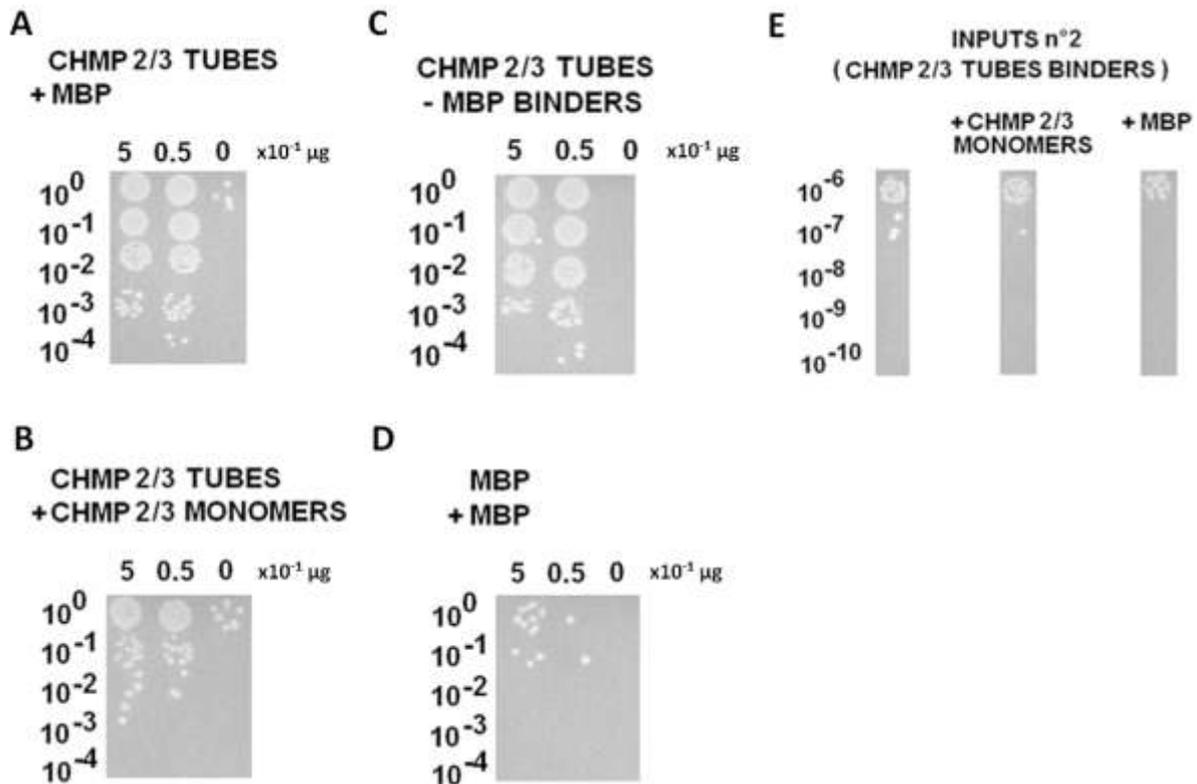


Figure 37 : Résultats du deuxième round de sélection pour les polymères tubulaires MBP-CHMP2A/CHMP3. **A, B, C, D, et E** représentent différentes conditions de sélection. Les nombres à gauche en face de chaque ligne indiquent la valeur des dilutions ; les nombres en face de chacune des colonnes indiquent la quantité de protéine adsorbée par puits lors de la sélection (en µg).

- A.** Sélection réalisée en préincubant les phages avec de la MBP.
- B.** Sélection réalisée en préincubant les phages avec chacun des monomères MBP-CHMP2A et CHMP3.
- C.** Sélection réalisée en préincubant les phages dans un puits contenant de la MBP adsorbée.
- D.** Sélection contrôle avec de la MBP adsorbées en préincubant les phages avec de la MBP.
- E.** Contrôle sans sélection : la librairie issue du premier round est mise directement en contact de bactéries pour infection après l'étape de préincubation avec la MBP ou avec les monomère MBP-CHMP2A/CHMP3.

La sélection permettant d'isoler les phages interagissant avec la MBP (Figure 37D) confirme qu'il existe un faible nombre de phages anti-MBP. Ce contrôle permet également de mettre en évidence que la préincubation avec la MBP soluble n'élimine pas tous les phages reconnaissant cette protéine. Il est probable que cela soit le cas également lors de la préincubation avec les monomères. Dans ce cas précis, on peut percevoir que l'effet de la préincubation est moins prononcé sur la bibliothèque totale (issue du premier round - Figure 37E).

- Sélection avec les anneaux MBP-CHMP2a :

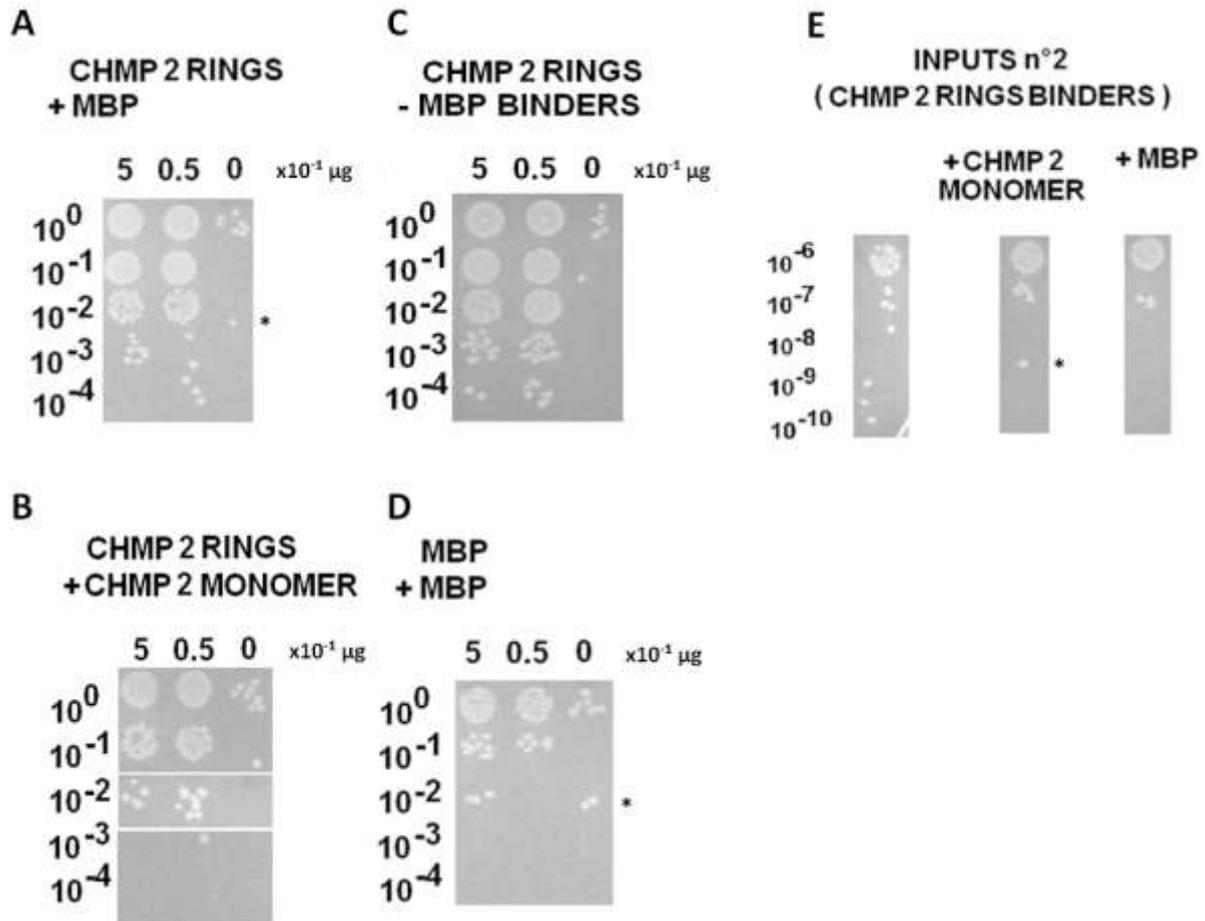


Figure 38 : Résultats du deuxième round de sélection pour les polymères en anneaux MBP-CHMP2A. **A, B, C, D, et E** représentent différentes conditions de sélection. Les nombres à gauche en face de chaque ligne indiquent la valeur de la dilution ; les nombres en face de chacune des colonnes indiquent la quantité de protéine adsorbée par puits lors de la sélection (en μg). Les astérisques indiquent des colonies qui sont ignorées car vraisemblablement dues à des contaminations.

A. Sélection réalisée en préincubant les phages avec de la MBP.

B. Sélection réalisée en préincubant les phages avec le monomère MBP-CHMP2A.

C. Sélection réalisée en préincubant les phages dans un puits contenant de la MBP adsorbée.

D. Sélection contrôle avec de la MBP adsorbées en préincubant les phages avec de la MBP.

E. Contrôle sans sélection : la librairie issue du premier round est mise directement en contact de bactéries pour infection après l'étape de préincubation avec la MBP ou avec les monomère CHMP2A.

On applique ici la même méthodologie que pour les polymères MBP-CHMP2a/CHMP3. Conformément à ce qui est attendu, l'enrichissement en phages reconnaissant la cible est supérieur à ce qui a été obtenu durant le premier round (1000 à 10000 fois contre 10 fois pour le premier

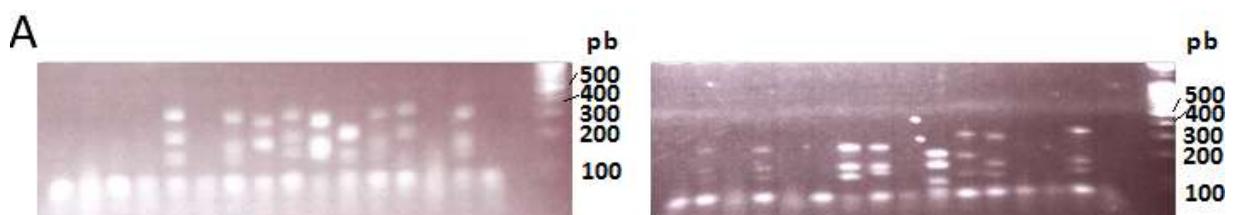
round - Figure 38A). La neutralisation des phages reconnaissant les monomères ne diminue que d'un facteur 10 l'enrichissement global (Figure 38B). Là encore, la soustraction des phages se liant à la MBP n'impacte pas significativement le taux d'enrichissement (Figure 38C). Cependant, la présence cellule infectées jusque dans la dilution au 100^{ème} dans la sélection avec MBP (Figure 38D) semble contredire cette observation. L'examen de l'effet de la préincubation de la MBP sur la bibliothèque indique elle aussi la présence de nombreux anticorps anti MBP (Figure 38E). La détermination de la proportion de phages dirigés contre les monomères est elle aussi délicate en raison de résultats contradictoires (comparer les Figure 38A, B et E).

3.3.1.2.3. Isolement et caractérisation des clones :

Un total de 192 clones issus des différentes conditions de sélection sont isolés, puis cultivés afin d'être caractérisés. Pour avoir un aperçu de la diversité des clones isolés, une analyse par fingerprinting de chacun des clones isolés est réalisée (Figure 39A). On distingue au moins 9 patterns différents, indiquant qu'il y a une bonne diversité d'anticorps au sein de la sélection.

Les clones sont ensuite cultivés en plaque 96 puits afin d'exprimer les anticorps de lama à partir des phagemides. Après expression, les clones sont lysés et les lysats contenant les anticorps sont utilisés pour un screening par ELISA (Figure 39B). Pour la sélection basée sur les anneaux MBP-CHMP2A, 11 clones ont été identifiés. Aucun clone ne s'est avéré positif sur la sélection basée sur les tubes MBP-CHMP2A/CHMP3. Il est possible que les niveaux d'expression soient insuffisant en raison du volume de culture réduit imposé par les plaques 96 puits.

Parmi les quatre meilleurs clones issus de la sélection contre les anneaux, les deux premiers (clones 1C9 et 1A10) sont issus de la contre sélection avec de la MBP soluble, les deux autres (clones 2C10 et 2E11) sont issus de la contre sélection avec les monomères MBP-CHMP2A.



B**ANTICORPS ISSUS DE LA SELECTION AVEC LES ANNEAUX CHMP2A**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,045	0,042	0,332	0,048	0,078	0,044	0,106	0,041	0,047	0,039	0,041
B	0,04	0,049	0,049	0,052	0,049	0,064	0,047	0,041	0,046	0,069	0,039	0,041
C	0,044	0,045	0,403	0,044	0,076	0,057	0,043	0,04	0,038	0,273	0,039	0,039
D	0,04	0,092	0,062	0,049	0,044	0,053	0,05	0,043	0,043	0,043	0,04	0,042
E	0,043	0,042	0,142	0,04	0,047	0,043	0,04	0,039	0,041	0,049	0,195	0,042
F	0,045	0,042	0,118	0,04	0,04	0,041	0,041	0,041	0,043	0,041	0,044	0,043
G	0,043	0,045	0,067	0,041	0,039	0,045	0,039	0,053	0,04	0,047	0,039	0,041
H	0,04	0,043	0,186	0,041	0,04	0,039	0,041	0,049	0,053	0,044	0,04	0,043

-

-

ANTICORPS ISSUS DE LA SELECTION AVEC LES TUBES CHMP2A/CHMP3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,038	0,039	0,039	0,039	0,042	0,08	0,039	0,064	0,057	0,041	0,039
B	0,04	0,039	0,04	0,041	0,045	0,04	0,041	0,041	0,04	0,046	0,041	0,038
C	0,04	0,038	0,04	0,04	0,04	0,042	0,048	0,046	0,06	0,037	0,039	0,038
D	0,04	0,041	0,041	0,044	0,043	0,041	0,042	0,039	0,053	0,038	0,037	0,037
E	0,04	0,039	0,04	0,039	0,041	0,041	0,046	0,039	0,047	0,038	0,04	0,038
F	0,041	0,041	0,04	0,043	0,04	0,04	0,043	0,037	0,037	0,038	0,038	0,037
G	0,041	0,043	0,042	0,044	0,043	0,041	0,048	0,04	0,038	0,037	0,038	0,037
H	1,927	0,043	0,04	0,052	0,04	0,042	0,345	0,044	0,057	0,037	0,037	0,038

+

+

C

	1C9	1A10	2C10	2E11	1H9	1E9	1F9	2A8	1D8	1A12	1C11
Anneaux	0,093	0,065	0,067	0,04	0,072	0,039	0,04	0,124	0,104	0,102	0,039
Monomères	0,035	0,035	0,036	0,036	0,037	0,036	0,035	0,066	0,051	0,043	0,048
MBP	0,036	0,036	0,035	0,034	0,037	0,036	0,034	0,042	0,034	0,033	0,05
Tubes	0,04	0,038	0,037	0,04	0,052	0,035	0,037	0,145	0,124	0,142	0,047

Controls:	0,039	-
	0,597	+
	0,397	VHH expression

Figure 39 : Analyse des clones par fingerprinting et tests d'affinité par ELISA. **A.** Exemple de résultat obtenu lors du fingerprinting pour quelques clones parmi les 192 testés. Le fingerprinting est réalisé en amplifiant par PCR les fragments codant pour les VHH au sein de chaque phagemide, chaque amplifiat est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *HinFI* et chargés sur gel d'agarose. Des patterns de digestion différents sont clairement visibles, indiquant la présence d'une bonne variabilité au sein des séquences d'anticorps issues de la sélection. pb = paires de bases. **B.** Résultat du screening des clones par ELISA. Les cases grisées accompagnées d'un « - » correspondent aux contrôles négatifs, les cases oranges accompagnées d'un « + » correspondent aux contrôles positifs. 11 clones positifs sont identifiés sur la plaque de la sélection basée sur les polymères MBP-CHMP2A. Ces clones correspondent aux identifiants 1C9 ; 1A10 ; 2C10 ; 2E11 ; 1H9 ; 1E9 ; 1F9 ; 2A8 ; 1D8 ; 1A12 ; 1C11 (du signal le plus élevé au moins élevé). **C.** Test de spécificité des 11 clones isolés par ELISA. Parmi les clones initialement identifiés, seuls 4 à 7 d'entre eux semblent réellement reconnaître les polymères formés par MBP-CHMP2A. Seuls 2A8 et 1D8 semblent reconnaître faiblement les monomères MBP-CHMP2A. Les clones 2A8, 1A12 et 1D8 sont capables de reconnaître les polymères MBP-CHMP2A/CHMP3.

La spécificité des 11 clones identifiés ici est ensuite testée (Figure 39C). Seulement 4 clones donnent un signal satisfaisant (1C9 ; 2A8 ; 1A12 ; 1D8). Ils ne réagissent pas avec la MBP. Les clones 2A8, 1D8 et 1A12 présentent l'avantage de réagir avec les tubes formés par MBP-CHMP2A/CHMP3. Ces clones permettent de pallier avantageusement l'absence de clone positif pour la sélection basée sur les tubes.

En dépit de plusieurs tentatives pour purifier les clones 1A12 et 1D8, les niveaux d'expression ne ce sont jamais révélés satisfaisant. Le clone 2A8 a en revanche pu être purifié (Figure 40).

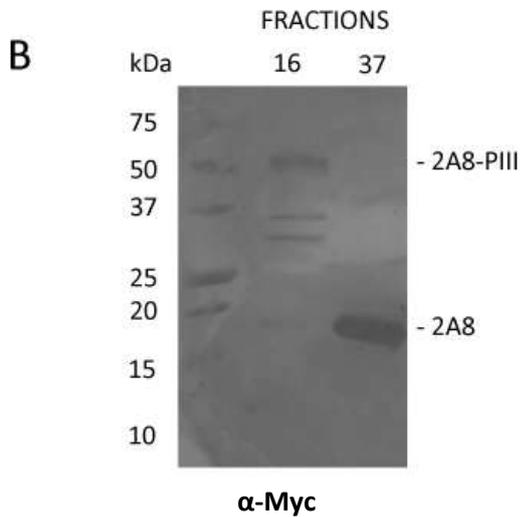
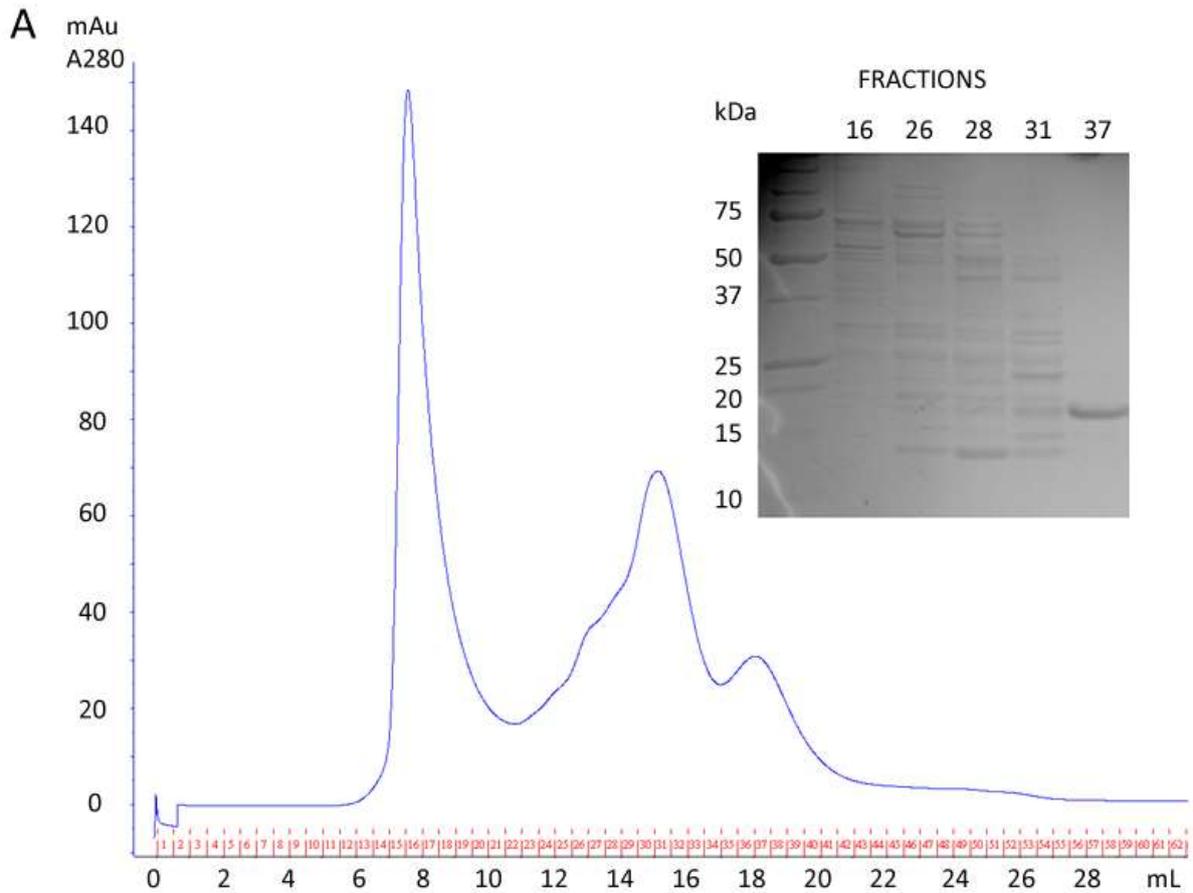


Figure 40 : Purification du clone VHH 2A8. **A.** Profil de purification obtenu (après une première purification sur colonne de nickel) en gel filtration avec une colonne Superdex200. Les fractions correspondant aux différents pics sont analysées par SDS-PAGE (2A8 est présent dans la fraction 37). **B.** Western blot réalisé à partir des fractions purifiées afin de confirmer la présence du VHH. Le VHH seul a une taille attendue d'environ 15 kDa. La bande visualisée dans la fraction 16 correspond à la fusion entre VHH et la protéine de capsid PIII, exprimée elle aussi dans la bactérie (taille attendue ~60 kDa).

Une fois purifié, le clone 2A8 a été mélangé aux hétéropolymères formés par CHMP2A/CHMP3 et la cosédimentation du VHH avec les polymères a été testée par gradient de sucrose (Figure 41).

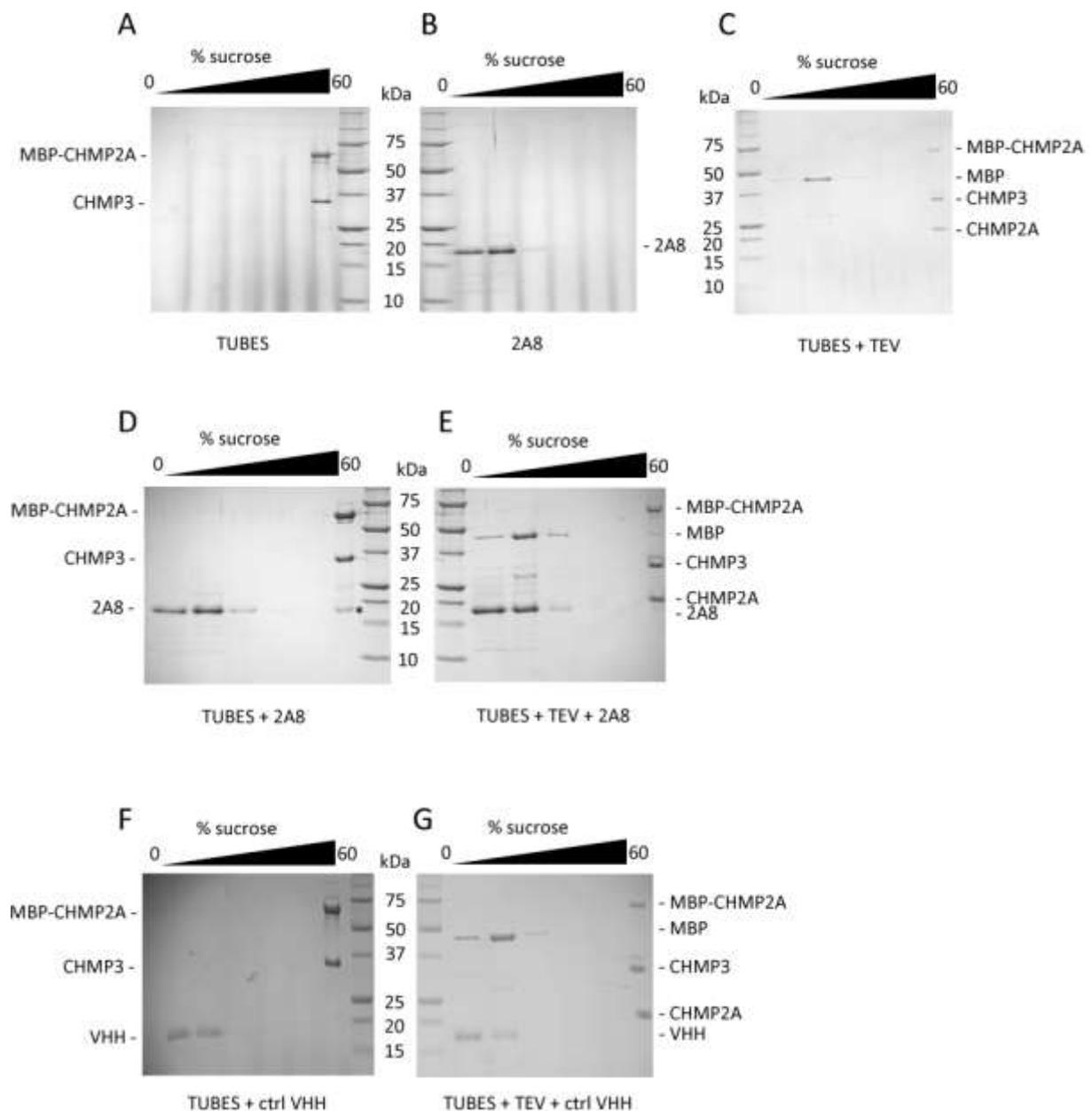


Figure 41 : Test d'interaction entre le clone 2A8 et les polymères MBP-CHMP2A/CHMP3 (tubes). Après coincubation, les protéines présentes dans chaque mixture sont séparées par gradient de sucrose. **A, B, et C.** Expériences contrôle : gradients de sucrose réalisés avec les tubes, le clone 2A8, et les tubes clivés par la TEV. Le VHH 2A8 ainsi que la MBP restent en haut du gradient alors que les polymères sédimentent. **D.** Mélange des tubes avec les le clone 2A8. Une partie du VHH 2A8 sédimente avec les tubes (astérisque) mettant ainsi en évidence une éventuelle interaction faible entre les deux. **E.** Mélange des tubes clivés avec le clone 2A8. Le fragment d'anticorps relocalise dans le haut du gradient avec la MBP. La majorité de l'anticorps ne cosédimente pas avec les tubes ce qui indique qu'il n'y a pas d'interaction avec les protéines CHMP2A et CHMP3. **F et G.** Expériences contrôle réalisée avec un VHH ne liant pas les tubes. Le VHH ne cosédimente pas avec les tubes.

Les gradients de sucrose montrent qu'il n'y a pas de réelle interaction entre les protéines CHMP2A/CHMP3 des tubes et le clone 2A8. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a été

observé en ELISA. Toutefois, les faibles niveaux d'expression des VHH isolés de même que l'impossibilité de visualiser une interaction claire entre 2A8 et les polymères appuient l'hypothèse d'un signal aspécifique en ELISA.

Compte tenu de ces problèmes, j'ai entrepris de recommencer toute la procédure du Phage Display à partir des bibliothèques générées au premier round mais en utilisant une méthode en solution plutôt qu'avec des protéines adsorbées en plaques. Pour cela, j'ai tiré profit du fait que les polymères tubulaires puissent être culotés par une centrifugeuse de paillasse. Durant cette procédure, j'ai donc incubé les phages avec les polymères MBP-CHMP2A/CHMP3 en utilisant la même stratégie de contre sélection à la MBP utilisée précédemment. Une fois l'incubation terminée, j'ai culoté les polymères (et les phages qui étaient accrochés) puis j'ai infecté des bactéries après lavages successifs des polymères. Là encore, bien que la procédure ait fonctionné (comme en témoigne la présence de cellules résistantes à l'ampicilline en fin de sélection), les tests d'expression menés sur les clones VHH isolés n'ont pas permis d'identifier des clones ayant un niveau d'expression suffisant pour permettre un screening fiable en ELISA.

3.3.1.3. Discussion

La technique du Phage Display n'a pas permis d'obtenir un anticorps satisfaisant. Un des principaux problèmes rencontrés est le niveau d'expression des VHH qui est trop faible pour donner des résultats fiables lors d'un screening en plaque.

A l'issue de la procédure de sélection, seuls les anneaux MBP-CHMP2A ont permis l'obtention de clones potentiellement intéressants. Ce résultat est surprenant au regard des bons niveaux d'enrichissement obtenus avec les tubes lors du second round (Figure 37). Là encore, il est possible que les faibles niveaux d'expression diminuent artificiellement le nombre de clones détectés comme positifs.

Les VHH sont en principe des fragments relativement stables. Qui plus est, chaque phagemide code pour un signal de sécrétion périplasmique en N-terminal du VHH. Il devient donc difficile d'expliquer les faibles niveaux d'expression observés en bactérie par des phénomènes de toxicité où des problèmes de solubilité. Les défauts d'expression observés lors des tests sur des clones isolés auraient dû impacter la procédure en limitant considérablement le nombre de phages produits lors de la constitution des bibliothèques enrichies, or ce n'est pas ce que l'on observe (Figure 37E et Figure 38E). Il est donc difficile de comprendre réellement d'où vient cette disparité entre ce que l'on observe durant la procédure et ce que l'on observe lors de la caractérisation de clones isolés.

On notera également que le résultat du test ELISA ayant permis d'identifier les 11 clones positifs (Figure 39B) est aussi en désaccord partiel avec le test ELISA permettant de tester la sélectivité des clones (Figure 39C). En effet, on constate qu'au sein des 11 clones, seuls 4 ont permis d'obtenir un signal franchement positif lors du test de spécificité dont trois d'entre eux (2A8, 1A12 et 1D8) figuraient parmi les moins positifs des 11 clones initiaux. Le problème de reproductibilité survient peut être de différences de croissance des clones. Il peut aussi être dû au protocole d'extraction des VHH du périplasme (par congélation - décongélation) qui peut parfois donner des rendements inégaux.

En dépit de ces problèmes, un clone positif en ELISA a pu être isolé : le VHH 2A8. Ce clone a pu être purifié et testé pour son interaction avec les tubes (comme le suggère le test ELISA de la Figure 49C). Bien que de faibles quantités d'anticorps semblent se lier aux tubes non clivés, les tubes débarrassés de leur MBP ne semblent pas interagir avec 2A8 (Figure 41D et 41E). Ce faisant, rien n'indique qu'il y ait une réelle interaction entre ces polymères et 2A8.

L'accessibilité des protéines CHMP au sein des polymères est grandement limitée par la présence de MBP à l'extérieur et les phages peuvent difficilement contacter les parties intérieures des tubes CHMP2A/CHMP3 en raison de leurs dimensions. Qui plus est, l'utilisation d'une librairie naïve permet difficilement d'obtenir suffisamment d'anticorps positifs ayant une bonne affinité pour la cible dans ce cas. Enfin, il faut noter que la capsid des phages est relativement hydrophobe. Cela engendre probablement l'apparition de nombreux phages non spécifiques à l'issue de la sélection. La conjugaison de tous ces facteurs explique sans doute en partie les problèmes rencontrés pour identifier clairement des candidats intéressants.

3.3.2. Obtention d'un sérum polyclonal anti-CHMP4B et purification des anticorps spécifiques

3.3.2.1. Introduction

Puisque la stratégie de sélection par phage display s'est avérée infructueuse, j'ai entrepris d'utiliser une approche moins sophistiquée consistant à obtenir un sérum polyclonal (issu de l'immunisation d'un lapin avec des polymères) dans un premier temps, puis à purifier l'anticorps d'intérêt présent dans ce sérum (par colonne d'affinité) dans un second temps.

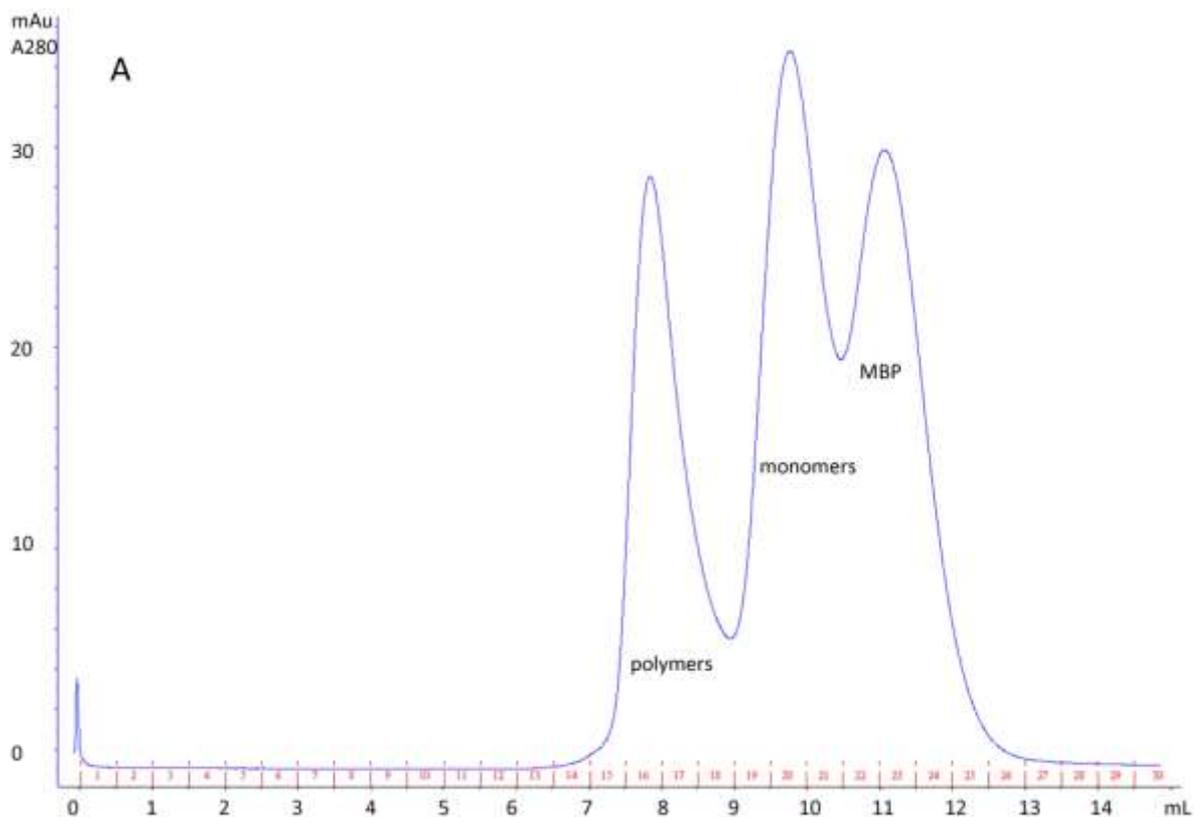
Comme cela a été souligné plus haut, les rendements protéiques obtenus lors de la purification des hétéropolymères CHMP2A/CHMP3 sont difficilement compatibles avec une immunisation. Aussi, je me suis basé sur la construction MBP-CHMP2A Δ C qui forme des polymères en forme d'anneaux [73] ainsi que sur les travaux de Ricardo Pires (ancien thésard du laboratoire) qui a pu mettre en évidence l'apparition de polymères circulaires avec une construction de la protéine CHMP4B [75]. Ces polymères sont très similaires à ceux visualisés *in cellulo* par le groupe de P. Hanson [78]. J'ai donc reproduit et purifié ces polymères pour immuniser un lapin. J'ai ensuite purifié les anticorps spécifiques à partir du sérum polyclonal en fabriquant des colonnes d'affinité avec de la MBP ainsi qu'avec les polymères CHMP4B. Enfin j'ai contrôlé la qualité de l'anticorps purifié par diverses techniques.

3.3.2.2. Résultats

Les constructions MBP-CHMP4B et MBP-CHMP2A Δ C possèdent un tag MBP en N-terminal. La présence du tag est nécessaire pour aider à solubiliser les protéines. La construction MBP-CHMP4B correspond en fait à la version full length de la protéine dans laquelle la partie contenant l'hélice α 5 (responsable de l'autoinhibition) a été remplacée par un linker [75]. La protéine MBP-CHMP2A Δ C est elle aussi constitutivement active car sa queue C-terminale autoinhibitrice est absente, de cette manière, les deux constructions forment des polymères spontanément. La MBP est ensuite éliminée après purification (grâce à la protéase TEV) afin d'éviter de générer des anticorps anti-MBP lors de l'immunisation.

3.3.2.2.1. Obtention des polymères CHMP2A Δ C purifiés :

Les polymères CHMP2A éluent dans le volume mort d'une colonne de gel filtration (Figure 32A et 32B). Ils peuvent également être générés à partir des monomères en concentrant la protéine. Les polymères forment des anneaux de 25 nm de diamètre environ qui sont constitués d'un filament fin de quelques nanomètres de diamètre enroulé sur lui-même. Ce filament n'est pas visible tant que la MBP est encore présente (Figure 42C). Une fois la MBP éliminée, les filaments agrègent entre eux et il devient rapidement difficile de distinguer les filaments. La formation d'agrégats diminue fortement l'efficacité de la TEV et empêche ainsi d'obtenir un clivage satisfaisant sur les polymères.



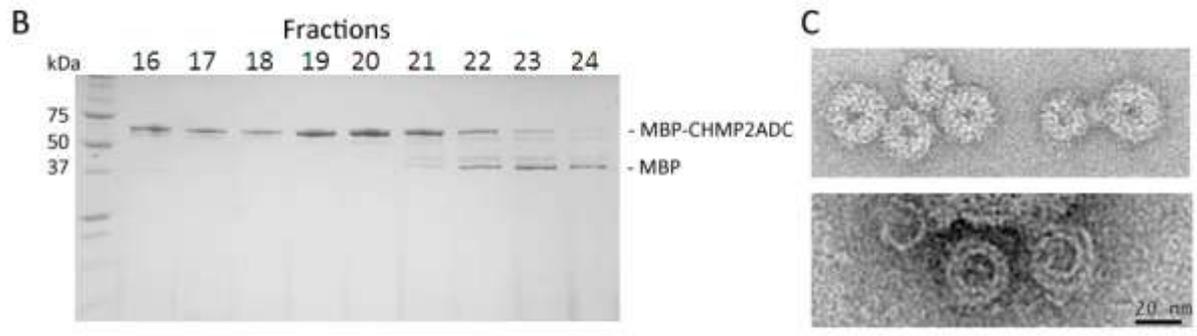
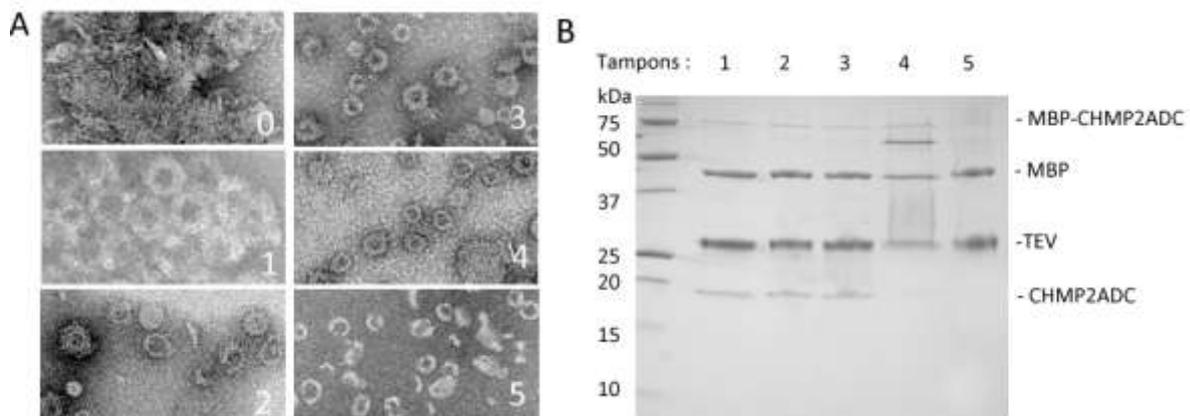


Figure 42 : Obtention des polymères CHMP2ADC **A.** Profil d'éluion de MBP-CHMP2ADC sur une colonne Superdex 75. **B.** SDS-PAGE montrant le contenu de chacune des fractions issues de la gel filtration. **C.** Visualisation des polymères MBP-CHMP2ADC (panneau supérieur) et CHMP2ADC (panneau inférieur) par microscopie électronique (coloration négative).

Dans le but de stabiliser les polymères clivés l'influence de la concentration en sel, du pH, ainsi que de la présence d'additifs ont été testés (Figure 43A et 43B). Le tampon de départ contient 20 Mm de tampon Hepes à pH 7,6 avec 300 mM de NaCl. Plusieurs tampons stabilisant les polymères clivés ont pu être identifiés ; ils présentent tous une forte concentration en sel (300 mM NaCl ; 300 mM KCl).

Pour obtenir des niveaux de clivage important, il est nécessaire d'ajouter de la TEV jusqu'à un ratio en masse de 1:1 ! Ceci s'explique au moins partiellement par la perte d'activité de cette dernière à forte concentration en sel. Afin de pallier ce problème, j'ai tiré profit de la résistance des polymères aux protéases (voir section 3.1.2.2.1.) en utilisant de la trypsine ainsi que de la protéinase K pour éliminer la MBP (Figure 43C). Les polymères sont enfin purifiés par gradient de sucrose pour séparer la MBP libre des polymères puisque ils sont seuls à être présents dans le culot après centrifugation.



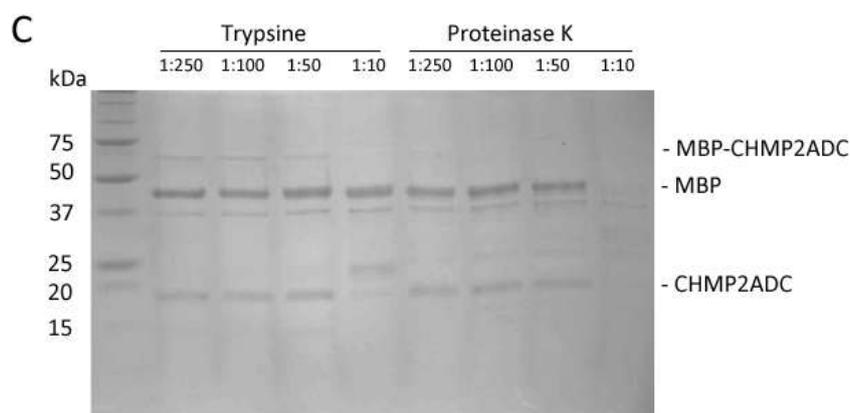


Figure 43 : Stabilisation des polymères CHMP2ADC clivés. **A.** Visualisation de l'effet stabilisateur de différents tampons sur les polymères clivés CHMP2ADC.

0 : tampon initial ; 20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl

1 : 20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl

2 : 20 mM Bicine pH 9,2 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl

3 : 20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl ; 0,05% Triton X-100

4 : 20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl ; 0,4 M arginine ; 0,4 M glutamate

5 : 20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl ; 15% glycerol

B. SDS-PAGE montrant le taux de clivage des polymères dans différents tampons avec un ratio en masse de TEV d'environ 1:1.

C. Protéolyse des polymères pour cliver efficacement la MBP. Les ratios de protéase sont indiqués en masse. Le matériel clivé est toujours sous forme de filaments après traitement aux protéases.

3.3.2.2.2. Obtention des polymères CHMP4B purifiés :

Les polymères CHMP4B affichent un comportement comparable à ceux formés par CHMP2A. Ils forment eux aussi des anneaux, bien qu'ils soient moins compacts (environ 50 nm de diamètre). Les polymères sont également présents dans le volume mort d'une colonne de filtration sur gel Superdex 75 (Figure 44A et 44B). En présence de TEV, les polymères sont stabilisés avec le même tampon que pour les polymères CHMP2A (20 mM Hepes pH 7,6 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl). Un ratio en masse de TEV de 1:10 est nécessaire pour cliver les polymères efficacement. Une fois la MBP éliminée, les anneaux CHMP4B apparaissent comme des filaments fins organisés en structures circulaires (Figure 44C).

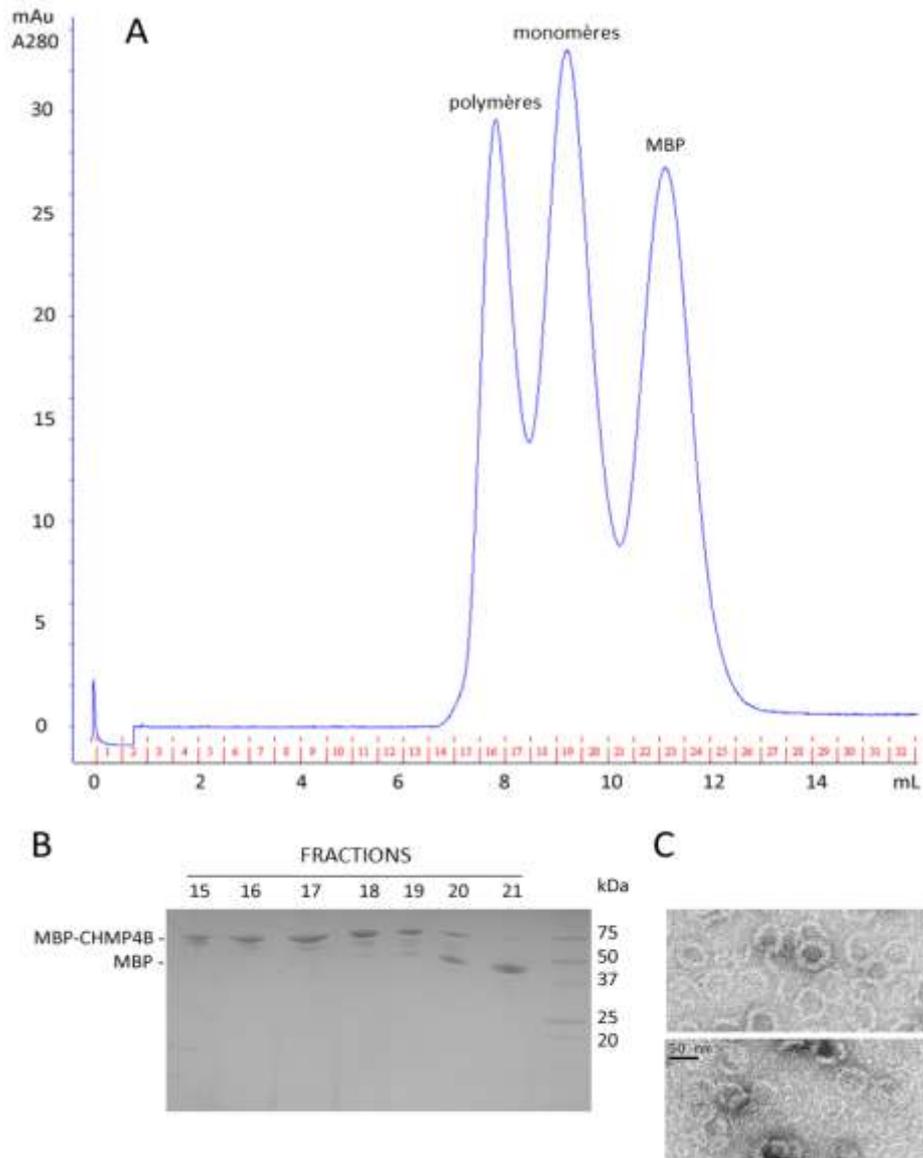


Figure 44 : Obtention des polymères CHMP4B **A**. Profil d'élution de MBP-CHMP4B sur une colonne Superdex 75. **B**. SDS-PAGE montrant le contenu de chacune des fractions issues de la gel filtration. **C**. Visualisation des polymères MBP-CHMP4B (panneau supérieur) et CHMP4B (panneau inférieur) par microscopie électronique (coloration négative).

La construction MBP-CHMP4B possède un tag histidine en N-terminal qui permet de séparer la MBP des polymères plus aisément que pour CHMP2A. En sortie d'une colonne de nickel, on récupère ainsi les polymères CHMP4B purs ; ils ne sont pas retenus pas la résine contrairement à la MBP et la TEV (Figure 45).

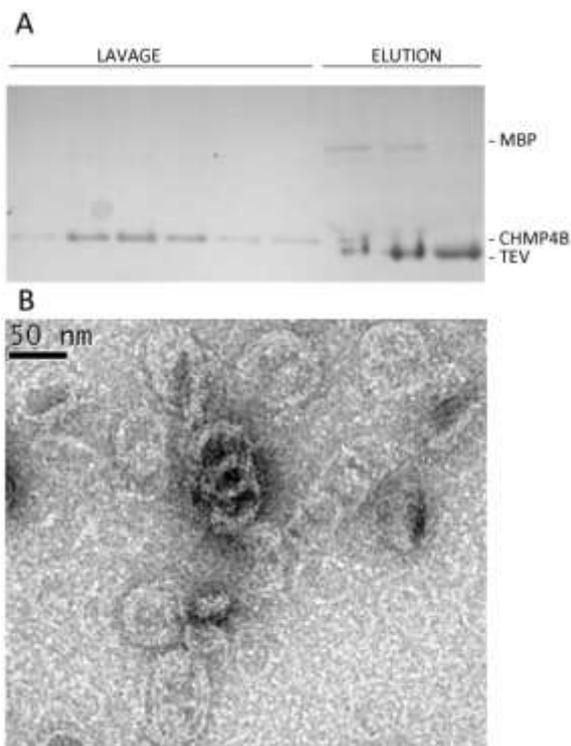


Figure 45 : Purification des polymères CHMP4B. Après clivage de la MBP avec la protéase TEV (ratio 1:10), les polymères sont chargés sur une colonne de nickel afin de les séparer de la MBP libre et de la TEV.

A. SDS-PAGE des fractions issues de la colonne de nickel. Les polymères CHMP4B ne sont pas retenus sur la colonne et sont récupérés lors du lavage. La MBP et la TEV sont ensuite éluées avec 350 mM d'imidazole.

B. Visualisation des polymères purifiés par microscopie électronique (coloration négative). Les polymères apparaissent sous la forme de filaments circulaires fins.

3.3.2.2.3. Purification et caractérisation de l'anticorps anti-CHMP4B :

Bien que j'ai pu établir un protocole pour purifier les polymères CHMP2A. L'étape finale de centrifugation dans un gradient de sucrose (pour séparer les polymères de la MBP) conduit à concentrer les polymères dans le culot et à la formation d'agrégats où l'on ne distingue plus les filaments. La présence d'agrégats n'est en soi pas nécessairement négative car elle peut stimuler le système immunitaire, cependant il est possible que les polymères soient dénaturés dans ces structures.

Etant donné que les polymères CHMP4B ont pu être obtenus très purs et morphologiquement intacts, ils sont préférés à CHMP2A pour immuniser un lapin. Le protocole d'immunisation de départ consiste en 3 injections de 50 µg d'antigène (protocole s'étalant sur 53 jours). Les tests que j'ai effectués sur un échantillon de sérum (prélevé au jour 49) ont révélé que ce dernier présentait une importante activité anti-MBP (Figure 46A et 46B).

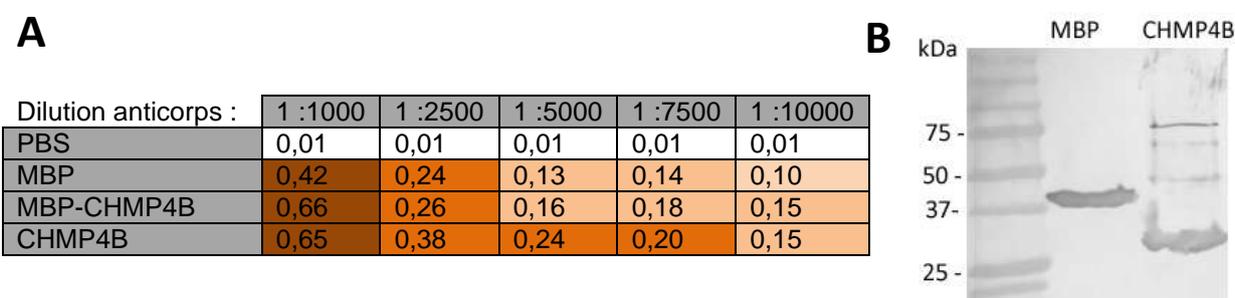


Figure 46 : Test du sérum polyclonal au 39^{ème} jour. **A.** ELISA réalisé avec le sérum polyclonal. Environ 250 ng des protéines MBP, MBP-CHMP4B et CHMP4B ont été adsorbés dans chaque puits (excepté pour la ligne « PBS » où seul du tampon a été ajouté). **B.** Western blot réalisé avec une dilution au 2500^{ème} du sérum polyclonal.

Afin d'augmenter le titre en anticorps, une quatrième et dernière injection a été entreprise avant de sacrifier l'animal (au 64^{ème} jour). Le sérum final a lui aussi été testé ; il est lui aussi capable de reconnaître à la fois la MBP et CHMP4B. Puisque le sérum n'est pas pur, j'ai entrepris d'éliminer les anticorps anti-MBP ainsi que tous les autres anticorps présents dans le sérum susceptibles de produire des réactions croisées ou aspécifiques lors d'une utilisation ultérieure. Pour cela, j'ai purifié de la MBP afin de fabriquer une résine avec cette protéine. Après avoir répétés plusieurs cycles de déplétion-élution des anticorps anti-MBP avec la colonne, les anti-MBP sont éliminés avec succès (Figure 47).

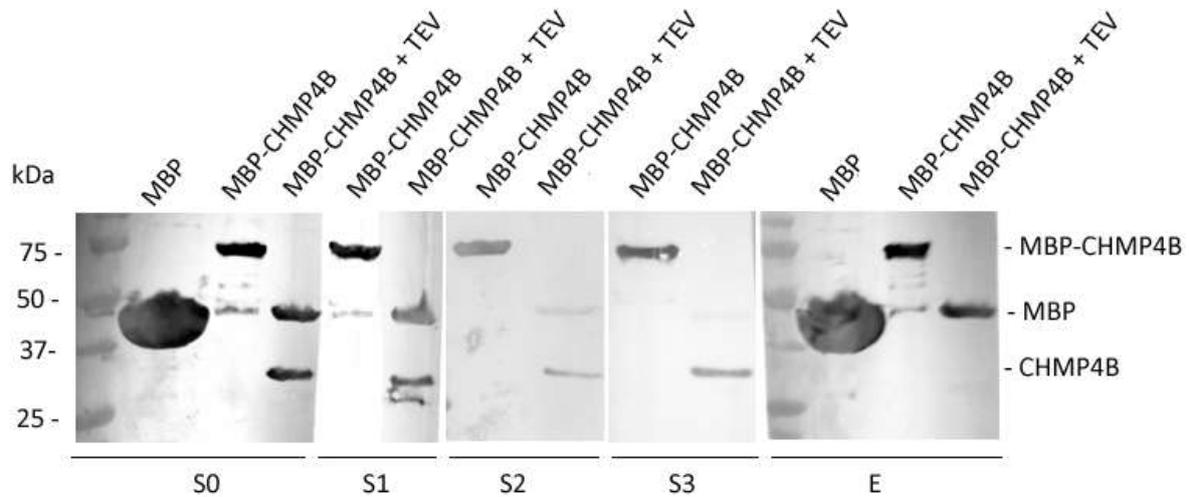


Figure 47 : Soustraction des anticorps anti-MBP du sérum polyclonal final (jour 64). Analyse par western blot de l'activité anti-MBP dans le sérum polyclonal au cours des différentes étapes de purification du sérum (dilution du sérum : 1:2500)

S0 : sérum initial (avant purification)

S1 : sérum passé une fois sur une colonne MBP

S2 : sérum passé deux fois sur une colonne MBP

S3 : sérum passé trois fois sur une colonne MBP

E : anticorps anti-MBP élués de la colonne MBP

Une fois cette étape réalisée avec succès, il est possible de fabriquer une seconde résine avec les polymères MBP-CHMP4B qui peuvent être obtenus facilement en quantité suffisante (contrairement aux polymères CHMP4B sans MBP). Après passage sur cette seconde colonne, on ne récupère donc que les anticorps anti-CHMP4B dans l'éluat - tous les autres anticorps présents dans le sérum étant éliminés lors du lavage de la colonne (Figure 48).

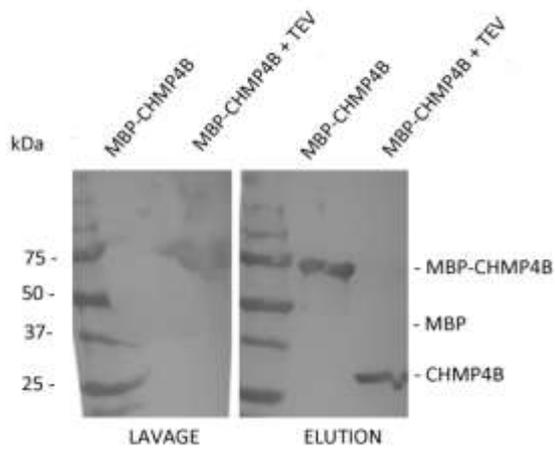
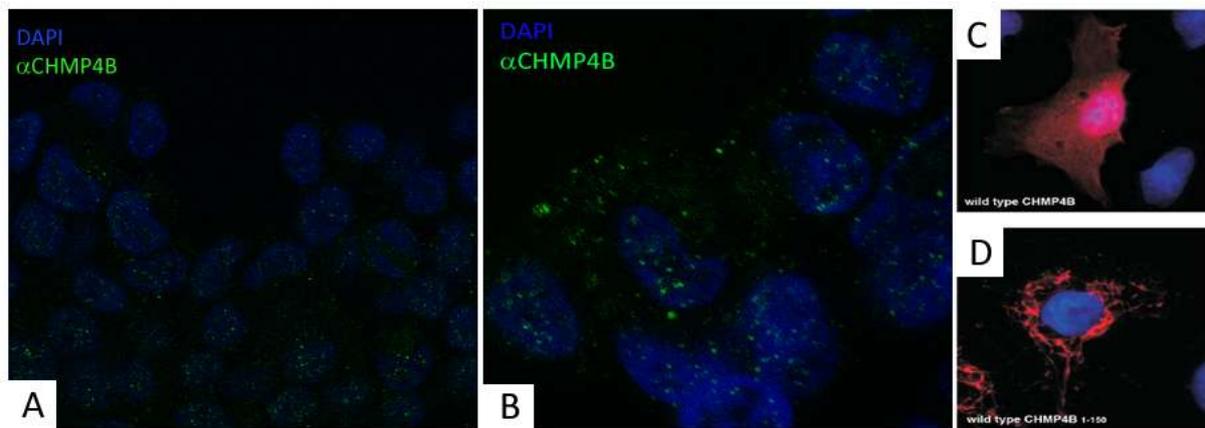


Figure 48 : Purification des anticorps anti-CHMP4B. Le sérum polyclonal déplété en anti-MBP est passé sur une colonne de polymères MBP-CHMP4B. L'activité anti-CHMP4B est ensuite testée par western blot (dilution du sérum et de l'éluat : 1:2500).



E

dilutions de l'anti-CHMP4B purifié :

1:500	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:10000	
1,099	0,794	0,593	0,473	0,422	0,369	0,191	CHMP4b monomère
1,031	0,780	0,568	0,433	0,396	0,341	0,200	CHMP4b polymère
0,051	0,041	0,049	0,056	0,052	0,052	0,038	CHMP3
0,061	0,053	0,045	0,050	0,056	0,052	0,043	MBP

CONTROLES:

pas d'anticorps primaire		Rabbit anti-CHMP4 (1:500)		anti-MBP purifié (1:500)	
0,043	CHMP4b monomère	0,825	CHMP4b monomère	1,089	MBP
0,050	CMP4b polymère	0,901	CMP4b polymère		
0,048	CHMP3	0,049	CHMP3		
0,047	MBP				

Figure 49 : Test de l'anticorps anti-CHMP4B purifié dans les cellules HEK293T transfectées avec CHMP4B. **A et B.** L'anticorps anti-CHMP4B présente un marquage ponctiforme intracytoplasmique. **C et D.** Localisation subcellulaire de CHMP4B dans des cellules COS-7 (d'après [158]). CHMP4 full length présente un marquage cytoplasmique homogène (**C.**) alors qu'une troncation C-terminale (1-150 ; **D.**) est distribuée au sein de puncta. **E.** Test par ELISA de la spécificité de l'anti-CHMP4B purifié. Les contrôles positifs ont été réalisés avec un anticorps polyclonal anti-CHMP4B non purifié ainsi qu'avec l'anticorps anti-MBP purifié précédemment (Figure 47).

J'ai enfin testé l'anticorps purifié dans des cellules HEK293T afin de visualiser la présence ainsi que la localisation de CHMP4B (Figure 49). Le marquage obtenu est ponctiforme et semble indiquer une localisation au sein de structures endosomales. Bien que cela reste à confirmer, sur la base de ce résultat, il semble que l'anti-CHMP4B développé ici soit capable de reconnaître des structures polymériques dans les cellules. Les données issues d'un test ELISA montrent que l'anticorps interagît avec les polymères et les monomères, ce qui est attendu étant donné que l'anticorps fonctionne en western blot et reconnaît donc au moins un épitope séquentiel (Figure 49E). En revanche, il n'y a pas de réaction croisée avec la protéine CHMP3 et l'anticorps purifié ne reconnaît plus la MBP, ce qui confirme que la purification a bien fonctionné.

3.3.2.3. Discussion

J'ai pu mettre au point un protocole permettant de purifier des polymères filamenteux de CHMP2A et CHMP4B. J'ai également développé un anticorps reconnaissant spécifiquement CHMP4B.

Les polymères de CHMP2A et CHMP4B sont morphologiquement très similaires. Les polymères obtenus ici après purification ressemblent beaucoup à ceux observés avec CHMP4B *in cellulo* [78]. Les structures polymériques sont peu solubles et agrègent rapidement en l'absence de MBP. La concentration en sel joue un rôle prépondérant dans la stabilisation des polymères. En effet, pour une concentration en sel relativement basse (300 mM inclus), les filaments sont instables (Figure 43). En revanche, au-delà de 500 mM, les filaments peuvent être maintenus. Les protéines CHMP étant très chargées, en l'absence de suffisamment d'ions et sans la présence de MBP pour assurer un encombrement stérique, ces interactions sont probablement très favorisées et les polymères se regroupent dans des agrégats massifs. Il est intéressant de constater qu'un phénomène semblable s'observe avec les hétéropolymères CHMP2A/CHMP3. Dans ce dernier cas, l'élimination de la MBP permet de découvrir une surface d'interaction forte avec les phospholipides (voir section 3.1.2.2.3.), ce qui semble accréditer l'hypothèse d'un rôle actif des charges présentes en surface des polymères dans le processus de formation spontanée d'agrégats protéiques.

L'anticorps anti CHMP4B obtenu ici marque des points dans le cytoplasme des cellules HEK293T. Ce marquage correspond à ce que l'on observe avec une troncation constitutivement active de CHMP4B (Figure 49D) [80], [158]. Ainsi, l'anticorps semble capable de reconnaître les structures polymériques de CHMP4B dans les cellules. Le test ELISA confirme par ailleurs que cet anticorps réagit avec les polymères CHMP4B obtenus *in vitro*.

Une caractérisation plus poussée sera nécessaire pour déterminer exactement la spécificité de cet anticorps polyclonal pour les polymères endogènes dans les cellules. Par la suite, des expériences d'immunogold sur des cellules exprimant des pseudo particules rétrovirales permettraient de mettre en évidence la présence de polymères de CHMP4B au niveau du site de bourgeonnement.

3.4. Test de modèles de polymérisation

3.4.1.1. Introduction

Afin de tenter de comprendre comment les protéines CHMP interagissent entre elles au sein des polymères, plusieurs modèles susceptibles d'expliquer la façon de former les polymères ont été développés dans le laboratoire. Ces modèles se basent sur la structure de la protéine CHMP3 [87] qui possède quatre hélices alpha (voir Figure 7).

Pour former un filament tel qu'il en existe dans les polymères CHMP obtenus *in vitro*, il doit y avoir au minimum deux patchs d'interaction distincts par monomère. La plupart des filaments visualisés par microscopie électronique sont fins (3 nm environ) et flexibles. La structure compacte du monomère CHMP3 ne permettant pas d'expliquer cette flexibilité, il est probable que les monomères subissent un changement conformationnel pour polymériser. Une des manières les plus simples d'expliquer le processus implique un échange d'hélices entre monomères. Cette hypothèse permet d'expliquer la flexibilité des polymères (Figure 50).

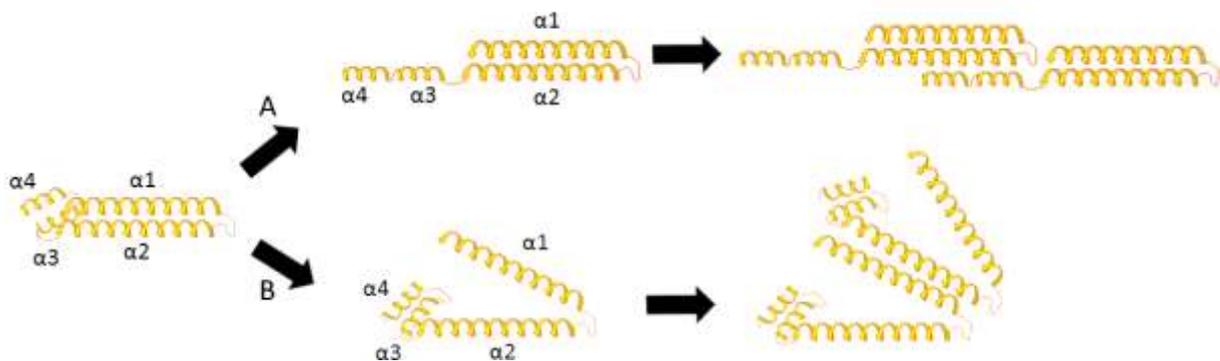


Figure 50 : Modèles d'assemblage des protéines CHMP. La structure des monomères CHMP explique difficilement la relative flexibilité de certains polymères. Une hypothèse pouvant résoudre cette contradiction implique l'échange d'hélices alpha entre monomères. Dans cette hypothèse, la flexibilité est apportée par les régions non structurées. **A.** Une première possibilité implique une interaction entre $\alpha 3/\alpha 4$ d'une part et $\alpha 1/\alpha 2$ du monomère suivant d'autre part. **B.** La deuxième possibilité implique des interactions latérales entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de monomères CHMP différents. Ces deux possibilités ne sont pas exclusives.

La queue C-terminale des protéines CHMP joue un rôle autoinhibiteur qui verrouille la protéine dans une conformation inactive. Cela a été notamment démontré à l'aide de troncations N-terminales et C-terminales par le biais de pulldowns [85]. Lorsque cette inhibition est supprimée, il

est alors possible pour le monomère d'adopter une conformation ouverte permettant la formation de polymères.

Pour tester ce modèle, j'ai donc entrepris de tester différentes troncations des protéines CHMP2A et CHMP3 et de mélanger différentes combinaisons de constructions afin d'essayer d'obtenir un complexe entre les hélices qui soit présent dans le polymère. Cette stratégie s'inspire de celle utilisée pour caractériser l'autoinhibition car elle s'est avérée efficace [85].

3.4.1.2. Résultats

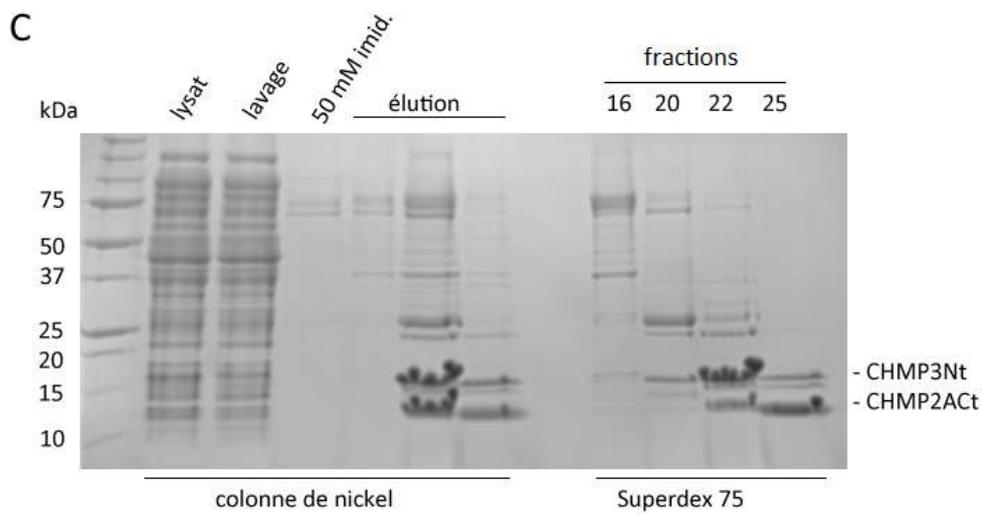
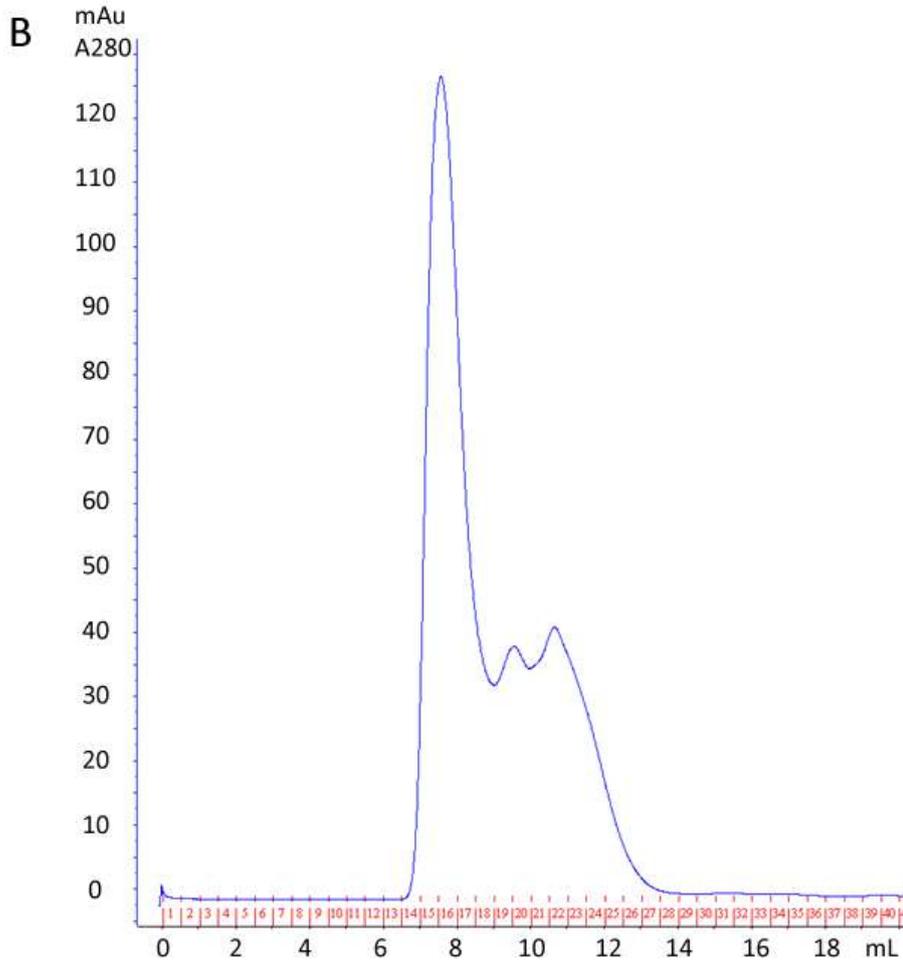
CHMP2A et CHMP3 interagissent pour former des hétéropolymères tubulaires. Je me suis donc focalisé sur ces deux protéines afin d'isoler un dimère minimal. La structure cristallographique de ce dimère pourrait alors être modélisée au sein de l'unité asymétrique de la structure basse résolution des tubes obtenue par cryo-microscopie électronique.

J'ai tout d'abord testé les interactions putatives entre la partie $\alpha 3/\alpha 4$ et la partie $\alpha 1/\alpha 2$. La première combinaison testée contient la boucle formée par $\alpha 1/\alpha 2$ de CHMP3 avec les hélices $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ (Figure 51A). Bien que les niveaux d'expression soient très bas, les deux protéines ont été copurifiées en quantité suffisante pour effectuer des tests d'interaction. A l'issue d'une colonne gel filtration, on observe un décalage entre les pics correspondant à chacune des deux troncations. Ceci indique que s'il y a un complexe formé, l'affinité n'est pas assez forte pour résister en gel filtration (Figure 51B et 51C).

Un cross-linking chimique a été tenté sur le mélange ainsi qu'un gel natif (Figure 51D et 51E). Le cross linking n'a permis de mettre en évidence aucun complexe. De plus, la bande majoritaire sur le gel natif a été analysée sur gel SDS-PAGE et elle ne contient que la partie N-terminale de CHMP3. Ces résultats indiquent que ces deux constructions n'interagissent pas.

J'ai ensuite entrepris de tester la combinaison inverse à savoir CHMP2ANt (1-108) et CHMP3Ct (105-161). Cette fois-ci l'hélice $\alpha 5$ dans la troncation C-terminale n'a pas été incluse dans la construction car il est possible qu'elle inhibe la formation du complexe. Malheureusement, il a été impossible d'exprimer la troncation N-terminale. Pour tenter de contourner ce problème de toxicité de la partie N-terminale, j'ai tenté de coexprimer les partie N-terminale (1-102) et C-terminale (103-159) de CHMP2A puisqu'elle peut former des polymères seule. Cette stratégie n'a cependant pas permis d'augmenter les niveaux d'expression.

Des travaux ayant montré que les neuf premiers acides aminés de CHMP2B semblent impliqués dans l'interaction avec la membrane [81], j'ai réessayé de coexprimer les deux fragments CHMP2A mais en commençant cette fois au 10^{ème} résidu pour la troncation N-terminale ; cela n'a donné aucun résultat. J'ai également cloné des troncations afin de tester la formation d'éventuels complexes entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la protéine CHMP2A mais cette fois-ci, bien que les deux protéines soient exprimées, la partie comprenant $\alpha 2$ est complètement insoluble, y compris avec un tag GST.



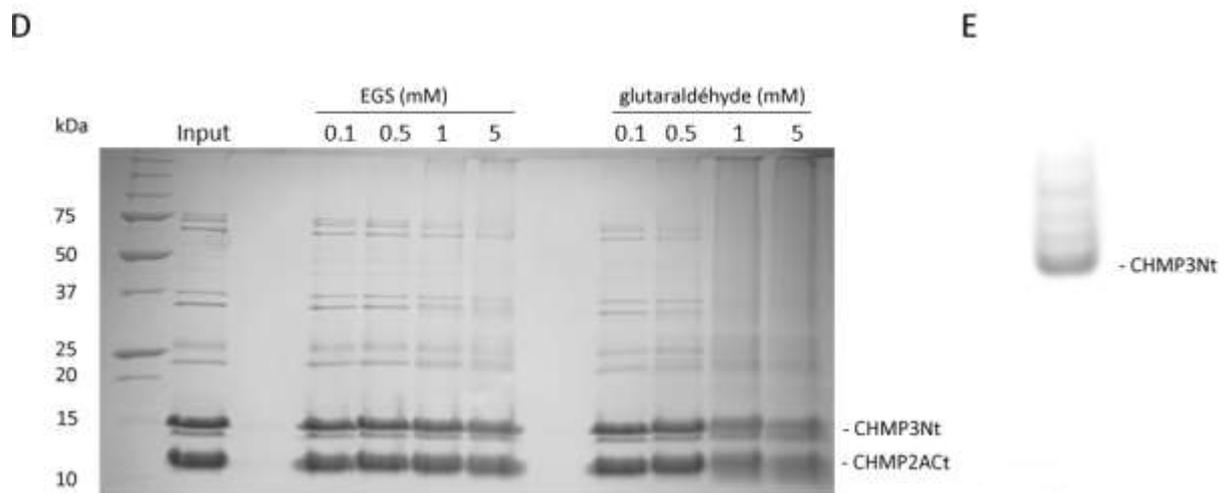


Figure 51 : Purification et test d'interaction des constructions CHMP3Nt et CHMP2Act. **A.** CHMP3Nt comprend les deux premières hélices alpha de CHMP3 (résidus 1-103 ; 15,1 kDa). CHMP2Act correspond aux hélices $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ (résidus 104-181 ; 11,2 kDa). **B et C.** Purification des tronctions par colonne de nickel et chromatographie d'exclusion de taille. Les deux protéines ne coéluent par sur gel filtration. **D.** Expérience de cross-linking chimique. Ni le glutaraldéhyde ni l'EGS ne permettent d'obtenir un complexe lié de manière covalente (taille attendue 26 kDa). **E.** Gel natif réalisé sur le mélange protéique ; la bande intense observé contient uniquement CHMP3Nt.

Troncation 1		Troncation 2		Problème rencontré
His-MBP-CHMP2A 1-53	+	His-GST-CHMP2A 54-103		Troncation 2 insoluble
His-MBP-CHMP2A 10-53	+	His-GST-CHMP2A 54-103		Troncation 2 insoluble
His-CHMP2A 1-102	+	CHMP2A 103-159		Aucune expression
His-CHMP2A 10-102	+	CHMP2A 103-159		Aucune expression
His-CHMP3 1-103	+	His-CHMP2A 104-181		Très faible expression
His-CHMP3 1-103	+	His-CHMP2A 115-161		Troncation 1 peu exprimée
His-CHMP2A 1-118	+	His-GST-CHMP3 105-161		Troncation 1 non exprimée
His-GST-CHMP2A 1-118	+	His-MBP-CHMP3 105-161		Troncation 1 insoluble

Tableau 2 : Liste des combinaisons de constructions testées.

Etant donné les nombreux problèmes d'expression/solubilité rencontrés, une stratégie alternative basée sur le verrouillage contrôlé de la protéine CHMP3 a été mise au point. Ce verrouillage est opéré en remplaçant des résidus se faisant face dans la structure de CHMP3 par des cystéines. De cette manière, il est possible de créer un pont disulfure entre deux hélices alpha choisies pour verrouiller la structure. Deux types de mutants cystéine ont été testés : un mutant verrouillé entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et un autre entre $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Les deux mutants ont été testés pour leur aptitude à former des polymères tubulaires avec CHMP2A. Les résultats indiquent que les mutants sont tous deux capables de former des tubes, indépendamment de la présence d'agent réducteur (Figure 52). Cette stratégie alternative ne permet donc pas non plus de déterminer si les hypothèses de départ sont correctes. D'ailleurs, si l'on admet que le monomère est effectivement verrouillé (dans la condition sans agent réducteur) dans une conformation semblable à celle du cristal CHMP3, alors cela signifie qu'un changement conformationnel n'est pas requis pour former les tubes. On ne peut cependant pas exclure que le pont disulfure ne se forme pas correctement sans agent réducteur.

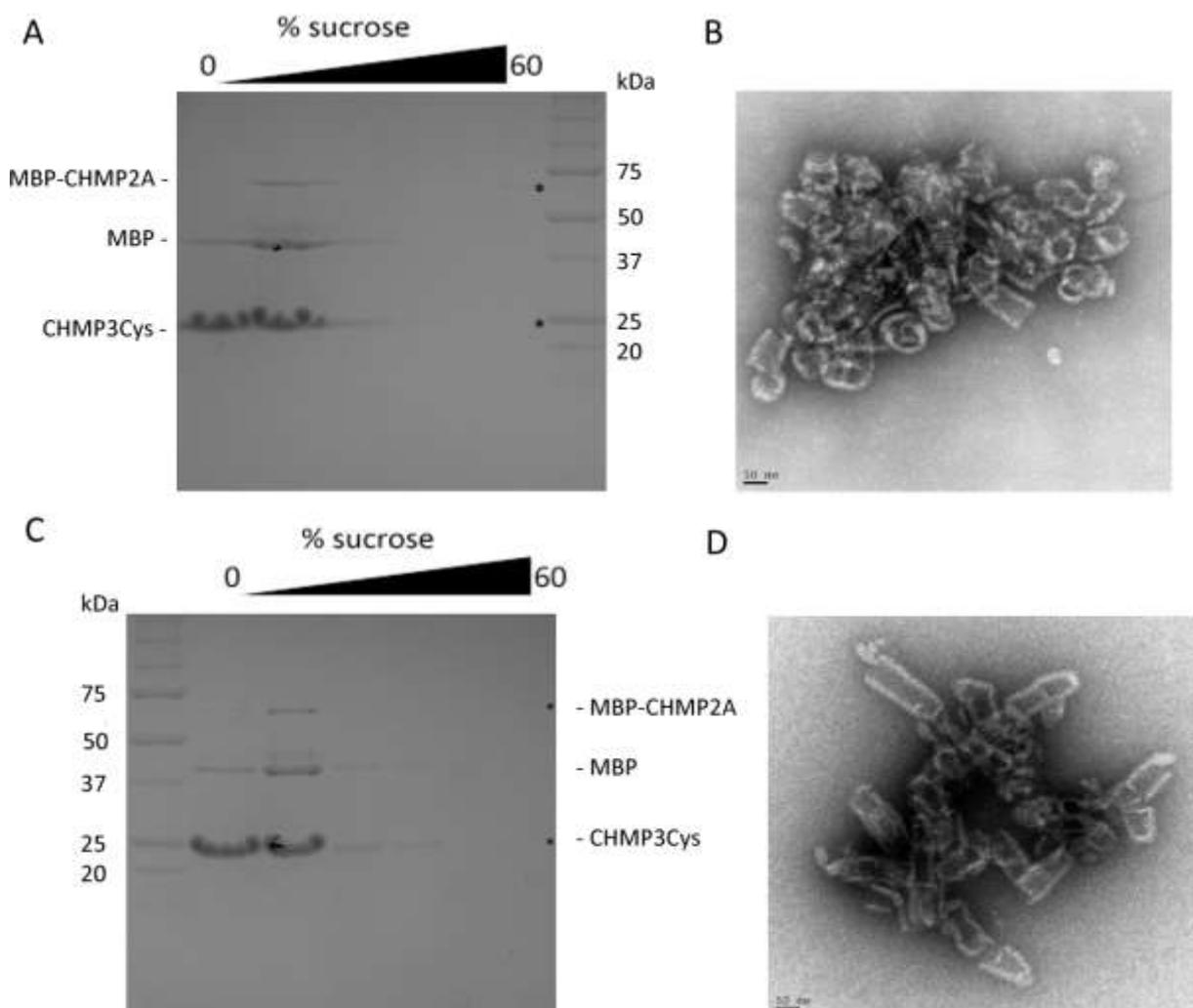


Figure 52 : Essais de polymérisation avec le mutant CHMP3Cys comportant un pont disulfure potentiel entre $\alpha 2$ et $\alpha 3$. **A.** Gradient de sucrose réalisé en mélangeant un large excès de mutant CHMP3Cys avec la protéine MBP-CHMP2A : bien que peu visibles, les deux protéines sont présentes en bas du gradient (astérisques). **B.** image de microscopie électronique (coloration négative) de la fraction 60% sucrose : des tubes sont effectivement

présents. **C.** Gradient de sucrose réalisé en mélangeant un large excès de mutant CHMP3Cys avec la protéine MBP-CHMP2A en présence de 10 mM de β -mercaptoéthanol : les deux protéines sont présentes en bas du gradient (astérisques). **D.** image de microscopie électronique (coloration négative) de la fraction 60% sucrose en présence de 10 mM de β -mercaptoéthanol : là encore, il y a formation de polymères. Le mutant comportant un pont disulfure entre les hélices α 1 et α 2 affiche un comportement similaire.

3.4.1.3. Discussion

En dépit du fait d'avoir utilisé différentes approches pour tenter de percer le mécanisme de polymérisation des protéines CHMP, il n'a pas été possible d'apporter de nouveaux éléments sur cette question. Les nombreux problèmes de purification ont empêché une analyse systématique des parties requises pour l'interaction entre les protéines CHMP2A et CHMP3. Les travaux menés sur l'autoinhibition utilisaient des tronctions dans la queue C-terminale (non impliquée dans la polymérisation) et un cœur α 1-4 intact [85]. La déstabilisation du cœur N-terminal apparaît donc comme la source des problèmes rencontrés ici. La région minimale commune à toutes les tronctions ayant posé problème est l'hélice α 2. Cette hélice semble présenter une certaine toxicité pour les bactéries, possiblement par une association forte avec la membrane plasmique. La présence d'un tag MBP ou GST en N-terminal permet d'exprimer les tronctions, toutefois celles-ci restent complètement insolubles. La coexpression d' α 2 avec α 1 n'a pas permis de contourner le problème de toxicité. Il doit donc y avoir une action concertée d' α 1-2 et α 3-4 dans le processus de stabilisation du monomère. De ce fait, il semble difficile de pouvoir disséquer le mécanisme de polymérisation en utilisant des fragments d'hélice isolés car leur comportement en solution n'a plus rien à voir avec le monomère α 1-4.

L'utilisation des mutants cystéine n'a pas non plus permis de trouver le mécanisme bloquant la polymérisation. Le fait que les mutants soient capables de former des tubes semble même indiquer qu'il n'y ait pas de changement conformationnel. Ces données sont cependant trop partielles pour pouvoir clairement trancher en défaveur du modèle de départ d'autant plus que les données structurales obtenues sur les polymères CHMP2A/CHMP3 suggèrent elles aussi la présence d'un changement conformationnel. Enfin, il faudrait confirmer que les mutants forment effectivement un pont disulfure en utilisant par exemple des réactifs spécifiques des thiols libres.

4. Discussion et perspectives

La structure des tubes CHMP2A/CHMP3 à 22,4 Å révèle la présence d'une surface externe lisse permettant l'interaction avec les lipides (Figures 22 et 23). Cette observation confirme de précédents travaux réalisés avec ces polymères [73]. Cette surface d'interaction spécifique des lipides confère aux tubes CHMP2A/CHMP3 la capacité de catalyser des réactions de fission/fusion membranaire (Figure 22) [82]. Une des particularités des polymères tubulaires CHMP2A/CHMP3 (partagée avec les homopolymères CHMP2B [81]) est leur remarquable plasticité d'assemblage qui autorise la formation de structures ordonnées en forme de dôme. Cette caractéristique apparaît fondamentale pour permettre un rétrécissement efficace du col membranaire dans un contexte fonctionnel *in cellulo* [82], [124]. L'analyse des polymères par cryo-microscopie électronique a non seulement permis de confirmer l'aptitude des protéines CHMP2A/CHMP3 à former des structures aussi complexes que les dômes, mais aussi à lever le voile sur une diversité insoupçonnée dans le mécanisme d'assemblage des polymères. En effet, il apparaît que des polymères *a priori* morphologiquement indistincts peuvent être issus d'assemblages hélicoïdaux très différents (Figure 17C). Il n'est pas exclu que cette impressionnante flexibilité dans l'assemblage ait des implications fonctionnelles ou puisse être régulée afin de moduler la cinétique et l'efficacité de la réaction catalysée par ESCRT-III. Malgré ces variations, les polymères CHMP2A/CHMP3, CHMP2A et CHMP4B semblent constitués du même filament de base (Figures 18, 19 et 44C) dont la largeur se situe autour de 3 nm [160] [75]. Les similarités morphologiques présentées par les filaments circulaires que ces protéines peuvent former tendent à montrer que les protéines ESCRT-III polymérisent selon un modèle unique. De manière tout à fait intéressante, les données de SPR mettent en évidence la présence de deux modes d'interaction entre protéines CHMP (Figure 33). Il est tentant d'attribuer à la première interface de forte affinité la constitution du filament et à la seconde interface le repliement du filament sur lui-même et son organisation spatiale. Cette seconde interface étant par ailleurs de plus faible affinité, on peut supposer qu'elle autorise l'apparition de structures alternatives comme cela existe pour les tubes CHMP2A/CHMP3.

La grande stabilité des structures polymériques constatée ici (Figures 20, 21 et 43C) s'explique très bien par la multiplicité des zones de contact observables dans la structure tridimensionnelle des tubes CHMP2A/CHMP3 (Figure 18). L'effet stabilisateur de la polymérisation explique également que (i) la réaction d'assemblage des monomères CHMP soit spontanée et que (ii) il soit nécessaire d'apporter une grande quantité d'énergie (au travers de l'ATPase VPS4) pour défaire de telles structures [9], [73]. Cette impressionnante solidité des polymères, conjuguée à leur forte affinité pour les membranes lipidiques, leur autorise de déformer les structures membranaires ainsi que de les maintenir dans des formes énergétiquement défavorables afin de permettre la réaction de fission de se produire [82].

Seule la partie N-terminale des protéines CHMP2A et CHMP3 (hélices $\alpha 1$ - $\alpha 4$) est impliquée dans la formation du polymère (Figure 21). C'est cette partie des protéines CHMP qui est responsable de leur activité de polymérisation [80], [85], [76]. La manière dont les monomères s'assemblent pour former un filament reste obscure. Au sein des cristaux de la protéine CHMP3, des contacts hydrophobes au niveau de la pointe formée par les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont susceptibles d'exister dans

le polymère [87], [76]. Cette interface positionne chacun des deux monomères CHMP3 dans une orientation inverse par rapport à l'autre. Si une telle interface est effectivement présente dans le polymère, il doit en exister au moins une autre afin de former une chaîne pour produire un filament. Les résidus hydrophobes impliqués dans cette interface supposée sont normalement exposés au solvant et certains d'entre eux (valines 59 et 62 sur CHMP3) sont nécessaires à l'interaction avec CHMP2A ainsi qu'à la polymérisation [76]. Les problèmes de toxicité rencontrés avec les tronctions peuvent être dus à une plus forte exposition de ces résidus hydrophobes au solvant conduisant à la déstabilisation du peptide. L'isolement de chacune des hélices au sein de tronctions rompt les contacts stabilisant l'ensemble formant le monomère CHMP, il n'est donc pas exclu que les constructions testées dans ce travail ne soient pas correctement repliées, même lorsqu'elles se trouvent couplées à la GST ou la MBP. Toutes les constructions posant problème avaient en commun de comporter l'hélice $\alpha 2$ qui contient précisément une partie de ces résidus hydrophobes impliqués dans la formation des tubes CHMP2A/CHMP3. Des problèmes similaires mais moins importants sont rencontrés pour l'expression de l'hélice $\alpha 1$. Ainsi, les dix premiers acides aminés semblent importants pour l'interaction avec la membrane comme cela a été montré pour CHMP2B [81] et peuvent donc poser des problèmes d'expression et/ou de solubilité. En revanche, aucun problème de solubilité ne s'est présenté pour les parties $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (du moins lorsqu'elles sont fusionnées à la GST/MBP). Le rôle des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ est en effet moins clair, des données ayant montré qu'une construction N-terminale de CHMP4A ne comportant pas $\alpha 4$ (résidus 1-116) est capable de former des polymères ainsi que de déformer les membranes lipidiques dans les cellules [78]. Ces polymères étant toutefois de dimensions plus modestes que ceux générés de la même manière avec la protéine entière. Il est possible que la formation du filament requiert les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (ce qui correspond vraisemblablement à l'interface de forte affinité identifiée par SPR) et que les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ ne soient nécessaires que pour la formation de lien entre filaments (interface de faible affinité). Il serait intéressant de développer des approches à base de mutants pour chacune des 4 hélices N-terminales afin d'identifier plus clairement la contribution de chaque partie du monomère dans les interfaces identifiées par SPR.

Une interaction très forte a été identifiée en SPR entre les polymères CHMP4B et la protéine CHMP2A (monomérique). L'interaction entre ces deux protéines est documentée, elle implique au moins en partie des résidus chargés et hydrophobes situés entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de la protéine CHMP4B (E104, V105, L106 et K107) d'une part et des résidus basiques de l'hélice $\alpha 1$ de CHMP2A (R24, R27 et R31) d'autre part [88]. Cela ne permet toutefois pas de comprendre comment les deux protéines interagissent. Il est probable que le mode d'interaction entre CHMP2A et CHMP4B diffère selon que CHMP4B est monomérique ou présente sous forme de polymères. Les données de SPR tendent à aller dans le sens de cette hypothèse (comparer les figures 29 et 31) ; des phénomènes d'avidité ainsi que de changements conformationnels dans le polymère pouvant alors expliquer ces différences. Le rôle clef des protéines CHMP4 et CHMP2 au sein d'ESCRT-III est bien établi, il semble en effet que ces deux protéines constituent l'essentiel du polymère dans certains contextes (comme le bourgeonnement viral) et que CHMP2A agisse en aval de CHMP4 [8], [79], [88].

On voit clairement qu'une concentration de seulement 300 nM de CHMP2A est suffisante pour provoquer son assemblage en présence de polymères de CHMP4B (Figure 31A). Ceci n'est pas constaté avec les monomères CHMP4B et il semble donc que les polymères CHMP4B jouent un rôle d'activateurs, potentiellement en induisant sur CHMP2A l'adoption d'une conformation permettant

la polymérisation. Cette très forte interaction détectée entre CHMP2A et les polymères CHMP4B n'a pas pu être reproduite biochimiquement. Cela pose la question de la réalité de ce qui est enregistré par SPR entre ces deux protéines. Même si cette affinité n'est probablement pas aussi forte que 5 nM ; il paraît difficile de considérer le phénomène d'activation détecté uniquement en présence des polymères comme un artefact. Il serait intéressant d'effectuer l'expérience inverse avec des polymères CHMP2A et des monomères CHMP4B afin d'observer si l'on constate le même phénomène d'activation.

Si l'on met à part cette interaction, les affinités déterminées par SPR montrent que CHMP4B (monomère et polymère) et CHMP3 interagissent assez fortement avec une affinité de l'ordre du dixième de micromolaire (Figures 30 et 32). Cette affinité se démarque des autres interactions qui sont toutes mesurées autour du micromolaire. Cela tend à montrer que CHMP3 serait le premier à arriver au site de polymérisation après CHMP4B puis il recruterait CHMP2A. Cet ordre d'arrivée au site de polymérisation est en accord avec les données disponibles sur ESCRT-III [8], [79], [157]. Il est toutefois difficile d'établir une séquence précise d'assemblage des protéines CHMP sur la seule base des affinités déterminées en SPR. En effet, les valeurs des constantes de dissociation ne sont que peu différentes et il doit exister des facteurs externes régulant l'arrivée d'une protéine CHMP donnée au sein du polymère durant l'assemblage d'ESCRT-III à la membrane.

Ainsi, le phénomène d'activation constaté entre les polymères CHMP4B et les monomères CHMP2A ne se retrouve pas avec CHMP3 (Figure 32). L'homologue de CHMP3 chez la levure peut former des homopolymères [74]. De même, CHMP3 peut former des structures polymériques en anneaux. Cependant, ces structures n'apparaissent qu'en concentrant la protéine (>10 mg/mL), ce qui n'est pas le cas de CHMP2A qui forme des polymères beaucoup plus facilement sans que l'on ait à forcer la réaction. Or sur les profils de chromatographie d'exclusion de taille de CHMP3, il n'y a pas de pic correspondant à une forme polymérique (Figures 14A et 25B) ; il n'est donc pas surprenant que même en présence de polymères CHMP4B, CHMP3 affiche la même affinité qu'avec les monomères (Figures 30 et 32). La protéine CHMP3 possède une affinité d'environ 3-4 μ M pour CHMP2A (Figure 27), cette valeur est également corrélée avec ce qui a été décrit sur l'interaction entre ces deux protéines [73]. La queue C-terminale autoinhibitrice de CHMP3 et CHMP2A ont été identifiés comme freins à la formation de polymères [73], [76]. Cependant, la formation de tubes reste possible avec une construction full-length de CHMP3 (voir section 2.1.1.) et la présence des hélices α 5 et α 6 sur cette dernière n'empêche pas l'interaction avec CHMP2A (Figures 27 et 28). Cela confirme que la régulation de CHMP3 par sa queue C-terminale est moins stricte que pour une protéine comme CHMP2A, comme cela avait été observé précédemment [73], [86].

En dépit des similarités structurales existant entre protéines CHMP, chaque membre d'ESCRT-III semble exercer une fonction bien précise [157]. En se basant sur les données disponibles ainsi que sur les résultats obtenus ici ; il est possible de présenter un modèle de fonctionnement d'un complexe ESCRT-III minimal tel qu'il doit exister lors du bourgeonnement viral (Figure 53). Après intervention des facteurs agissant en amont d'ESCRT-III, il y a formation d'un large col membranaire rattachant la vésicule à la membrane (Figure 53A, B). Ce col ne peut se résoudre par scission sans rapprochement des membranes. L'activation d'ESCRT-III conduit donc à la formation de polymères circulaires CHMP4 qui rétrécissent le diamètre du col membranaire [78], [75] (Figure 53 C). Lorsque les polymères CHMP4 sont assemblés, il y a recrutement de la protéine CHMP3 qui à son tour recrute

CHMP2A (Figure 53D). La séquence d'apparition des trois protéines est dictée au moins en partie par la force des affinités respectives existant entre les différents partenaires. CHMP3 et CHMP2A forment ensuite un hétéropolymère en forme de dôme qui interagit fortement avec la membrane. La grande stabilité du polymère permet de fournir l'énergie nécessaire à la fermeture du col membranaire ainsi qu'à son maintien de la contrainte exercée à ce niveau (Figure 53E). La dernière étape du processus conduit à la fission membranaire après intervention de l'ATPase VPS4 qui fournit l'énergie nécessaire à la déstabilisation de la structure ainsi formée par désassemblage du polymère (Figure 53F).

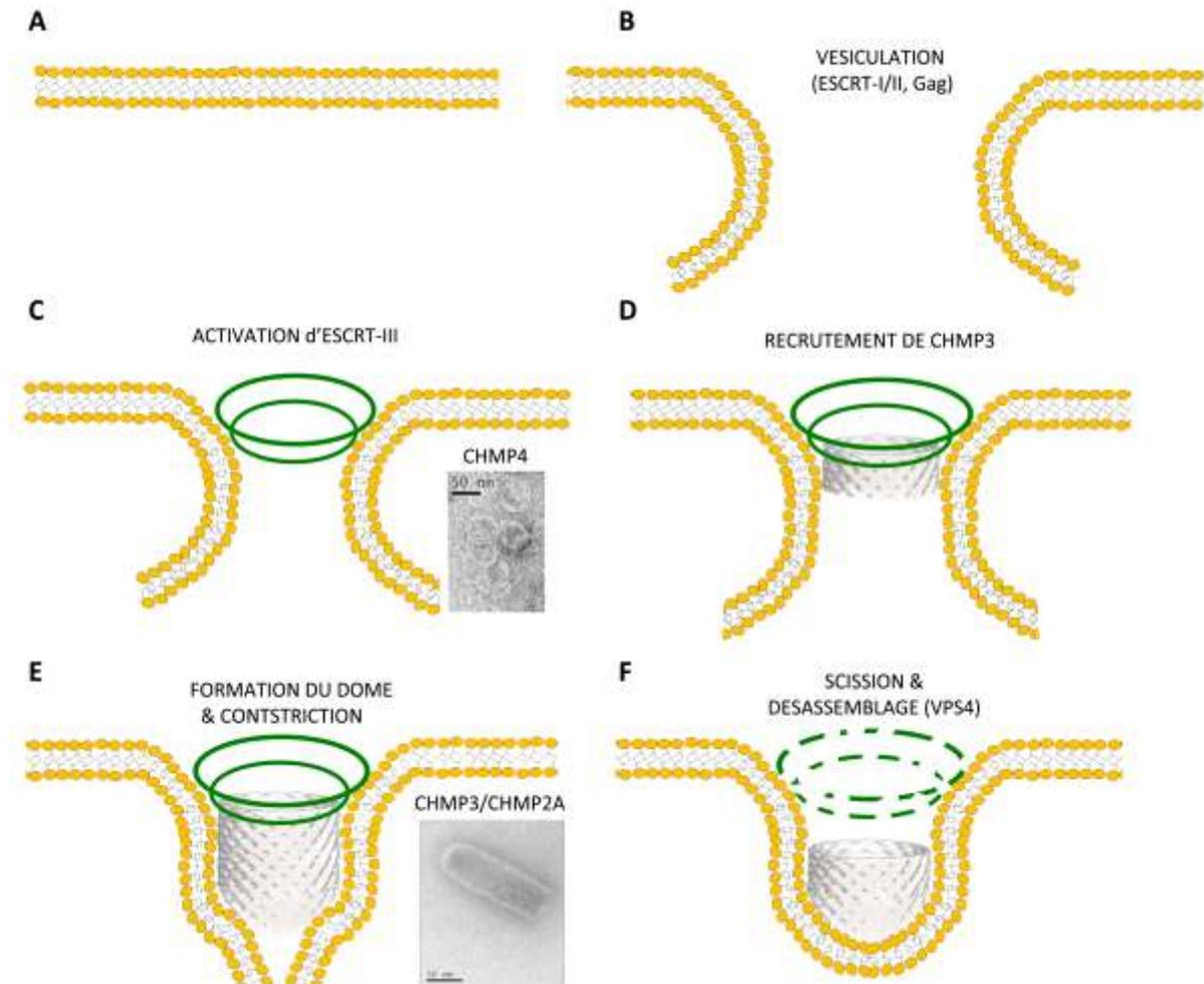


Figure 53 : Modèle de formation d'ESCRT-III basé sur les données bibliographiques et sur les résultats présentés dans ce manuscrit. **A.** Membrane lipidique avant déformation. **B.** Vésiculation provoquée par la machinerie ESCRT ou Gag dans le cas du bourgeonnement viral. **C.** Rétrécissement du col membranaire provoqué par l'activation d'ESCRT-III. La protéine CHMP4 assure le maintien et le rétrécissement du col membranaire qui rattache la vésicule (ou le virion) en formation en formant des polymères circulaires. **D.** Une fois le polymère CHMP4 formé, la protéine CHMP3 est recrutée ; elle amorce alors la formation d'un hétéropolymère avec CHMP2A. **E.** Le polymère CHMP3/CHMP2A forme une structure tubulaire se terminant par un dôme. La surface externe de cette structure interagit fortement avec la membrane et referme ainsi le col membranaire. **F.** L'arrivée de l'ATPase VPS4 permet le recyclage et la libération de la vésicule/du virion en désassemblant le polymère ainsi formé. Après désassemblage complet, la vésicule est libérée et la membrane reprend sa forme (**A.**).

Les travaux visant à obtenir un anticorps spécifique des polymères ESCRT-III se basent sur la présence d'un épitope présent dans le polymère uniquement. Idéalement, l'anticorps ne doit pas produire de réaction croisée avec les monomères. De tels épitopes doivent être présents dans les polymères à l'interface entre protéines CHMP ou encore dans des conformations spécifiques de ces protéines, comme le suggère la reconstruction tridimensionnelle des polymères CHMP2A/CHMP3 (section 3.1.1.2.2.). Cependant, ces épitopes sont peut être masqués dans le polymère et ils doivent certainement coexister avec d'autres épitopes structurellement redondants avec les monomères CHMP. C'est ce qui semble expliquer au moins en partie l'absence de clones franchement positifs en Phage Display. La localisation intracellulaire de l'anti CHMP4B obtenu dans ce travail suggère une forte interaction avec des structures polymériques. Des travaux menés sur les protéines CHMP et plus particulièrement CHMP4 montrent que les monomères ont une distribution homogène dans le cytoplasme. A l'inverse, les protéines activées (délétions C-terminales) affichent un marquage ponctiforme hétérogène [80], [84]. C'est précisément ce type de marquage qui est observé avec l'anti-CHMP4B purifié ici (Figures 49 A et B). Bien que la construction CHMP4B utilisée soit couplée à la protéine fluorescente DsRed, il n'a pas été possible de colocaliser son signal avec les puncta ciblés par l'anticorps. Cependant, le même type de marquage a été observé sur des cellules non transfectées ce qui tend à montrer que l'anti-CHMP4B obtenu ici reconnaît la protéine CHMP4B endogène. Bien qu'une caractérisation plus poussée de l'anticorps soit nécessaire afin d'éliminer toute possibilité de réaction croisée avec d'autres protéines cellulaires, les résultats obtenus en immunofluorescence avec cet anticorps concordent avec ce qui a été décrit dans la littérature pour CHMP4. En utilisant une colonne basée sur les monomères CHMP4B, il est aussi possible de poursuivre la purification de cet anticorps polyclonal afin de ne sélectionner que ce qui interagit avec les polymères. Cet anticorps pourra enfin être utilisé pour purifier les polymères ESCRT-III endogènes et les comparer aux polymères obtenus *in vitro* afin de mieux comprendre la composition et la formation d'ESCRT-III dans les cellules. Ce type d'expérience devrait permettre à terme de valider ou d'infirmer le modèle présenté en figure 53.

Ce travail a permis de poser des bases structurales pour la compréhension du mécanisme de polymérisation des protéines CHMP. Les polymères sont très stables en raison des multiples contacts visibles dans la structure des tubes. Les interfaces entre monomères présentent des affinités bien distinctes pour permettre un assemblage ordonné. Les polymères CHMP2A/CHMP3 forment des filaments hélicoïdaux qui peuvent s'associer ensemble pour former différents types d'hélices et cette grande plasticité d'assemblage est certainement nécessaire pour former des structures coniques (dont la structure varie à chaque tour d'hélice). Cette étude a également permis de lever le voile sur une partie du mécanisme de formation d'ESCRT-III. Bien que l'utilisation de tronçons se soit révélée infructueuse, la puissance de la technique SPR a permis de disséquer en détails l'interaction entre plusieurs protéines CHMP. Le protocole développé ici devrait permettre d'établir une véritable carte des interactions au sein d'ESCRT-III. En étendant ce type d'analyse aux autres protéines CHMP, il sera possible de mieux comprendre le mécanisme de formation d'ESCRT-III. Enfin, la conception de mutants incapables d'utiliser l'une ou l'autre des deux interfaces de polymérisation identifiées ici permettra de mieux cerner quelle partie des protéines CHMP est requise pour les interactions interfilament et intrafilament.

Cette étude fournit des méthodes pour la production, la purification ainsi que la caractérisation de polymères ESCRT-III et les données structurales et biophysiques obtenues ici tendent à montrer que les protéines CHMP partagent un mécanisme de polymérisation commun.

5. Annexes

5.1. Article 2 : CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B.

Martinelli N*, Hartlieb B*, Usami Y, Sabin C, **Dordor A**, Miguet N, Avilov SV, Ribeiro EA Jr, Göttlinger H, Weissenhorn W.

J Mol Biol. 2012 May 25;419 (1-2):75-88.

* : la contribution des auteurs est similaire.

- **Résumé de l'article:** Il a été montré que les protéines CHMP4B et CC2D1A interagissent [159]. En revanche, le rôle de CC2D1A reste obscur, notamment son implication dans le fonctionnement d'ESCRT. L'article confirme qu'il y a une interaction directe entre CC2D1A et CHMP4B et délimite les régions impliquées dans cette interaction. Un mutant CHMP4B incapable d'interagir avec CC2D1A est identifié et une troncation C-terminale de ce mutant s'avère incapable d'afficher un effet dominant négatif sur le bourgeonnement du VIH. Enfin, il est montré que CC2D1A impacte négativement la formation des polymères CHMP4B *in vitro*.

- **Contribution personnelle:** J'ai purifié la protéine CHMP4B et j'ai conduit les tests de polymérisation de CHMP4B en présence de CC2D1A présentés en figure 4 de l'article.



CC2D1A Is a Regulator of ESCRT-III CHMP4B

Nicolas Martinelli¹†, Bettina Hartlieb¹†, Yoshiko Usami²,
Charles Sabin¹, Aurelien Dordor¹, Nolwenn Miguet¹,
Sergiy V. Avilov^{1,3}, Euripedes A. Ribeiro Jr¹,
Heinrich Göttlinger² and Winfried Weissenhorn^{1*}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265, Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS,
6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School,
Worcester, MA 01605, USA

³European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP181,
38042 Grenoble Cedex 9, France

Received 13 January 2012;
received in revised form
29 February 2012;
accepted 29 February 2012
Available online
8 March 2012

Edited by E. O. Freed

Keywords:
CC2D1A;
Freud-1;
Aki-1;
Lgd;
ESCRT

Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) regulate diverse processes ranging from receptor sorting at endosomes to distinct steps in cell division and budding of some enveloped viruses. Common to all processes is the membrane recruitment of ESCRT-III that leads to membrane fission. Here, we show that CC2D1A is a novel regulator of ESCRT-III CHMP4B function. We demonstrate that CHMP4B interacts directly with CC2D1A and CC2D1B with nanomolar affinity by forming a 1:1 complex. Deletion mapping revealed a minimal CC2D1A–CHMP4B binding construct, which includes a short linear sequence within the third DM14 domain of CC2D1A. The CC2D1A binding site on CHMP4B was mapped to the N-terminal helical hairpin. Based on a crystal structure of the CHMP4B helical hairpin, two surface patches were identified that interfere with CC2D1A interaction as determined by surface plasmon resonance. Introducing these mutations into a C-terminal truncation of CHMP4B that exerts a potent dominant negative effect on human immunodeficiency virus type 1 budding revealed that one of the mutants lost this effect completely. This suggests that the identified CC2D1A binding surface might be required for CHMP4B polymerization, which is consistent with the finding that CC2D1A binding to CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*. Thus, CC2D1A might act as a negative regulator of CHMP4B function.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

*Corresponding author. E-mail address:
weissenhorn@embl.fr.

† N.M. and B.H. contributed equally to this work.

Abbreviations used: ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; Aki-1, Akt kinase interacting protein 1; TBK-1, Tank-binding kinase 1; Lgd, Lethal giant discs; SEC, size-exclusion chromatography; MALLS, multi-angle laser light scattering; ITC, isothermal titration calorimetry; SPR, surface plasmon resonance; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TEV, tobacco etch virus; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; β-ME, β-mercaptoethanol; MBP, maltose binding protein.

0022-2836/\$ - see front matter © 2012 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

The coiled-coil- and C2-domain-containing proteins A and B (CC2D1A, CC2D1B) are evolutionary conserved proteins that contain four *Drosophila melanogaster* 14 domains (DM14) of unknown function followed by a C2 domain. CC2D1A and CC2D1B are also known as Akt kinase interacting protein 1 (Aki-1), Five prime REpressor Under Dual repression binding protein 1 (Freud-1 and 2) and Tank-binding kinase 1 (TBK-1)-associated protein in

endolysosomes. The emerging picture for CC2D1 function suggests that it acts as a scaffold protein that touches and/or connects several distinct cellular functions. CC2D1A was initially reported to function as activator of nuclear factor κ B¹ and as transcriptional repressor of the serotonin-1A receptor gene;^{2,3} its deregulation was associated with major depressive disorder.⁴ Furthermore, a C-terminal deletion in the CC2D1A gene has been linked to nonsyndromic mental retardation.⁵

Besides transcriptional regulation, CC2D1A (TBK-1-associated protein in endolysosomes, Aki-1) has been implicated in different signaling pathways including the TBK-1, nuclear factor κ B and extracellular-signal-regulated kinase pathways that regulate immunity, inflammation and cell survival^{6,7} and the PDK1/Akt (phosphatidylinositol-2-OH/3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1-Akt) pathway in epidermal growth factor signaling⁸ associated with cell survival and cell cycle progression.

A direct role in cell division is suggested by the CC2D1A (Aki-1) association with centrosomes and regulation of centriole cohesion.⁹ Its function during mitosis is further controlled by phosphorylation.¹⁰ Consistent with a role in cell division, CC2D1A (Aki1) depletion caused the formation of multipolar spindles.^{9,11} Interestingly, a similar phenotype was observed upon depletion of some endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) components including ESCRT-III CHMP4B.¹²

ESCRT complexes 0, I, II and III and the VPS4 complex catalyze multivesicular body biogenesis, leading to plasma membrane receptor down-regulation,¹³⁻¹⁵ and some ESCRTs are recruited during cytokinesis and enveloped virus budding.¹⁶⁻¹⁸ The function of ESCRT-III and VPS4 is common to all three processes and required for membrane fission.^{14,15,19} A direct link between ESCRT function and CC2D1A was proposed by the yeast two-hybrid interaction of CC2D1A and CHMP4.²⁰ Further evidence of an ESCRT-CC2D1A, CC2D1B connection originates from studies with the *Drosophila* homologue Lethal giant discs (Lgd) of CC2D1A, which is implicated in Notch receptor signaling. In *lgd* mutant cells, Notch and other transmembrane proteins accumulate in enlarged endosomal compartments positive for Rab5, Rab 7 and the ESCRT-0 factor Hrs. This indicated that Lgd functions in endosomal trafficking downstream of Hrs.²¹⁻²³

In order to test the connection of CC2D1A and ESCRT-III, we set out to analyze the structural basis of the CC2D1A interaction with ESCRT-III CHMP4. We show that only one DM14 domain is required for the interaction with C-terminally truncated CHMP4B and identify the interaction surface by site-directed mutagenesis. CC2D1A co-purification with truncated forms of CHMP4B identified the requirement of the helical hairpin of CHMP4B for

interaction. Isothermal titration calorimetry (ITC) of CHMP4B deletion constructs and CC2D1A mapped the binding site to the N-terminal end of the CHMP4B hairpin, whose structure was determined to 1.8 Å resolution. Mutagenesis of the CHMP4B hairpin fragment confirmed this region as CC2D1A interaction site as tested by surface plasmon resonance (SPR) analyses. Furthermore, we provide evidence that the CC2D1A interaction surface is important for CHMP4B polymerization and required to exert a dominant negative effect on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) budding. Because the CC2D1A-CHMP4B interaction inhibited CHMP4 polymerization *in vitro*, our data suggest further that CC2D1A might thus act as a regulator of CHMP4 polymerization.

Results

CC2D1A recruits CHMP4B *in vitro*

A yeast two-hybrid screen identified CC2D1A and CC2D1B as potential binding partners of CHMP4A, CHMP4B and CHMP4C.²⁰ In order to confirm the yeast two-hybrid results, we set out to determine the direct interaction of CC2D1A or CC2D1B and CHMP4B. Although attempts to express full-length CC2D1A or CC2D1B in *Escherichia coli* failed, a C-terminal deletion of CC2D1B, which lacks the C2 domain, CC2D1B(1-601) (Fig. 1a and b) could be expressed and co-purified with maltose binding protein (MBP) fused to CHMP4B Δ C.²⁴ Both proteins eluted in the same peak from a size-exclusion chromatography (SEC) column (data not shown). However, removal of MBP from CHMP4B Δ C by tobacco etch virus (TEV) protease cleavage induced aggregation of the complex. The same construct corresponding to CC2D1A was poorly expressed and not soluble. For enhancement of the solubility of the complex, a smaller CHMP4B fragment containing residues 7-110 was identified by limited proteolysis with trypsin, and MBP-CHMP4B(7-110) was cloned and expressed. MBP-CHMP4B(7-110) formed a complex with CC2D1B(1-601), which stayed monodisperse after removal of MBP. SEC in combination with multi-angle laser light-scattering (MALLS) analysis indicated a 1:1 binding stoichiometry based on the ~80-kDa molecular mass of the complex (Fig. 1c), which is close to the calculated molecular mass of 76.4 kDa for a 1:1 complex [the calculated molecular mass of CC2D1B(1-601) is 64.6 kDa, and that of CHMP4B(7-110) is 12 kDa]. The 1:1 stoichiometry was further confirmed by ITC, which revealed a K_d of 382 nM for the CC2D1B(1-601)-MBP-CHMP4B(7-110) interaction (Fig. S1 and Table 1).

In order to further define the CHMP4B interaction site on CC2D1A, we designed several deletion

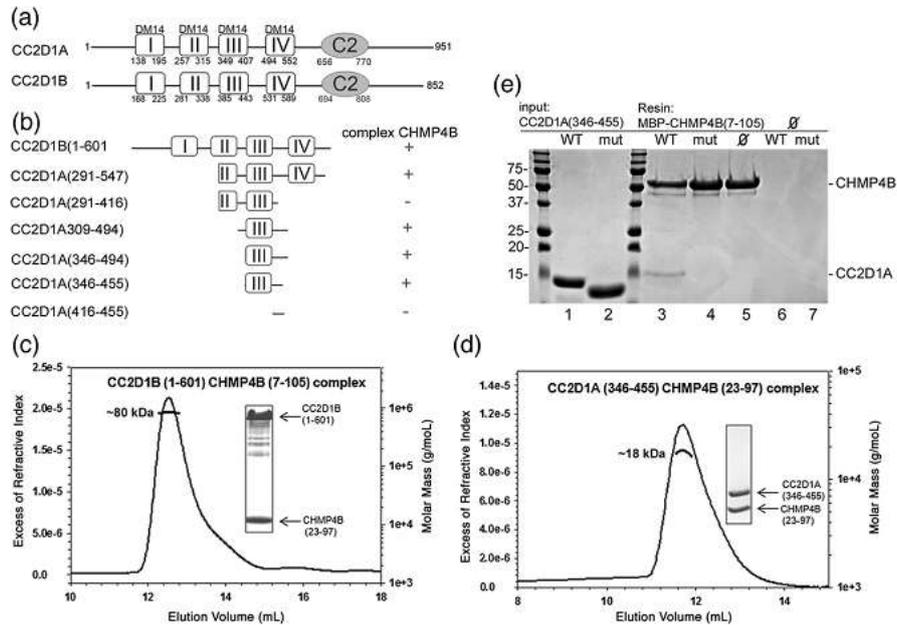


Fig. 1. CC2D1B interacts with CHMP4B *in vitro*. (a) Schematic drawing of the domain organization of CC2D1 isoforms. Both isoforms contain four DM14 domains followed by a C2 domain. (b) Schematic drawing of the CC2D1A and CC2D1B constructs tested for CHMP4B interaction by SEC and ITC. Complex formation is indicated with a +. (c) SEC (S-200 column) in combination with RI (refractive index) and MALLS analyses of CC2D1B(1-601) in complex with CHMP4B(7-105) reveals a 1:1 complex. The inset shows the complex eluted from the SEC column [upper band, CC2D1B(1-601); lower band, CHMP4B(7-105)]. (d) MALLS (S-75 column) analysis of the CC2D1A(346-455)-CHMP4B(23-97) complex shows a molecular mass of 18.2 kDa. The calculated molecular mass of the complex is 20.9 kDa. (e) Pull down of CC2D1A(346-455) wild type and mutant (mut; CC2D1A_{mut}) by MBP-CHMP4B(7-105) shows that the CC2D1A mutations abrogate CHMP4B binding. Lane 1 and 2 input of CC2D1A(346-455) wild type and mutant, respectively; lane 3 pull down of CC2D1A(346-455) wild type and lane 4 of the mutant, respectively; lanes 5-7 show the controls, MBP-CHMP4B(7-105) alone, CC2D1A(346-455) and mutant alone. Molecular mass markers are indicated.

constructs of CC2D1A (Fig. 1) and tested the interaction with CHMP4B(7-110) by SEC (data not shown), ITC or MALLS (Figs. S1 and S2). This demonstrated that the third DM14 domain and the region connecting to the fourth DM14 domain are required for interaction. ITC and MALLS confirmed the 1:1 stoichiometry for CHMP4B binding to the minimal binding construct CC2D1A(346-455) (Fig. 1d and Fig. S1). However, ITC also indicated small differences regarding the individual K_d values. CC2D1A(309-494) produced a K_d of 351 nM, which is comparable to CHMP4B(7-110) binding to CC2D1B(1-601) (K_d =382 nM). Shortening the N-terminus further as in CC2D1A(346-494) increased the K_d 2-fold to 719 nM. In contrast, the C-terminal truncation of CC2D1A(346-494) to CC2D1A(346-455) produced a similar K_d as observed for

CC2D1A(346-494) (Table 1). Further truncations such as CC2D1A(291-416), which is short of the region C-terminal of the third DM14 domain, and CC2D1A(416-455), which lacks the third DM14 domain, did not produce complexes as analyzed by SEC and ITC (data not shown). We conclude from these experiments that amino acids 346-455, which include the third DM14 domain, contain the main binding site for C-terminally truncated CHMP4B.

In order to map the CHMP4 binding site on CC2D1A, we compared sequences from different species of CC2D1A and CC2D1B comprising the minimal CHMP4 binding region (residues 346-455) as determined by SEC and ITC. Because both CC2D1A and CC2D1B bind to CHMP4B, we designed a mutant of CC2D1A(346-455) based on

Table 1. ITC of the CC2D1 interaction with CHMP4

Cell (μM)	Syringe (μM)	<i>N</i>	ΔH (kcal/mol)	K_d (nMol)
CC2D1B(1-81) 10	MBP-CHMP4B(7-110) 85	1.02 \pm 0.007	-13,710 \pm 123.3	382 \pm 24
MBP-CHMP4B(7-110) 10	CC2D1A(309-494) 253	0.84 \pm 0.006	-7381 \pm 67.58	351 \pm 22
MBP-CHMP4B(7-110) 9	CC2D1A(346-494) 145	1.03 \pm 0.009	-8164 \pm 91.52	719 \pm 41
MBP-CHMP4B(7-110) 9	CC2D1A(346-455) 117	0.90 \pm 0.007	-8193 \pm 84.49	680 \pm 34
MBP-CHMP4B(23-97) 14	CC2D1A(346-455) 200	0.90 \pm 0.019	-14,600 \pm 166.9	5495 \pm 118

The standard error associated with the values for *N*, ΔH and K_d is derived from the nonlinear least-squares fitting of the curves shown in Fig. S1.

sequence conservation. CC2D1A_mut has seven conserved residues changed to Ala (Fig. S3). The mutant protein was soluble, and the interaction was tested with MBP-CHMP4B(7-105). While wild-type CC2D1A(346-455) was able to pull down CHMP4B(7-105) as expected from the ITC measurements, CC2D1A_mut did not interact with CC2D1A in this assay (Fig. 2e). We conclude from these experiments that the linear sequence within CC2D1A residues 374-393 (Fig. S3) is important, implicating the third DM14 domain in CHMP4B binding.

We tested next whether truncations of both helices of the CHMP4B helical hairpin to residues 23-97 affect CC2D1A binding. CHMP4B(23-97) still interacted with CC2D1A(346-455) as determined by SEC (data not shown). However, ITC measurements indicated an \sim 10-fold higher K_d of 5.5 μM (Fig. S1 and Table 1). This suggests that the N- and C-terminal ends of the CHMP4B hairpin are important either for CC2D1A interaction or for the stability of the helical hairpin.

Crystal structure of CHMP4B(23-97)

We tested all complexes formed between CC2D1A or CC2D1B and CHMP4B in crystallization trials but failed to obtain crystals of the complex. However, in one of the crystallization trials performed with the complex of CC2D1A(346-455) and CHMP4B(23-97), CHMP4B(23-97) crystallized on its own. The structure was solved from a selenomethione-substituted crystal using the single-wavelength anomalous dispersion method and diffraction data to 1.8 \AA resolution (Table 2), which resulted in a readily interpretable electron density map (Fig. 2a). The asymmetric unit contained four molecules forming identical \sim 64- \AA -long helical hairpins composed of $\alpha 1$ residues 23-58 and $\alpha 2$ residues 61-97 (Fig. 2b). C $^{\alpha}$ superpositioning of the main-chain atoms of CHMP4B with the main chain of CHMP3 results in an r.m.s.d. of 2.68 \AA (Fig. 2c) and with the main chain of IST1, in an r.m.s.d. of 3.32 \AA (Fig. 3d). Likewise, part of α helix 1 from yeast Vps20 (CHMP6) fits $\alpha 1$ from CHMP4 with an r.m.s.d. of 0.68 \AA (Fig. 2d). This corroborates the structural similarity of CHMP

proteins despite their low sequence conservation (Fig. S4).

Mapping of the CC2D1A binding site on CHMP4B

We focused our mutational analyses to map the CC2D1A binding site to the N- and C-terminal ends of the helical hairpin for the following reasons. First, deletion of the N- and C-terminal ends of CHMP4B(7-110) that produced CHMP4B(23-97) induced a 10-fold reduction in affinity for CC2D1A. Second, all CHMP4B-CC2D1A complexes were disrupted by high-salt treatment, indicating a potential role for charged interactions. Third, charged residues for mutagenesis were further chosen based on sequence conservation, taking into account that only CHMP4 isoforms interact with CC2D1A or CC2D1B (Fig. S4). Fifth, mapping of the charged residues on the helical hairpin structure revealed one side of the molecule that contains a cluster of acidic and basic residues at the N- and C-terminal ends of the hairpin, while the opposite side is largely uncharged (Fig. 3a). Based on these observations, we designed three sets of mutants of CHMP4B(7-105): one containing amino acid changes within $\alpha 1$, CHMP4B_{mut1} (R28A, R30A, D31R, E33R); one with amino acid changes within $\alpha 2$, CHMP4B_{mut2} (E90R, E94R, E97R); and the double mutant CHMP4B_{mut1,2}. Co-purification of CC2D1A(346-455) and wild-type or mutant (mut1, mut2, mut1,2) MBP-CHMP4B(7-105) demonstrated that both wild-type and mutant MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1} pulled down CC2D1A(346-455). In contrast, MBP-CHMP4B(7-105)_{mut2} and MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1,2} no longer interacted with CC2D1A(346-455) (Fig. 3b). This interaction pattern was confirmed by SPR. Wild-type CHMP4B(7-105) produced a K_d of 320 nM (Table 3 and Fig. S5) similar to the affinity measured by ITC (Table 1). In contrast, CHMP4B(7-105)_{mut1} showed only an \sim 45-fold reduced K_d , while CHMP4B(7-105)_{mut2} and CHMP4B(7-105)_{mut1,2} no longer interacted with CC2D1A (Table 3 and Fig. S5). We conclude that a charged surface patch on α helix 2 (E90, E94 and E97) is important for binding and that neighboring charged residues within helix 1 (R28, R30, D31, E33) contribute to CC2D1A interaction.

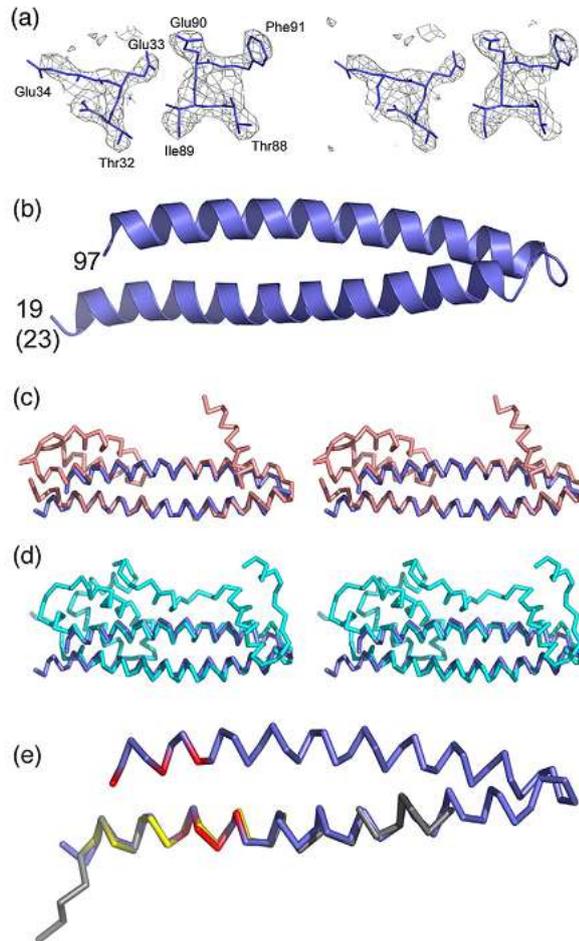


Fig. 2. Crystal structure of the helical hairpin of CHMP4B. (a) Stereo image of the electron density map calculated based on the single-wavelength anomalous diffraction phases without density modification. (b) Ribbon diagram of the CHMP4B helical hairpin containing residues 23–97. Note that the crystallized construct contained four extra residues at the N-terminus, which are in a helical conformation. (c) Stereo images of CHMP4B (blue) and CHMP3 (salmon) [Protein Data Bank (PDB) ID 3FRT] based on superpositioning of the C^α atoms. (d) Stereo images of CHMP4B (blue) and IST1 (cyan) (PDB ID 3FRR) based on superpositioning of the C^α atoms. (e) Superpositioning of the C^α atoms of CHMP4B (blue) and Vps20 (gray) (CHMP6) (PDB ID 3HTU); the CHMP4B residues affecting CC2D1A interaction are labeled in red, and the Vps20 residues involved in ESCRT-II Vps25 interaction are shown in yellow.

CC2D1A binding to CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*

We have previously shown that C-terminally truncated CHMP4B, MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX}, can form polymers *in vitro*.²⁴ For testing of whether CC2D1A interferes with CHMP4B polymerization, MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} alone and MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} in complex with CC2D1A(346–455) were cleaved with TEV protease and analyzed by sucrose gradient density centrifugation. This showed that CC2D1A alone is found in the upper fractions of the gradient (Fig. 4a), while MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} alone forms monomers and high-molecular-weight poly-

mers present in the lower fraction (Fig. 4b). When MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} is cleaved with TEV protease, the monomers shift into the polymer fraction (Fig. 4c). However, if MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} is incubated with CC2D1A(346–455) prior to TEV protease cleavage, approximately half of monomeric CHMP4B_{ΔC-ALIX} stays monomeric and floats together with CC2D1A(346–455) in the upper fraction of the gradient, while the other half of CHMP4B_{ΔC-ALIX} polymerizes and is found in the bottom of the gradient (Fig. 4d). When the same experiment is performed with CC2D1A_{mut} that no longer interacts with CHMP4B (Fig. 1e), monomeric CHMP4B_{ΔC-ALIX} is no longer rescued by CC2D1A,

Table 2. Data collection and refinement statistics

	CHMP4 (SeMet)
<i>Data collection</i>	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	37.59, 71.43, 123.68
Wavelength (Å)	0.9795
Resolution	41.23–1.80 / (1.90–1.80)
<i>R</i> _{merge}	0.074 (0.414)
<i>I</i> / <i>σI</i>	16.3 (4.4)
Completeness (%)	99.7 (100.0)
Multiplicity	7.0 (7.1)
Anomalous completeness	99.6 (100.0)
Anomalous multiplicity	3.6 (3.6)
Total observations	220,642 (32,311)
Unique reflections	31,659 (4520)
Wilson <i>B</i> -factor (Å ²)	23.3
<i>Refinement</i>	
Resolution (Å)	1.80
<i>R</i> _{work} (number of reflections)	0.227 (30,007)
<i>R</i> _{free} (number of reflections)	0.285 (1588)
Number of atoms	
Protein	2693
Water	137
<i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	16.78
Water	27.6
r.m.s.d.	
Bond lengths (Å)	0.018
Bond angles (°)	0.884

Values in parentheses are for highest-resolution shell.
SeMet, selenomethionine.

and all of cleaved CHMP4B_{ΔC-Alix} is found in the bottom fraction of the gradient (Fig. 4e). Because CC2D1A is never found in the bottom fraction together with CHMP4B_{ΔC-Alix} polymers, it indicates that CC2D1A does not interact with CHMP4B polymers. We confirmed this by incubating CC2D1A(309–494), which migrates in the upper fraction of a sucrose gradient (Fig. 4f), with CHMP4B_{ΔC-Alix} polymers. Again, CC2D1A is not found in the bottom fraction, indicating that it does not interact with CHMP4B polymers (Fig. 4g). These results indicate that the CC2D1A binding site is not accessible on CHMP4 filaments and that CC2D1A prevents CHMP4B polymerization *in vitro*.

The CHMP4B mutations affect HIV-1 budding

In order to test whether the mutation of the CC2D1A binding site on CHMP4B affects HIV-1 budding, we introduced the CHMP4B mutations (mut1, mut2, mut1.2) into CHMP4B(1–153)-flag, which was shown to exert a dominant negative effect on HIV-1 budding when expressed in HIV-1-producing 293T cells.²⁵ As expected, wild-type CHMP4B(1–153)-flag inhibited HIV-1 release efficiently in comparison to the vector control (Fig. 5a). Similarly, expression of CHMP4B_{mut1} (mut1; R28A, R30A, D31R, E33R) is still dominant negative, albeit slightly reduced (Fig. 5a), while CHMP4B_{mut2}

(mutation 2, E90R, E94R, E97R) has lost its dominant negative effect completely (Fig. 5a). As expected, the double mutant CHMP4B_{mut1.2} behaved like CHMP4B_{mut2} and is no longer dominant negative (Fig. 5a). Consistent with the release pattern, wild-type CHMP4B(1–153) and CHMP4B_{mut1} revealed the intracellular accumulation of the Gag cleavage intermediates CAp2 and p41 (Fig. 5b, left panel, lanes 1 and 2), which are characteristic for late assembly defects.^{26,27} These results indicate that the acidic Mut2 patch on helix 2 is required for the dominant negative effect of CHMP4, while the surface patch of Mut1 seems to be less important.

We next compared the cellular localization of CHMP4B(1–153)-flag and its mutated forms in order to test whether localization correlates with the propensity to block HIV-1 budding. Confocal microscopy imaging revealed that approximately 80% of CHMP4B(1–153)-flag, 64% of CHMP4B_{mut1} and 79% of CHMP4B_{mut2} localize along the plasma membrane (Fig. 6a–c and Fig. S7). In contrast, CHMP4B_{mut1.2} reveals dramatically reduced plasma

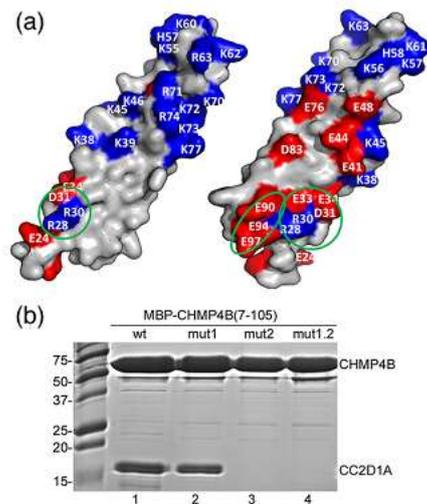


Fig. 3. CC2D1A binds to the N-terminal end of the CHMP4B helical hairpin. (a) The molecular surface of CHMP4B is shown in two orientations, and charged residues are indicated. The two patches affecting CC2D1A interaction are circled in green; CHMP4B_{mut1} carries the R28A, R30A, D31R and E33R mutations, and CHMP4B_{mut2} has E90R, E94R and E97R mutated. (b) Co-purification of CC2D1A(346–455) and wild-type or mutant MBP-CHMP4B(7–105); lane 1, wild-type MBP-CHMP4B(7–105); lane 2, MBP-CHMP4B(7–105)_{mut1}; lane 3, MBP-CHMP4B(7–105)_{mut2}; and lane 4, MBP-CHMP4B(7–105)_{mut1.2}.

Table 3. SPR analyses of the CHMP4B and CC2D1A interaction

Ligand	Analyte	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_d (nMol)	χ^2
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105)	25 ± 2	7.9 ± 0.28	320	0.244
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1}	1.2 ± 0.13	1.7 ± 0.12	1400	1.16
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut2}	—	—	—	—
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1.2}	—	—	—	—

The standard errors (SE) are derived from four measurements.

membrane (19%) versus 81% cytosolic localization (Fig. 6d and Fig. S6). This indicates that the mut2 mutation still allows plasma membrane localization, while the double mutant (mut1.2) surface has largely lost its ability to be targeted to the plasma membrane. Because mutants mut2 and mut1.2 act no longer dominant negative during HIV-1 budding (Fig. 5), we speculate that this might be due to a defect in polymerization rather than membrane association. To test the effect of the mut1.2 surface

patch on polymerization, we mutated the surface of MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$, which forms polymers *in vitro*.²⁴ Sucrose gradient analyses of wild-type MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ and the mutated form (mut1.2) demonstrate that the wild type forms monomers detected in the top fraction of the

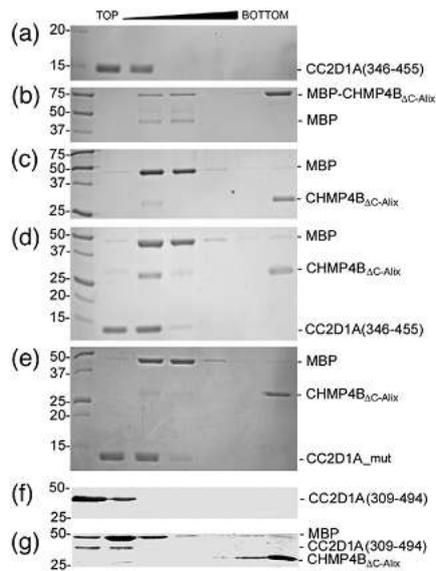


Fig. 4. CC2D1A prevents CHMP4B polymerization. Sucrose gradient analyses of MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$, CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ and CC2D1A. (a) CC2D1A(346-455); (b) MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$; (c) MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ after TEV protease cleavage; (d) MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ was incubated with CC2D1A(346-455) and then subjected to TEV protease cleavage; (e) MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ was incubated with CC2D1A_{mut} and then subjected to TEV protease cleavage. (f) CC2D1A(309-494) and (g) CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ polymers were incubated with CC2D1A(309-494).

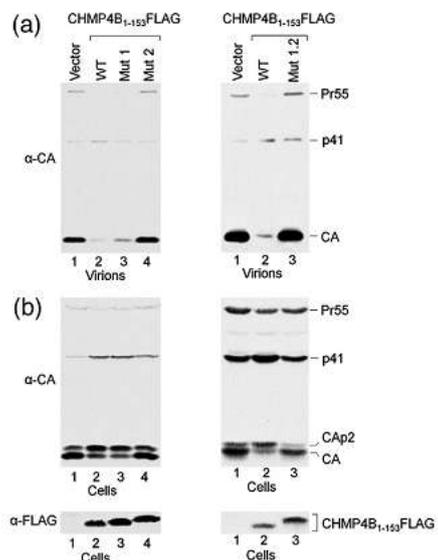


Fig. 5. Mutations in CHMP4B annul the dominant negative effect of C-terminally truncated CHMP4B. (a) (Left panel) Expression of wild-type CHMP4B1-153FLAG exerts a strong dominant negative effect on HIV-1 budding (lane 2) as compared to the vector control (lane 1). Expression of CHMP4B1-153_{mut1} shows that it is still dominant negative (lane 3), while CHMP4B1-153_{mut2} lost the dominant negative effect (lane 4). (Right panel) Lane 1 vector only control; lane 2, expression of wild-type CHMP4B1-153FLAG exerts a strong dominant negative effect; and lane 3, the double mutant CHMP4B1-153_{mut1.2} is no longer dominant negative. (b) Western blot revealing the intracellular Gag processing corresponding to the panels shown in (a). (Lower panel) Western blot showing the expression levels of the CHMP4B constructs.

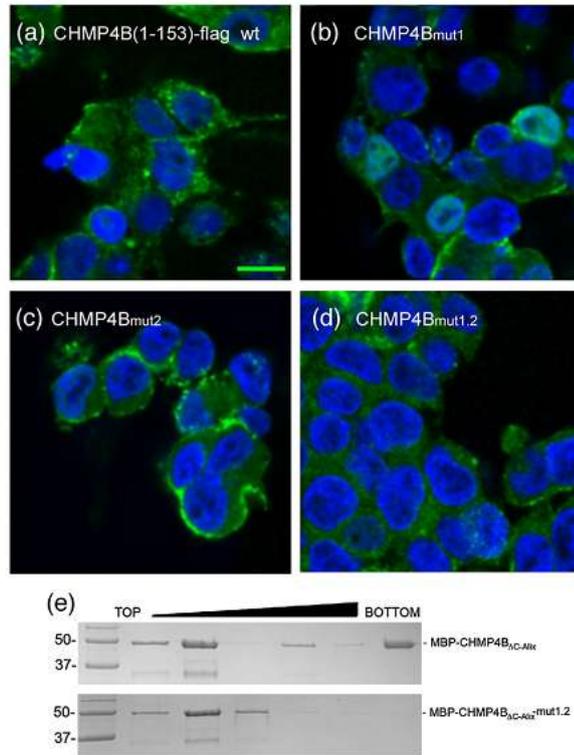


Fig. 6. The mut1.2 surface patch is important for plasma membrane localization and polymerization of CHMP4B *in vitro*. Confocal microscopy of CHMP4B(1-153)-flag localization in HEK293 cells. (a) CHMP4B(1-153)-flag wild type, (b) CHMP4B(1-153)-flag carrying the mut1, (c) the mut2 and (d) the mut1.2 surface patch mutations. Individual confocal Z-sections are shown. Nuclei have been stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. The scale bar represents 10 μ m. (e) Sucrose gradient analyses of recombinant wild-type MBP-CHMP4B Δ C-ALIX (top panel) and MBP-CHMP4B Δ C-ALIX carrying the mut1.2 surface patch mutations (bottom panel). Molecular mass markers are indicated.

gradient and polymers detected in the bottom fraction of the gradient as expected²⁴ (Fig. 6e). In contrast, the mutated form of MBP-CHMP4B Δ C-ALIX is monomeric and only found in the upper fraction of the gradient (Fig. 6e). We thus conclude from the immune localization data and the *in vitro* polymerization of CHMP4B that the surface patch of mut1.2 plays a role in CHMP4B polymerization.

Discussion

CC2D1A and CC2D1B have been linked to a wide variety of cellular processes including transcriptional control,^{2,3} signaling pathways^{1,6-8} centriole regulation,^{9,11} and endosomal sorting.²¹⁻²³ Here, we show that CC2D1A and CC2D1B serve as adaptor proteins for ESCRT-III CHMP4B as previously indicated by yeast two-hybrid analyses.²⁸ A direct interaction was confirmed *in vitro* employing recombinant CC2D1A and CC2D1B and CHMP4B. CHMP4B interaction requires the third DM14 repeat to form a 1:1 complex with

nanomolar affinity. Although CC2D1A has four DM14 repeats, only one interacts efficiently with C-terminally truncated CHMP4B *in vitro*. We identified residues within the third DM14 domain that are essential for interaction. Notably, sequence alignment of all four DM14 domains from human CC2D1A indicates that the seven residues mutated in the third DM14 domain are not strictly conserved. DM14-1 has five residues, DM14-2 has two residues and DM14-4 has four residues out of the seven mutated residues conserved (Fig. S7). This thus suggests that the other domains might provide adaptor function in different pathways.

Structural analysis of a CHMP4B fragment shows that the conformation of the helical hairpin of CHMP4B is very similar to the corresponding structural fragments of CHMP3 and IST1.²⁹⁻³¹ Structure-based mutagenesis analyses demonstrate further that the CC2D1A interaction site on CHMP4B is confined to a charged patch at one end of the helical hairpin formed mostly by α helix 2 and some contribution from helix 1. Thus, CC2D1A and CC2D1B are the first CHMP4B ligands that bind

to the conserved N-terminal core. Other CHMP4 ligands such as Alix and VPS4 bind to peptide motifs present at the extreme C-terminus.^{32,33} CHMP proteins exist in a cytosolic closed conformation, and membrane targeting is thought to activate them,^{25,34,35} leading to polymer formation *in vivo* and *in vitro*.^{24,30,36-40} Modeling CHMP4B onto IST1 shows that the CC2D1A interaction surface is accessible (Fig. 2d). Noteworthy, yeast ESCRT-III Vps20 (CHMP6) employs a neighboring surface to interact with ESCRT-II Vps25⁴¹ (Fig. 2e).

CHMP interaction with cellular ligands via their C-termini^{33,42-45} does not affect CHMP polymerization. On the other hand, CC2D1A interaction with the helical hairpin of CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*. Our results indicate further that the charged surface patch at the base of the hairpin is required for CHMP4B polymerization *in vitro* and *in vivo*. One simple explanation is that CC2D1A binding sterically hinders the formation of CHMP4B polymers *in vitro*. In the context of ESCRT-III assembly, CC2D1A (or CC2D1B) could then be considered as a negative regulator of CHMP4 function.

However, we cannot exclude that CC2D1A or CC2D1B associates with one end of CHMP4 polymers, mimicking the Vps25-Vps20 (CHMP6) interaction that leads to Snf7 (CHMP4) polymerization.⁴⁶⁻⁴⁸ In the context of ESCRT assembly, CC2D1A (or CC2D1B) could then be considered as a positive regulator of CHMP4 function. Although CC2D1A or CC2D1B has not yet been directly implicated in endosomal sorting, the *Drosophila* homologue Lgd was found at endosomes to regulate Notch receptor trafficking.²¹⁻²³ Interestingly, *lgd* mutants are involved in the ligand-independent activation of the receptor Notch, a process that is disturbed in ESCRT knockdowns.⁴⁹ One model was proposed where the persistence of internalized Notch at the membrane of the endosomes, prior to internalization into intraluminal vesicles, was responsible for an aberrant activation. Therefore, it is tempting to speculate that a lack of recruitment and/or activation of CHMP4 in the *lgd* mutant would impair proper internalization of Notch into intraluminal vesicles and thus be responsible for the observed *lgd* phenotype.

Among other processes, CHMP4 interaction might be required during CC2D1A's function at the centrosome and during cell division. Notably, depletion of CC2D1A or CC2D1B from cells leads to multipolar spindles,^{9,11} and the same phenotype is observed upon CHMP4B depletion.¹² However, the exact role of ESCRTs during cell division steps other than membrane abscission^{37,50-53} has yet to be defined.

As HIV-1 budding relies on ESCRTs,^{18,54-56} HIV-1 budding assays have been used to uncover new aspects of ESCRT function.^{16,18,54,55,57} Therefore, we used HIV-1 to test whether the CC2D1A binding site

was important for the CHMP4B function *in vivo*. CHMP4 and CHMP2 isoforms are the essential ESCRT-III players in HIV-1 release⁵⁸ and recruited late during assembly.⁵⁹ Thus, not surprisingly, dominant negative CHMP4B is a potent inhibitor of HIV-1 budding.⁶⁰⁻⁶² The helical hairpin of CHMP4B is required to exert a dominant negative effect,²⁵ and we show that the charged surface patch on helix 2 plays an essential role in this process. Notably, the helix 2 patch in CHMP4B (E90, E94, E97) is distinct from the recently reported patch EVLK₁₀₄₋₁₀₇,⁵⁸ which is involved in CHMP2A binding. Moreover, CHMP4A residue 1-116 overexpression leads to the formation of polymers in COS7 cells,³⁶ which implies that such a fragment represents a minimal region for polymerization. Because there is no evidence that CC2D1A or CC2D1B is recruited during HIV-1 budding, we speculate that the helix 2 mutation that abrogates the dominant negative effect as well as CC2D1A binding affects mainly CHMP4B polymerization during HIV-1 budding rather than plasma membrane localization. It thus remains to be determined how CC2D1A or CC2D1B influences or controls CHMP4B polymerization during other ESCRT-catalyzed cellular processes. In summary, we characterized CC2D1A *in vitro* as a novel adaptor molecule for ESCRT-III CHMP4, which will help to elucidate the function of the complex during diverse cellular processes *in vivo*.

Materials and Methods

Expression constructs

cDNAs encoding CHMP4B(7-105), CHMP4B(7-110) and CHMP4B(23-97) were cloned into expression vector pBADM41, and CHMP4B mutants 1 and 2 (mut1, R28A, R30A and D31R; mut2, E90R, E94R and E97R) were cloned into PETM41. CC2D1B_1-601 was cloned into expression vector pProEx-Htb (Invitrogen), and all other truncated CC2D1A constructs were cloned into the expression vector PET28-his₆-TEV (kindly provided from N. Tarbouriech). The CC2D1A(346-455) mutant (K374A, R376A, R380A, K383A, D387A, R390A, K393A) was cloned in pProEx-Htb (Invitrogen), and cDNAs carrying the CC2D1A mutations were synthesized by Genscript Inc.

Protein purification

MBP-CHMP4B_{ΔC-Alix} was produced as described previously.²⁴ The monomeric protein was separated from polymeric CHMP4B by gel filtration on a Superdex 200 column (GE Healthcare) in a buffer containing 20 mM Tris, pH 7.4, and 100 mM NaCl.

MBP-CHMP4B(7-105) constructs (mutant and wild type) were transformed into BL21 cells and grown at 37 °C to an OD of 0.6, and protein expression was induced with 1 mM IPTG. Cultures were grown for 1 h and

centrifuged, and the pellet was resuspended in lysis buffer A [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free protease inhibitors] before sonication. After a second step of centrifugation, the supernatant was filtered and loaded onto an amylose column. The resin was washed with lysis buffer containing 1 M NaCl and 1 M KCl and eluted in 50 mM Tris (pH 7.4), 350 mM NaCl and 10 mM maltose. Further purification was achieved on a Superdex 200 column (GE Healthcare) in buffer B, 25 mM Tris, pH 7.4, and 100 mM NaCl.

CC2D1A constructs were expressed in BL21, induced with 1 mM IPTG and grown for 3 h at 37 °C. The pellet was resuspended in buffer A and sonicated, and the supernatant was filtered and loaded onto a Ni-NTA (Qiagen) resin. The column was washed with buffer A supplemented with 1 M NaCl and subsequently with buffer C, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 50 mM imidazole. The protein was eluted in 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 250 mM imidazole. The 6 \times -histidine tag was removed with TEV protease at a ratio of 2 μ g for 1 mg of protein overnight at 4 °C. The processed protein was dialyzed against 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 20 mM imidazole and loaded on a Ni-NTA resin, and the flow-through was collected. CC2D1A was further purified on a Superdex 75 column (GE Healthcare) in buffer B.

Complex formation of CC2D1A/B with CHMP4B

CHMP4B(7-105), CHMP4B(23-97) or CHMP4B(7-110) was transformed into BL21 cells and grown from 1-l flasks at 37 °C until an OD of 0.6 was reached and induced with 0.2% (w/v) arabinose. Cultures were grown for 1 h and centrifuged, and the pellet was resuspended in lysis buffer D [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM β -mercaptoethanol (β -ME) and EDTA-free protease inhibitors] before sonication. After centrifugation, the supernatant was filtered and loaded on a Ni-NTA resin and washed with buffer E (buffer D supplemented with 1 M NaCl- and 1 M KCl) and buffer D plus 50 mM imidazole. The purified CC2D1A or CC2D1B proteins were loaded onto the Ni-resin containing MBP-CHMP4B. Unbound CC2D1A/B protein was washed off from the column in buffer D, and the complex was eluted with buffer D plus 250 mM imidazole. MBP was removed from CHMP4B by TEV protease cleavage at a ratio of 2 μ g for 1 mg of protein overnight at 4 °C. The complex was dialyzed against 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 3 mM β -ME and loaded on a Ni-NTA resin connected to an amylose column. The CC2D1A/B-CHMP4B complex was in the flow-through and purified on a Superdex 75 (GE Healthcare) column in buffer C. Further purification of the CC2D1A/B and CHMP4B complexes on an S Sepharose column in buffer E (25 mM NaCitrate, pH 5.5, and 50 mM NaCl) and elution in buffer E supplemented with 1 M NaCl dissociated the complex, and both CC2D1A/B and CHMP4B proteins eluted in separate peaks.

Co-purification experiments

Constructs corresponding to wild-type and mutant (mut1, mut2, mut1.2) MBP-CHMP4B(7-105) were transformed into BL21 cells and grown from 1-l flasks at 37 °C until an OD of 0.6 was reached and induced with 0.2% (w/v)

arabinose (for the wild-type construct) or 1 mM IPTG for the mutants. Cultures were grown for 2 h and centrifuged, and the pellet was resuspended in lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl and 1 mM PMSF] before sonication. After centrifugation, the supernatant was filtered and loaded on an amylose column. The resin was washed with 5 column volumes of washing buffer (20 mM Tris, pH 7.4, and 1 M NaCl) and then equilibrated with the running buffer (20 mM Tris, pH 7.4, and 100 mM NaCl). CC2D1A(346-455) was purified separately on a Ni-NTA column as described above. His-tagged CC2D1A(346-455) (3 mg) was incubated with wild-type and mutant MBP-CHMP4B(7-105) bound to the amylose resin for 30 min and washed with 5 column volumes of running buffer. MBP-CHMP4B(7-105) wild type and mutants were eluted with a buffer containing 20 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl and 20 mM maltose, and the presence of CC2D1A(346-455) was confirmed by SDS-PAGE.

MBP pull-down experiments

Amylose resin (30 μ l; New England Biolabs) was incubated with an excess of monomeric MBP-CHMP4B(7-105) for 30 min at room temperature, except for controls. Unbound MBP-CHMP4B was removed with three washing steps with buffer (25 mM Tris, pH 7.4, and 100 mM NaCl). The matrices were incubated with similar amounts of CC2D1A(346-455) wild type and mutant, in 5-fold molar excess for 1 h at room temperature. Unbound CC2D1A was removed by five washing steps in buffer. Bound proteins on matrix were resuspended in SDS-loading buffer; a third of each sample was analyzed by SDS-PAGE, and bands were detected by Coomassie Blue staining.

Sedimentation experiments

Monomeric MBP-CHMP4B _{Δ CAHX} (1.5 μ M) was concentrated to a final concentration of 15 μ M in the presence of a 5-molar excess of CC2D1A wild type or mutant; subsequently, MBP was removed by TEV protease cleavage overnight at 4 °C at a ratio of 1:10 (w/w) to induce polymerization. The protein(s) was then separated on sucrose gradients in HBS buffer (0.01 M Hepes, pH 7.4, and 0.15 M NaCl), by overlaying sucrose solutions of 60% (65 μ l), 40%, 30%, 20% and 5% (85 μ l each). Centrifugation was performed in a Beckman SW55 rotor at 40,000 rpm for 6 h at 4 °C. Fractions from the gradients were analyzed on a 15% SDS-PAGE, and bands were detected with Coomassie Blue staining.

Isothermal titration calorimetry

Calorimetric measurements were carried out at 25 °C using a VP-ITC instrument with a cell volume of 1.4569 ml (MicroCal, LLC). CC2D1B(1-601), CC2D1A- constructs and CHMP4B(7-107) or CHMP4B(23-97) were exchanged in the same batch of buffer [50 mM citrate (pH 6), 100 mM NaCl and 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine] by extensive dialysis. The same batch of buffer was used for further dilutions of the proteins. The protein concentrations used

in the cell or in the syringe are indicated in Table 2. The solution in the cell was stirred at 286 rpm to ensure rapid mixing. The interaction isotherms were analyzed using Origin software package supplied by MicroCal. An interaction model assuming n independent and equivalent binding sites was applied, and the stoichiometry n , change in enthalpy ΔH and binding constant K_d were iteratively fitted.

SEC-MALLS

SEC combined with detection by MALLS and refractometry: SEC was performed with a Superdex S75 or S200 column as indicated (GE Healthcare) equilibrated in a buffer containing 25 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl and 3 mM β -ME. Separations were performed at 20 °C with a flow rate of 0.5 ml/min. The complexes (50 μ l) as indicated were injected at a concentration of 4 mg/ml. MALLS detection and data analysis were performed as described previously.⁶³

Surface plasmon resonance

BIAcore measurements were performed with the Biacore X instrument (Biacore, Inc.) at 25 °C in running buffer [10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA and 0.005% surfactant P20]. A CM5 chip was coated with CC2D1A(346–455) to a target of ~100 response units. The analytes MBP-CHMP4B(7–105) wild type and mutants (in running buffer) were passed over the chip surface at concentrations ranging, respectively, from 0.47 μ M to 0.062 μ M and 1.4 μ M to 0.525 μ M for 5 min at a flow rate of 10 μ l/min, and dissociation was recorded for 10 min. The chip was regenerated with 10 μ l of 1 M NaCl at 50 μ l/min. Binding kinetics were evaluated using the BiaEvaluation software package (Biacore, Inc.) using a Langmuir model 1:1 with no mass transfer but corrected for a drifting baseline when necessary.

Crystallization and structure solution of CHMP4(23–97)

CHMP4B(23–97) crystals were obtained by the vapor diffusion method in hanging drops mixing equal volumes of complex and reservoir solution [0.1 M 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (pH 5.5), 0.2 M KCl and 19% polyethylene glycol 3350 (w/v)]. The crystal was cryo-cooled at 100 K in reservoir buffer containing 25% (v/v) glycerol. The selenomethionine-substituted CHMP4B(23–97) was crystallized under the same conditions. A complete data set was collected at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) beam line ID14-4. Data were processed and scaled with MOSFLM⁶⁴ and SCALA.^{65,66} The crystals belong to space group $P2_12_12_1$ with unit cell dimensions of $a=37.59$ Å, $b=71.44$ Å, $c=123.64$ Å and contain four molecules per asymmetric unit. The structure was solved by the single anomalous dispersion method employing the data set collected at the peak wavelength and using the SAS protocol of Auto-Rickshaw.⁶⁷ R values were calculated using the program SHELXC.⁶⁸ All four heavy-atom positions were localized using the program

SHELXD,⁶⁹ and the correct hand for the substructure was determined using the programs ABS⁷⁰ and SHELXE.⁷¹ Initial phases were calculated after density modification using the program SHELXE.⁷¹ The initial phases were improved using density modification and phase extension to 1.80 Å resolution using the program RESOLVE.⁷² An initial model was built with ARP/WARP⁷³ and completed by several cycles of manual model building with Coot⁷⁴ and refinement with REFMAC⁷⁵ using data to 1.8 Å resolution to an R -factor of 0.22 and R_{free} of 0.28 (Table 1). The final model contains chain A residues 19–97, chain B residues 19–97, chain C residues 19–96 and chain D residues 21–97 (residues 19, 20, 21 and 22 derive from the expression vector). Of the residues, 99.6% are within the most favored and allowed regions of a Ramachandran plot.⁶⁶ Molecular graphic figures were generated with PyMOL (W. Delano[‡]), and sequence alignments, with ESPript.⁷⁶ Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession ID 4abm.

Mammalian expression and immunolocalization

CHMP4B(1–153)-flag and mutated forms carrying the mut1, mut2 and mut1.2 surface patch mutations were expressed in HEK293 cells. Fifteen hours after transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with a polyclonal anti-flag AB (Sigma) followed by an anti-rabbit Alexa-594-labeled (Invitrogen) antibody. After antibody incubation, slides were washed with phosphate-buffered saline, mounted in Mowiol and analyzed by confocal microscopy. Microscopy was performed using the TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Germany), with HCX Plan-Apochromat 63 \times 1.4 oil immersion objective; excitation and emission were set at 405 and 420–470 nm for 4',6-diamidino-2-phenylindole staining and at 488 and 500–550 nm for Alexa 488 antibody staining. Signals in different color channels were acquired sequentially. Brightness and contrast of raw images were optimized for presentation purpose.

HIV budding

293T cells (1.2×10^6) were seeded into T25 flasks and transfected 24 h later using a calcium phosphate precipitation technique. The cultures were transfected with 1 μ g HXBH10, which encodes wild type HIV-1, together with CHMP4B1–153FLAG wild type or mutants CHMP4B_{mut1}, CHMP4B_{mut2} and CHMP4B_{mut1.2} (100 ng each). The total amount of transfected DNA was brought to 8 μ g with carrier DNA (pTZ18U). Twenty-four hours post-transfection, the cells were lysed in RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.05% SDS), and the culture supernatants were clarified by low-speed centrifugation and passed through 0.45- μ m filters. Virions released into the medium were pelleted through 20% sucrose cushions and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with

[‡] <http://www.pymol.org>

anti-HIV CA antibody 183-H12-5C.⁷⁷ Proteins in the cell lysates were detected by Western blotting with anti-HIV CA or anti-FLAG antibody M2 (Sigma).

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-01) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (SPP1175) (W.W.), the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (R37AI029873 to H.G.), a postdoctoral fellowship from the European Molecular Biology Organization (B.H.) and a PhD fellowship from the Région Rhône-Alpes (Cluster 10 infectiologie) (N.M.). We thank Dr. T. Klein (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) for the lgd cDNA clone. We acknowledge the Partnership for Structural Biology (<http://www.psb-grenoble.eu>) for access to the common platforms including the crystallization facility (J. Marquez), the biophysical platform (M. Jamin) and the European Synchrotron Radiation Facility for beam time and assistance during data collection. The HIV-1 p24 monoclonal antibody (183-H12-5C) (provided by Drs. Bruce Chesebro and Kathy Wehrly) was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health.

Supplementary Data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmb.2012.02.044

References

- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y. *et al.* (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, **22**, 3307–3318.
- Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., Rogaeva, A. & Albert, P. R. (2003). Freud-1: a neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. *J. Neurosci.* **23**, 7415–7425.
- Rogaeva, A. & Albert, P. R. (2007). The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 965–974.
- Szewczyk, B., Albert, P. R., Rogaeva, A., Fitzgibbon, H., May, W. L., Rajkowska, G. *et al.* (2011). Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT(1A) receptor, in the prefrontal cortex of subjects with major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **13**, 1089–1101.
- Rogaeva, A., Galaraga, K. & Albert, P. R. (2007). The Freud-1/CC2D1A family: transcriptional regulators implicated in mental retardation. *J. Neurosci. Res.* **85**, 2833–2838.
- Chang, C. H., Lai, L. C., Cheng, H. C., Chen, K. R., Syue, Y. Z., Lu, H. C. *et al.* (2011). TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **286**, 7043–7051.
- Zhao, M., Li, X. D. & Chen, Z. (2010). CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 24372–24380.
- Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T. & Fujita, N. (2008). Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5996–6009.
- Nakamura, A., Arai, H. & Fujita, N. (2009). Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *J. Cell Biol.* **187**, 607–614.
- Nakamura, A., Naito, M., Arai, H. & Fujita, N. (2010). Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 872–876.
- Neumann, B., Walter, T., Heriche, J. K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C. *et al.* (2010). Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, **464**, 721–727.
- Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K. & Sundquist, W. I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 12889–12894.
- Hurley, J. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 4–11.
- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N. & Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 199–210.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell*, **21**, 77–91.
- Morita, E. & Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 395–425.
- McDonald, B. & Martin-Serrano, J. (2009). No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J. Cell Sci.* **122**, 2167–2177.
- Martin-Serrano, J. & Neil, S. J. (2011). Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 519–531.
- Hurley, J. H. & Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556.
- Tsang, H. T., Connell, J. W., Brown, S. E., Thompson, A., Reid, E. & Sanderson, C. M. (2006). A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*, **88**, 333–346.
- Jaekel, R. & Klein, T. (2006). The *Drosophila* notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking. *Dev. Cell*, **11**, 655–669.

22. Gallagher, C. M. & Knoblich, J. A. (2006). The conserved C2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **11**, 641–653.
23. Childress, J. L., Acar, M., Tao, C. & Halder, G. (2006). Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis. *Curr. Biol.* **16**, 2228–2233.
24. Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M. *et al.* (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*, **17**, 843–856.
25. Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G. & Gottlinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 19140–19145.
26. Gottlinger, H., Dorfman, T., Sodroski, J. & Haseltine, W. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 3195–3199.
27. Garrus, J., von Schwedler, U., Pornillos, O., Morham, S., Zavitz, K., Wang, H. *et al.* (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55–65.
28. Tsang, H. T., Edwards, T. L., Wang, X., Connell, J. W., Davies, R. J., Durrington, H. J. *et al.* (2009). The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3805–3821.
29. Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H. & Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell*, **10**, 821–830.
30. Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Lange-lier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M. *et al.* (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 754–762.
31. Xiao, J., Chen, X. W., Davies, B. A., Saltiel, A. R., Katzmann, D. J. & Xu, Z. (2009). Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3514–3524.
32. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 7687–7691.
33. Kieffer, C., Skalicky, J. J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D. M., Kaplan, J. & Sundquist, W. I. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell*, **15**, 62–73.
34. Shim, S., Kimpler, L. A. & Hanson, P. I. (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic*, **8**, 1068–1079.
35. Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H. G., Svergun, D. I. & Weissenhorn, W. (2008). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* **378**, 818–827.
36. Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y. & Heuser, J. E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* **180**, 389–402.
37. Guizzetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H. *et al.* (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*, **331**, 1616–1620.
38. Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J. M., Pobbati, A. V., Veprintsev, D. B., Crowther, R. A. *et al.* (2008). Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure*, **16**, 1345–1356.
39. Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G. & Weissenhorn, W. (2008). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science*, **321**, 1354–1357.
40. Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Lutje Hulsik, D. *et al.* (2011). Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **286**, 40276–40286.
41. Im, Y. J., Wollert, T., Boura, E. & Hurley, J. H. (2009). Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev. Cell*, **17**, 234–243.
42. Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D. & Williams, R. L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, **449**, 735–739.
43. Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L. & Bell, S. D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, **322**, 1710–1713.
44. Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S. & Sundquist, W. I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, **449**, 740–744.
45. Solomons, J., Sabin, C., Poudevigne, E., Usami, Y., Lutje Hulsik, D., Macheboeuf, P. *et al.* (2011). Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSH. *Structure*, **19**, 1149–1159.
46. Teis, D., Saksena, S. & Emr, S. D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell*, **15**, 578–589.
47. Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E. & Emr, S. D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, **136**, 97–109.
48. Fyfe, I., Schuh, A. L., Edwardson, J. M. & Audhya, A. (2011). Association of ESCRT-II with VPS20 generates a curvature sensitive protein complex capable of nucleating filaments of ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* **286**, 34262–34270.
49. Vaccari, T., Rusten, T. E., Menut, L., Nezis, I. P., Brech, A., Stenmark, H. & Bilder, D. (2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J. Cell Sci.* **122**, 2413–2423.
50. Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, **316**, 1908–1912.
51. Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K. & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* **26**, 4215–4227.
52. Lee, H. H., Elia, N., Ghirlando, R., Lippincott-Schwartz, J. & Hurley, J. H. (2008). Midbody targeting

- of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science*, **322**, 576–580.
53. Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H. & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 4846–4851.
 54. Bieniasz, P. D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, **5**, 550–558.
 55. Weiss, E. R. & Göttlinger, H. (2011). The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J. Mol. Biol.* **410**, 525–533.
 56. Dordor, A., Poudevigne, E., Göttlinger, H. & Weissenhorn, W. (2011). Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding. *Future Microbiol.* **6**, 1159–1170.
 57. Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W. & Göttlinger, H. G. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 181–184.
 58. Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Bacì Hamilton, I. & Sundquist, W. I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*, **9**, 235–242.
 59. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D. & Simon, S. M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell. Biol.* **13**, 394–401.
 60. Strack, B., Calistri, A., Popova, E. & Göttlinger, H. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689–699.
 61. von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E. *et al.* (2003). The protein network of HIV budding. *Cell*, **114**, 701–713.
 62. Carlton, J. G., Agromayor, M. & Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 10541–10546.
 63. Gerard, F. C. A., Ribeiro, E. d. A., Albertini, A. I. A. V., Gutsche, I., Zaccari, G., Ruijgrok, R. W. H. & Jamin, M. (2007). Unphosphorylated rhabdoviridae phosphoproteins form elongated dimers in solution. *Biochemistry*, **46**, 10328–10338.
 64. Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Int. CCP4/ESF-EACMB. Newslett. Protein Crystallogr.* **26**.
 65. Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82.
 66. CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**, 157–163.
 67. Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. (2005). Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **61**, 449–457.
 68. Sheldrick, G. M., Hauptman, H. A., Weeks, C. M., Miller, R. & Uson, I. (2001). *International Tables for Crystallography, Volume F: Crystallography of biological macromolecules*, chapter 16.1: *Ab initio* phasing, pp. 247–255. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
 69. Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **58**, 1772–1779.
 70. Hao, Q. (2004). ABS: a program to determine absolute configuration and evaluate anomalous scatterer substructure. *J. Appl. Crystallogr.* **37**, 498–499.
 71. Sheldrick, G. M. (2002). Macromolecular phasing with SHELXE. *Zeitschrift für Kristallographie*, **217**, 644–650.
 72. Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **56**, 965–972.
 73. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463.
 74. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
 75. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
 76. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metz, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305–308.
 77. Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J. & S., P. (1992). Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* **66**, 6547–6554.

Supplemental Figures

CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B

Nicolas Martinelli^{1,4}, Bettina Hartlieb^{1,4}, Yoshiko Usami², Charles Sabin¹, Aurelien Dordor¹, Nolwenn Miguet¹, Sergiy V. Avilov^{1,3}, Euripedes A. Ribeiro Jr¹, Heinrich Göttlinger² and Winfried Weissenhorn^{1,5}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

³European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France

⁴These authors contributed equally

⁵Corresponding author: Winfried Weissenhorn, e-mail: weissenhorn@embl.fr

Tel: 33-476-207281 Fax: 33-476-209400

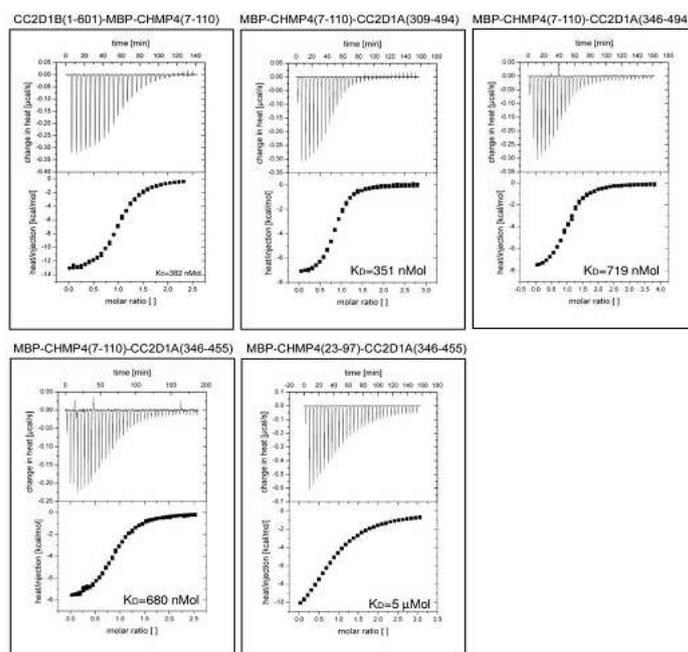


Figure S1. Isothermal titration calorimetry of MBP-CHMP4B(7-110) and MBP-CHMP4B(23-97) and CC2D1B and CC2D1A constructs as indicated. Details of the measurement are listed in table 1.

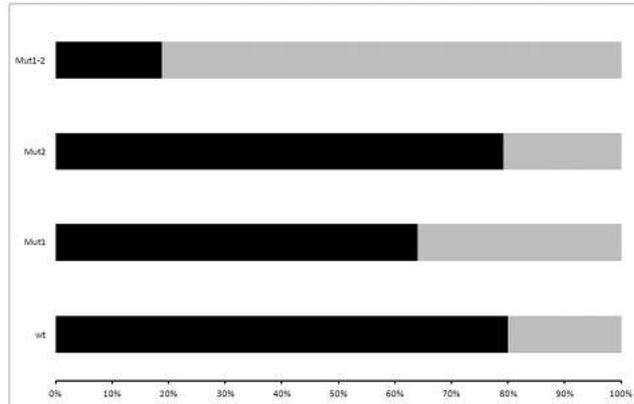


Figure S6. Quantification of the IF images representing cells expressing CHMP4B(1-153)-flag and the mutants mut1, mut2 and mut1.2 as shown in figures 6a-d. Cells were classified based on CHMP4B distribution in the cytoplasm; 24 to 50 cells/condition were examined. Black bars, percentage of cells with CHMP4B plasma membrane association; gray bars, percentage of cells with CHMP4B uniformly distributed in the cytoplasm.

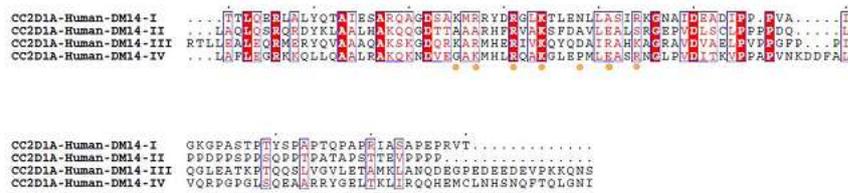


Figure S7. Sequence alignment of all four human CC2D1A DM14 domains. The amino acids changed within the third DM14 domain that affect CHMP4B binding are labeled by orange dots.

6. Bibliographie

1. Lois M. Banta, Jane S. Robinson, Daniel J. Klionsky, and Scott D. Emr: Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *The Journal of Cell Biology* 107(4), 1369 (1988).
2. Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH: Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants.. *Molecular Biology of the Cell* 3(12), 1389 (1992).
3. Odorizzi G, Babst M, Emr SD: Fab1p PtdIns(3)P 5-Kinase Function Essential for Protein Sorting in the Multivesicular Body. *Cell* 95(6), 847-858 (1998).
4. Rieder SE, Banta LM, Köhrer K, McCaffery JM, Emr SD: Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant.. *Molecular Biology of the Cell* 7(6), 985 (1996).
5. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H: STAM and Hrs Are Subunits of a Multivalent Ubiquitin-Binding Complex on Early Endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 278(14), 12513-12521 (2003).
6. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD: Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* 106(2), 145-155 (2001).
7. Babst et al.: Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body. ,
8. Babst et al.: Escrt-III: : An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. ,
9. Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD: The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO Journal* 17(11), 2982-2993 (1998).
10. Hobel CFV, Albers SV, Driessen AJM, Lupas AN: The *Sulfolobus solfataricus* AAA protein Sso0909, a homologue of the eukaryotic ESCRT Vps4 ATPase. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 1), 94-98 (2008).
11. Ellen AF, Albers S-V, Huibers W, et al.: Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles* 13(1), 67-79 (2008).
12. Lindås A-C, Karlsson EA, Lindgren MT, Ettema TJG, Bernander R: A unique cell division machinery in the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(48), 18942-18946 (2008).
13. Samson RY, Obita T, Freund SM, Williams RL, Bell SD: A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea. *Science* 322(5908), 1710-1713 (2008).

14. Ghazi-Tabatabai S, Obita T, Pobbati AV, et al.: Evolution and assembly of ESCRTs. *Biochemical Society Transactions* 37(1), 151 (2009).
15. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, et al.: The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(5), 399–451 (2005).
16. Herman EK, Walker G, Van Der Giezen M, Dacks JB: Multivesicular Bodies in the Enigmatic Amoeboflagellate *Breviata Anathema* and the Evolution of ESCRT 0. *Journal of Cell Science* 124(4), 613-621 (2011).
17. Moriscot C, Gribaldo S, Jault J-M, et al.: Crenarchaeal CdvA Forms Double-Helical Filaments Containing DNA and Interacts with ESCRT-III-Like CdvB. *PLoS ONE* 6(7), e21921 (2011).
18. Deatherage BL, Cookson BT: Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infection and Immunity* 80(6), 1948-1957 (2012).
19. Ren X, Kloer DP, Kim YC, et al.: Hybrid Structural Model of the Complete Human ESCRT-0 Complex. *Structure* 17(3), 406-416 (2009).
20. Mayers JR, Fyfe I, Schuh AL, Chapman ER, Edwardson JM, Audhya A: ESCRT-0 Assembles as a Heterotetrameric Complex on Membranes and Binds Multiple Ubiquitylated Cargoes Simultaneously. *Journal of Biological Chemistry* 286(11), 9636-9645 (2011).
21. Pullan L, Mullapudi S, Huang Z, et al.: The Endosome-Associated Protein Hrs Is Hexameric and Controls Cargo Sorting as a « Master Molecule ». *Structure* 14(4), 661-671 (2006).
22. Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, Weissenhorn W: Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends in Biochemical Sciences* In Press, Corrected Proof,
23. Wollert T, Hurley JH: Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464(7290), 864-869 (2010).
24. Ren X, Hurley JH: VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *The EMBO Journal* 29(6), 1045-1054 (2010).
25. Stringer DK, Piper RC: A Single Ubiquitin Is Sufficient for Cargo Protein Entry into MVBs in the Absence of ESCRT Ubiquitination. *The Journal of Cell Biology* 192(2), 229-242 (2011).
26. Lange A, Castañeda C, Hoeller D, Lancelin J-M, Fushman D, Walker O: Evidence for Cooperative and Domain-Specific Binding of the Signal Transducing Adaptor Molecule 2 (STAM2) to Lys63-Linked Diubiquitin. *Journal of Biological Chemistry* 287(22), 18687-18699 (2012).
27. Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J: Bilayered Clathrin Coats on Endosomal Vacuoles Are Involved in Protein Sorting toward Lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 13(4), 1313-1328 (2002).
28. Raiborg C, Wesche J, Malerød L, Stenmark H: Flat Clathrin Coats on Endosomes Mediate Degradative Protein Sorting by Scaffolding Hrs in Dynamic Microdomains. *Journal of Cell Science* 119(12), 2414-2424 (2006).

29. Puertollano R, Randazzo PA, Presley JF, Hartnell LM, Bonifacino JS: The GGAs Promote ARF-Dependent Recruitment of Clathrin to the TGN. *Cell* 105(1), 93-102 (2001).
30. Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H: Tom1, a VHS Domain-Containing Protein, Interacts with Tollip, Ubiquitin, and Clathrin. *Journal of Biological Chemistry* 278(52), 52865-52872 (2003).
31. Yamashita Y, Kojima K, Tsukahara T, et al.: Ubiquitin-Independent Binding of Hrs Mediates Endosomal Sorting of the Interleukin-2 Receptor B-Chain. *Journal of Cell Science* 121(10), 1727-1738 (2008).
32. Amano Y, Yamashita Y, Kojima K, et al.: Hrs Recognizes a Hydrophobic Amino Acid Cluster in Cytokine Receptors During Ubiquitin-Independent Endosomal Sorting. *Journal of Biological Chemistry* 286(17), 15458-15472 (2011).
33. He J, Vora M, Haney RM, et al.: Membrane insertion of the FYVE domain is modulated by pH. *Proteins* 76(4), 852-860 (2009).
34. Berlin I, Schwartz H, Nash PD: Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Ubiquitination and Trafficking by the USP8-STAM Complex. *Journal of Biological Chemistry* 285(45), 34909-34921 (2010).
35. Tanaka N, Kaneko K, Asao H, et al.: Possible Involvement of a Novel STAM-Associated Molecule « AMSH » in Intracellular Signal Transduction Mediated by Cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 274(27), 19129-19135 (1999).
36. Hurley JH, Stenmark H: Molecular Mechanisms of Ubiquitin-Dependent Membrane Traffic. *Annual Review of Biophysics* 40(1), 119-142 (2011).
37. Ren X, Hurley JH: Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *The EMBO Journal* 30(11), 2130-2139 (2011).
38. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, et al.: Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell* 107(1), 55-65 (2001).
39. Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, et al.: HIV Gag Mimics the Tsg101-Recruiting Activity of the Human Hrs Protein. *The Journal of Cell Biology* 162(3), 425-434 (2003).
40. Bishop N, Woodman P: TSG101/Mammalian VPS23 and Mammalian VPS28 Interact Directly and Are Recruited to VPS4-Induced Endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 276(15), 11735-11742 (2001).
41. Curtiss M, Jones C, Babst M: Efficient Cargo Sorting by ESCRT-I and the Subsequent Release of ESCRT-I from Multivesicular Bodies Requires the Subunit Mvb12. *Molecular Biology of the Cell* 18(2), 636-645 (2007).
42. Stefani F, Zhang L, Taylor S, et al.: UBAP1 Is a Component of an Endosome-Specific ESCRT-I Complex that Is Essential for MVB Sorting. *Current Biology* 21(14), 1245-1250 (2011).
43. Tsunematsu T, Yamauchi E, Shibata H, Maki M, Ohta T, Konishi H: Distinct functions of human MVB12A and MVB12B in the ESCRT-I dependent on their posttranslational modifications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399(2), 232-237 (2010).

44. Kostelansky MS, Sun J, Lee S, et al.: Structural and Functional Organization of the ESCRT-I Trafficking Complex. *Cell* 125(1), 113-126 (2006).
45. Kostelansky MS, Schluter C, Tam YYC, et al.: Molecular Architecture and Functional Model of the Complete Yeast ESCRT-I Heterotetramer. *Cell* 129(3), 485-498 (2007).
46. Gill DJ, Teo H, Sun J, et al.: Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO Journal* 26(2), 600-612 (2007).
47. Pineda-Molina E, Belrhali H, Piefer AJ, Akula I, Bates P, Weissenhorn W: The Crystal Structure of the C-Terminal Domain of Vps28 Reveals a Conserved Surface Required for Vps20 Recruitment. *Traffic* 7(8), 1007–1016 (2006).
48. Hurley JH, Hanson PI: Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* , (2010).
49. Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszka DG, Davis DR, Sundquist WI: Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *The EMBO Journal* 21(10), 2397-2406 (2002).
50. Teo H, Veprintsev DB, Williams RL: Structural Insights into Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT-I) Recognition of Ubiquitinated Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279(27), 28689-28696 (2004).
51. Koonin EV, Abagyan RA: TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nature Genetics* 16(4), 330-331 (1997).
52. Ponting CP, Cai YD, Bork P: The breast cancer gene product TSG101: a regulator of ubiquitination?. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 75(7), 467-469 (1997).
53. Hurley JH, Emr SD: THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 35(1), 277-298 (2006).
54. Agromayor M, Soler N, Caballe A, et al.: The UBAP1 Subunit of ESCRT-I Interacts with Ubiquitin via a SOUBA Domain. *Structure* 20(3), 414-428 (2012).
55. Shields SB, Oestreich AJ, Winistorfer S, et al.: ESCRT Ubiquitin-Binding Domains Function Cooperatively During MVB Cargo Sorting. *The Journal of Cell Biology* 185(2), 213-224 (2009).
56. Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD: New Component of ESCRT-I Regulates Endosomal Sorting Complex Assembly. *The Journal of Cell Biology* 175(5), 815-823 (2006).
57. Oestreich AJ, Davies BA, Payne JA, Katzmann DJ: Mvb12 Is a Novel Member of ESCRT-I Involved in Cargo Selection by the Multivesicular Body Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 18(2), 646-657 (2006).
58. Morita E, Sandrin V, Alam SL, Eckert DM, Gygi SP, Sundquist WI: Identification of Human MVB12 Proteins as ESCRT-I Subunits that Function in HIV Budding. *Cell Host & Microbe* 2(1), 41-53 (2007).
59. Teo H, Gill DJ, Sun J, et al.: ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell* 125(1), 99-111 (2006).

60. Bowers K, Lottridge J, Helliwell SB, Goldthwaite LM, Luzio JP, Stevens TH: Protein–Protein Interactions of ESCRT Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5(3), 194–210 (2004).
61. Im YJ, Hurley JH: Integrated Structural Model and Membrane Targeting Mechanism of the Human ESCRT-II Complex. *Developmental Cell* 14(6), 902-913 (2008).
62. Im YJ, Wollert T, Boura E, Hurley JH: Structure and Function of the ESCRT-II-III Interface in Multivesicular Body Biogenesis. *Developmental Cell* 17(2), 234-243 (2009).
63. Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, et al.: Eap45 in Mammalian ESCRT-II Binds Ubiquitin Via a Phosphoinositide-Interacting GLUE Domain. *Journal of Biological Chemistry* 280(20), 19600-19606 (2005).
64. Alam SL, Sun J, Payne M, et al.: Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *The EMBO Journal* 23(7), 1411-1421 (2004).
65. Hierro A, Sun J, Rusnak AS, et al.: Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* 431(7005), 221-225 (2004).
66. Teo H, Perisic O, González B, Williams RL: ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting: Crystal Structure and Interactions with ESCRT-III and Membranes. *Developmental Cell* 7(4), 559-569 (2004).
67. Teis D, Saksena S, Judson BL, Emr SD: ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J* 29(5), 871-883 (2010).
68. Boura E, Ivanov V, Carlson L-A, Mizuuchi K, Hurley JH: Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* , (2012).
69. Langelier C, Schwedler UK von, Fisher RD, et al.: Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *Journal of Virology* 80(19), 9465-9480 (2006).
70. Carlton JG, Martin-Serrano J: Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science* 316(5833), 1908-1912 (2007).
71. Morita E, Sandrin V, Chung H-Y, et al.: Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal* 26(19), 4215-4227 (2007).
72. Jin Y, Mancuso JJ, Uzawa S, Cronembold D, Cande WZ: The Fission Yeast Homolog of the Human Transcription Factor EAP30 Blocks Meiotic Spindle Pole Body Amplification. *Developmental Cell* 9(1), 63-73 (2005).
73. Lata S, Schoehn G, Jain A, et al.: Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science* 321(5894), 1354-1357 (2008).
74. Ghazitabatabai S, Saksena S, Short J, et al.: Structure and Disassembly of Filaments Formed by the ESCRT-III Subunit Vps24. *Structure* 16(9), 1345-1356 (2008).
75. Pires R, Hartlieb B, Signor L, et al.: A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments. *Structure* 17(6), 843-856 (2009).

76. Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, et al.: Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* 16(7), 754-762 (2009).
77. Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD: Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly. *Cell* 136(1), 97-109 (2009).
78. Hanson PI: Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. ,
79. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH: Membrane Scission by the ESCRT-III Complex. *Nature* 458(7235), 172-177 (2009).
80. Shim S, Kimpler LA, Hanson PI: Structure/Function Analysis of Four Core ESCRT-III Proteins Reveals Common Regulatory Role for Extreme C-Terminal Domain. *Traffic* 8(8), 1068–1079 (2007).
81. Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, et al.: Charged Multivesicular Body Protein 2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) Polymerizes into Helical Structures Deforming the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 286(46), 40276-40286 (2011).
82. Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JAG, Weissenhorn W, Kozlov MM: Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 5(11), e1000575 (2009).
83. Whitley P, Reaves BJ, Hashimoto M, Riley AM, Potter BVL, Holman GD: Identification of Mammalian Vps24p as an Effector of Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate-dependent Endosome Compartmentalization. *Journal of Biological Chemistry* 278:, 38786 -38795 (2003).
84. Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, Hanson PI: Interaction of the Mammalian Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) III Protein hSnf7-1 with Itself, Membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *Journal of Biological Chemistry* 280(13), 12799-12809 (2005).
85. Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky SR, Popova E, Palu G, Göttlinger H: Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(50), 19140 -19145 (2006).
86. Lata S, Roessle M, Solomons J, et al.: Structural basis for auto-inhibition of ESCRT-III CHMP3. *Journal of molecular biology* 378(4), 818-827 (2008).
87. Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, et al.: Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. *Developmental Cell* 10(6), 821-830 (2006).
88. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI: ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host & Microbe* 9(3), 235-242 (2011).
89. Carlton JG, Caballe A, Agromayor M, Kloc M, Martin-Serrano J: ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* , (2012).
90. Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, et al.: Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments. *Science* ,
91. Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI: Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(29), 12889 -12894 (2010).

92. Yu Z, Gonciarz MD, Sundquist WI, Hill CP, Jensen GJ: Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *Journal of molecular biology* 377(2), 364-377 (2008).
93. Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, Munn AL, Hankamer B: Three-Dimensional Structure of AAA ATPase Vps4: Advancing Structural Insights into the Mechanisms of Endosomal Sorting and Enveloped Virus Budding. *Structure* 17(3), 427-437 (2009).
94. Vajjhala PR, Nguyen CH, Landsberg MJ, et al.: The Vps4 C-terminal helix is a critical determinant for assembly and ATPase activity and has elements conserved in other members of the meiotic clade of AAA ATPases. *FEBS Journal* 275(7), 1427–1449 (2008).
95. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, et al.: Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449(7163), 735-739 (2007).
96. Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E, et al.: Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Developmental Cell* 15(1), 62-73 (2008).
97. Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ: ESCRT-III Family Members Stimulate Vps4 ATPase Activity Directly or via Vta1. *Developmental Cell* 14(1), 50-61 (2008).
98. Dimaano C, Jones CB, Hanono A, Curtiss M, Babst M: Ist1 Regulates Vps4 Localization and Assembly. *Molecular Biology of the Cell* 19(2), 465-474 (2008).
99. Nickerson DP, West M, Henry R, Odorizzi G: Regulators of Vps4 ATPase Activity at Endosomes Differentially Influence the Size and Rate of Formation of Intraluminal Vesicles. *Mol. Biol. Cell* 21(6), 1023-1032 (2010).
100. Baumgartel V, Ivanchenko S, Dupont A, et al.: Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol* advance online publication, (2011).
101. Jouvenet N, Zhadina M, Bieniasz PD, Simon SM: Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol* advance online publication, (2011).
102. Jouvenet N: Dynamics of ESCRT proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 1-13
103. Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J: Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , (2011).
104. Katoh K, Shibata H, Suzuki H, et al.: The ALG-2-interacting Protein Alix Associates with CHMP4b, a Human Homologue of Yeast Snf7 That Is Involved in Multivesicular Body Sorting. *Journal of Biological Chemistry* 278(40), 39104-39113 (2003).
105. McCullough J, Fisher RD, Whitby FG, Sundquist WI, Hill CP: ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(22), 7687-7691 (2008).
106. von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, et al.: The Protein Network of HIV Budding. *Cell* 114(6), 701-713 (2003).

107. Martin-Serrano J: Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(21), 12414-12419 (2003).
108. Zhou X, Si J, Corvera J, Gallick G, Kuang J: Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins. *BIOCHEMICAL JOURNAL* 432, 525-534 (2010).
109. Zhai Q, Landesman MB, Chung H-Y, et al.: Activation of the retroviral budding factor ALIX. *Journal of virology* 85(17), 9222-9226 (2011).
110. Dordor A, Poudevigne E, Göttlinger H, Weissenhorn W: Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding. *Future Microbiology* 6(10), 1159-1170 (2011).
111. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, et al.: Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science* 303(5657), 531-534 (2004).
112. Fisher RD, Chung H-Y, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP: Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell* 128(5), 841-852 (2007).
113. Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A, et al.: Structural basis for specific cleavage of Lys-[thinsp]|63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455(7211), 358-362 (2008).
114. Solomons J, Sabin C, Poudevigne E, et al.: Structural Basis for ESCRT-III CHMP3 Recruitment of AMSH. *Structure* 19(8), 1149-1159 (2011).
115. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD: The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* 21(1), 77-91 (2011).
116. Hicke L, Dunn R: Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19(1), 141-172 (2003).
117. Reggiori F, Pelham HRB: Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *The EMBO Journal* 20(18), 5176-5186 (2001).
118. Urbanowski JL, Piper RC: Ubiquitin Sorts Proteins into the Intraluminal Degradative Compartment of the Late-Endosome/Vacuole. *Traffic* 2(9), 622-630 (2001).
119. Raiborg C, Stenmark H: The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458(7237), 445-452 (2009).
120. Babst M: MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* In Press, Corrected Proof,
121. Scita G, Fiore PPD: The endocytic matrix. *Nature* 463(7280), 464-473 (2010).
122. Pan B-T, Johnstone RM: Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 33(3), 967-978 (1983).
123. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q: Formation and Release of Arrestin Domain-Containing Protein 1-Mediated Microvesicles (ARMMs) at Plasma Membrane by Recruitment of TSG101 Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(11), 4146-4151 (2012).

124. Elia N, Fabrikant G, Kozlov MM, Lippincott-Schwartz J: Computational Model of Cytokinetic Abscission Driven by ESCRT-III Polymerization and Remodeling. *Biophysical Journal* 102(10), 2309-2320 (2012).
125. Yang D, Rismanchi N, Renvois [acute] B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, Hurley JH: Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Structural & Molecular Biology* 15(12), 1278-1286 (2008).
126. Lawrence BP, Brown WJ: Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal of Cell Science* 102(3), 515-526 (1992).
127. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO: Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *Journal of Biological Chemistry* 273(34), 21883-21892 (1998).
128. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, et al.: Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of Cell Biology* 179(3), 485-500 (2007).
129. Lee J-A, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao F-B: ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Current Biology* 17(18), 1561-1567 (2007).
130. Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, et al.: ESCRTs and Fab1 Regulate Distinct Steps of Autophagy. *Current Biology* 17(20), 1817-1825 (2007).
131. Rusten TE, Stenmark H: How do ESCRT proteins control autophagy?. *J Cell Sci* 122(13), 2179-2183 (2009).
132. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, et al.: Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell* 20(1), 131-139 (2011).
133. Li L, Cohen SN: tsg101: A Novel Tumor Susceptibility Gene Isolated by Controlled Homozygous Functional Knockout of Allelic Loci in Mammalian Cells. *Cell* 85(3), 319-329 (1996).
134. Stauffer DR, Howard TL, Nyun T, Hollenberg SM: CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. *J Cell Sci* 114(13), 2383-2393 (2001).
135. Schmidt AE, Miller T, Schmidt SL, Shiekhattar R, Shilatifard A: Cloning and Characterization of the EAP30 Subunit of the ELL Complex That Confers Derepression of Transcription by RNA Polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 274(31), 21981-21985 (1999).
136. Roxrud I, Stenmark H, Malerød L: ESCRT & Co. *Biology of the Cell* 102(5), 293-318 (2010).
137. Muromoto R, Sugiyama K, Yamamoto T, Oritani K, Shimoda K, Matsuda T: Physical and functional interactions between Daxx and TSG101. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316(3), 827-833 (2004).
138. Ruland J, Sirard C, Elia A, et al.: p53 Accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4), 1859-1864 (2001).

139. Young TW, Rosen DG, Mei FC, et al.: Up-regulation of Tumor Susceptibility Gene 101 Conveys Poor Prognosis through Suppression of p21 Expression in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* 13(13), 3848-3854 (2007).
140. Shilatifard A: Identification and Purification of the Holo-ELL Complex EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF ELL-ASSOCIATED PROTEINS THAT SUPPRESS THE TRANSCRIPTIONAL INHIBITORY ACTIVITY OF ELL. *Journal of Biological Chemistry* 273(18), 11212-11217 (1998).
141. Kamura T, Burian D, Khalili H, et al.: Cloning and Characterization of ELL-associated Proteins EAP45 and EAP20 A ROLE FOR YEAST EAP-LIKE PROTEINS IN REGULATION OF GENE EXPRESSION BY GLUCOSE. *Journal of Biological Chemistry* 276(19), 16528-16533 (2001).
142. Chen BJ, Lamb RA: Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT?. *Virology* 372(2), 221-232 (2008).
143. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG: AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding. *Cell* 114(6), 689-699 (2003).
144. Popov S, Popova E, Inoue M, Gottlinger HG: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Engages the Bro1 Domain of ALIX/AIP1 through the Nucleocapsid. *J. Virol.* 82(3), 1389-1398 (2008).
145. Carlson L-A, Briggs JAG, Glass B, et al.: Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host & Microbe* 4(6), 592-599 (2008).
146. Im YJ, Kuo L, Ren X, et al.: Crystallographic and Functional Analysis of the ESCRT-I /HIV-1 Gag PTAP Interaction. *Structure* 18(11), 1536-1547 (2010).
147. Fujii K, Munshi UM, Ablan SD, et al.: Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* 391(2), 284-292 (2009).
148. Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM: Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 454(7201), 236-240 (2008).
149. Dussupt V, Javid M, Abou-Jaoude G, et al.: The Nucleocapsid Region of HIV-1 Gag Cooperates with the PTAP and LYPXnL Late Domains to Recruit the Cellular Machinery Necessary for Viral Budding. *PLOS PATHOGENS* 5(3), (2009).
150. Dussupt V, Sette P, Bello N, Javid M, Nagashima K, Bouamr F: Basic Residues in the Nucleocapsid Domain of Gag Are Critical for Late Events of HIV-1 Budding. *JOURNAL OF VIROLOGY* 85(5), 2304-2315 (2011).
151. Zhou X, Pan S, Sun L, Corvera J, Lin S, Kuang J: The HIV-1 p6/EIAV p9 docking site in Alix is autoinhibited as revealed by a conformation-sensitive anti-Alix monoclonal antibody. *BIOCHEMICAL JOURNAL* 414, 215-220 (2008).
152. Sette P, Jadwin J, Dussupt V, Bello N, Bouamr F: The ESCRT-Associated Protein Alix Recruits the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 To Facilitate HIV-1 Release through the LYPXnL L Domain Motif. *JOURNAL OF VIROLOGY* 84(16), 8181-8192 (2010).
153. Rauch S, Martin-Serrano J: Multiple Interactions between the ESCRT Machinery and Arrestin-Related Proteins: Implications for PPXY-Dependent Budding. *JOURNAL OF VIROLOGY* 85(7), 3546-3556 (2011).

154. Zhadina M, Bieniasz P: Functional Interchangeability of Late Domains, Late Domain Cofactors and Ubiquitin in Viral Budding. *PLOS PATHOGENS* 6(10), (2010).
155. Weiss E, Popova E, Yamanaka H, Kim H, Huibregtse J, Gottlinger H: Rescue of HIV-1 Release by Targeting Widely Divergent NEDD4-Type Ubiquitin Ligases and Isolated Catalytic HECT Domains to Gag. *PLOS PATHOGENS* 6(9), (2010).
156. Medina G, Pincetic A, Ehrlich LS, et al.: Tsg101 can replace Nedd4 function in ASV Gag release but not membrane targeting. *Virology* 377(1), 30-38 (2008).
157. Teis D, Saksena S, Emr SD: Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Developmental Cell* 15(4), 578-589 (2008).
158. Shiels A, Bennett TM, Knopf HLS, et al.: CHMP4B, a Novel Gene for Autosomal Dominant Cataracts Linked to Chromosome 20q. *The American Journal of Human Genetics* 81(3), 596-606 (2007).
159. Tsang HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM: A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* 88(3), 333-346 (2006).
160. Effantin G, Dordor A, Sandrin V, Martinelli M, Sundquist WI, Schoehn G, Weissenhorn W: ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cellular Microbiology*, Submitted.

RESUME :

La machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) est impliquée dans plusieurs processus cellulaires fondamentaux faisant intervenir le remodelage de structures membranaires comme la séparation des cellules filles lors de la division cellulaire ou le tri des protéines cargo vers le lysosome. Cette machinerie est détournée par de nombreux virus enveloppés comme le VIH pour assurer le bourgeonnement des virions.

Le complexe ESCRT-III (constitué des protéines CHMP) est responsable de l'activité de fission membranaire de la machinerie en formant des structures polymériques qui exercent des contraintes mécaniques au niveau des membranes biologiques.

Pour comprendre comment ces polymères peuvent être formés, la structure des hétéropolymères CHMP2A/CHMP3 a été obtenue par cryo-microscopie électronique à 22,4 Å de résolution. Des détails sur le mécanisme d'interaction entre les protéines CHMP2A, CHMP3 et CHMP4B ont également pu être obtenus, notamment par le biais de la technique SPR.

Enfin, dans le but de visualiser les polymères ESCRT-III *in cellulo*, plusieurs méthodes ont été employées pour obtenir un anticorps spécifique des polymères. La technique du Phage Display a été utilisée et en parallèle un anticorps anti-CHMP4B a pu être développé.

L'ensemble des résultats obtenus ici sont en accord avec les données disponibles dans la littérature et ont permis d'établir un modèle de polymérisation du complexe ESCRT-III.

ABSTRACT:

The ESCRT machinery (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) is involved in several fundamental cellular processes requiring a membrane remodeling activity such as separation of daughter cells during cytokinesis or cargo protein sorting to the lysosome. This machinery is also hijacked by many enveloped viruses such as HIV to terminate budding.

The ESCRT-III complex (composed of CHMP proteins) catalyzes the membrane severing reaction by forming polymers at the membrane neck. In order to understand how those polymers are formed, the cryo-electron microscopy structure of CHMP2A/CHMP3 heteropolymers has been solved at a resolution of 22.4 Å. Details regarding the interaction mechanism between CHMP2A, CHMP3 and CHMP4B have also been obtained, notably by means of the SPR technique.

Finally, to visualize ESCRT-III polymers in cells, several methods including Phage Display have been employed to get a polymer-specific antibody. This work enabled to obtain an anti-CHMP4B antibody.

Overall, the results presented in this manuscript are in good agreement with the existing literature and allow to generate a polymerization model of the ESCRT-III complex.