



**HAL**  
open science

# Caractérisation structurale et fonctionnelle de la forme dimérique de la protéine Alix

Nolwenn Miguet

► **To cite this version:**

Nolwenn Miguet. Caractérisation structurale et fonctionnelle de la forme dimérique de la protéine Alix. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV097 . tel-04103459

**HAL Id: tel-04103459**

**<https://theses.hal.science/tel-04103459v1>**

Submitted on 23 May 2023

**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 GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Unité de recherche : Institut de Biologie Structurale

## Caractérisation structurale et fonctionnelle de la forme dimérique de la protéine Alix

### Structural and functional studies of dimeric Alix

Présentée par :

**Nolwenn MIGUET**

#### Direction de thèse :

**Winfried WEISSEHORN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Pauline MACHEBOEUF**

Université Grenoble Alpes

Co-encadrante de thèse

#### Rapporteurs :

**Yves GAUDIN**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Sud

**Patrice GOUET**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Lyon 1 - Claude Bernard

#### Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2022**, devant le jury composé de :

**Winfried WEISSEHORN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Yves GAUDIN**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Ile-de-France Sud

Rapporteur

**Marie-Odile FAUVARQUES**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CEA centre de Grenoble

Examinatrice

**Delphine MURIAUX**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Occitanie Est

Examinatrice

**Rob RUIGROK**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

**Patrice GOUET**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Lyon 1 - Claude Bernard

Rapporteur

#### Invités :

**Pauline macheboeuf**

CHARGE DE RECHERCHE,





## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant  
Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par :  
**Nolwenn MIGUET**

# **Caractérisation structurale et fonctionnelle de la forme dimérique de la protéine Alix**

Le 16 décembre 2022

**Rob RUIGROK**

Professeur des universités, Université Grenoble Alpes - IBS

**Yves GAUDIN**

Directeur de recherche CNRS Université Paris-Saclay - I2BC

**Patrice GOUET**

Professeur Université de Lyon - IBCP

**Marie-Odile FAUVARQUE-MARRAS**

Directeur de recherche CEA Grenoble - Gen&Chem

**Delphine MURIAUX**

Directeur de recherche CNRS Montpellier - IRIM

**Winfried WEISSEHORN**

Professeur des universités, Université Grenoble Alpes - IBS

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Invitée :

**Pauline MACHEBOEUF**

CRCN - IBS

Co-encadrante de thèse

Thèse préparée au Laboratoire Entry and Budding of Enveloped Viruses (EBEV) de  
l'Institut de Biologie Structurale (IBS)

*A mes garçons Mathieu et Clément*  
*A ma Maman*



## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement M. Yves Gaudin et le Pr. Patrice Gouet pour avoir pris le temps de juger mon manuscrit en tant que rapporteurs, ainsi que Mme Marie-Odile Fauvarque-Marras et Mme Delphine Muriaux qui ont accepté d'en être les examinatrices. Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au Pr. Rob Ruigrok d'avoir accepté de présider ce jury, aboutissement d'un long travail, qu'il a suivi depuis le début.

Un immense merci au Pr. Winfried Weissenhorn qui a accepté et m'a permis de mener à bien ce travail de thèse en parallèle de mon poste de technicien. Merci de m'avoir accordé votre confiance. Merci à tous les membres du groupe EBEV anciens et nouveaux, de m'avoir accompagnée pendant ces quelques années.

Pauline, il n'y aura pas assez de mots et je ne saurais les mettre dans le bon ordre pour t'exprimer toute ma reconnaissance d'avoir accepté de co-encadrer ce travail. Parce que tu es bien loin de n'être que ma co-encadrante de thèse, tu es une amie chère. Tu m'as soutenue, aidée, encouragée, guidée, écoutée, conseillée... Je te suis extrêmement reconnaissante d'avoir toujours été à l'écoute, bienveillante, compréhensive et généreuse en conseils avisés ainsi que pour la pertinence de tes critiques. Je te remercie également pour la relecture de ce manuscrit, pour toutes ces discussions et ce partage. Je tiens à te remercier très sincèrement pour tout le travail effectué sur ce projet de cristallisation. Je garde au plus profond de moi, de mon cœur, de mon âme, le souvenir des passages des cristaux au synchrotron, des nuits, des week-end... Je n'oublierai jamais nos nuits à regarder avec dépit...des taches de léopard et encore des tâches de léopard...quand il y en avait...

Je remercie, non sans une certaine émotion, l'ensemble des personnes du CIBB, Thibaut Crépin, Rob Ruigrok, Jean-Marie Bourhis, Nicolas Tarbouriech, Caroline Mas, Pierre Métails pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé pendant 1an et demi. Je vous remercie des conditions de travail dont j'ai pu bénéficier aussi bien sur le plan humain que professionnel. Je vous remercie pour les très nombreuses discussions que l'on a eues autour de mon projet. Je n'oublierai pas, que c'est suite à une des nombreuses discussions, que j'ai pris l'initiative de monter le dossier de demande de nanocorps au centre INSTRUMENT qui a permis la résolution de ma structure. Je vous remercie tous, très sincèrement, de m'avoir permis de profiter pleinement de votre expérience enrichissante. Mais, je suis tout de même heureuse, d'avoir persisté dans ce projet auquel je crois et de n'avoir pas suivi le conseil ... de jeter ma protéine dans l'Isère...

Vos encouragements m'ont donné la force d'être combattive et chaque fois me poussaient toujours à être encore un peu plus autonome. « Mais je ne sais pas faire... et bien, apprend ! ». Vos conseils et vos encouragements m'ont guidée tout au long de ma thèse et ont sans nul doute grandement contribué à l'avancement de mes travaux.

Thibaut, il va être difficile de résumer ce que je te dois en quelques lignes. J'aimerais te remercier tout particulièrement pour les précieux conseils techniques et généraux en cristallographie, pour les moments au synchrotron SOLEIL, pour les discussions parfois difficiles à recevoir mais tellement formatrices. Merci de m'avoir poussée à être toujours plus autonome et à prendre des initiatives.

Je remercie Jean-Marie d'avoir pris le temps de me former et de m'avoir transmis toutes les bases pour mener à bien des études de SAXS. Je te remercie de m'avoir rassurée : « Si jamais tu arrêtes la science, lance-toi à faire des gâteaux... mais pas à la lavande ! ».

Je voulais remercier chaleureusement Marie-Odile Fauvarque-Marras. Merci pour ton précieux soutien dans les moments difficiles. Celui-ci a été déterminant. Tes interventions m'ont permis de poursuivre mon chemin dans un climat plus favorable avec des pensées positives. Je te remercie d'avoir su être à l'écoute de mes difficultés et d'avoir su trouver les paroles réconfortantes et positives. Je te remercie pour ta bienveillance.

Anne-Emmanuelle, comment résumer mes remerciements en une phrase...Merci pour nos fous rires, nos discussions de filles. Merci pour ta positive attitude et tes paroles souvent réconfortantes. Merci pour ton humour, ta bonne humeur ! Merci pour toutes les discussions que j'ai pu avoir avec toi, d'être si ouverte, si accessible, si simple dans le bon sens du terme. Merci pour toutes tes bonnes idées qui m'ont souvent beaucoup aidée. Je n'oublierai pas que l'étude des phosphorylations a été possible grâce à toi. Merci pour tous ces moments de rigolades, ces moments lyriques à chanter Mortelle Adèle. Merci pour ta sympathie, ton écoute, ta grande disponibilité et ton enthousiasme si communicatif. Tu as été mon soleil. Et enfin, je te remercie d'être ce que tu es, pour ton tempérament calme et avisé qui m'a souvent apaisée et canalisée.

Je souhaiterais remercier Remy Sadoul et Christine Chatellard pour le temps qu'ils ont consacré à la relecture de mon manuscrit de thèse. Merci pour votre temps et le regard critique que vous avez porté sur mes travaux et sur ma rédaction. Rémy, Christine je vous remercie pour votre sincérité permanente et votre disponibilité. J'ai énormément profité de toutes ces discussions et je vous remercie de m'avoir fait profiter de tant de connaissances. Merci de m'avoir montré qu'en science, la rigueur est essentielle.

Je remercie de tout mon cœur Guidenn Sulbaran, pour tous les efforts qu'elle a fournis pour la partie microscopie électronique de ce travail. Un grand merci à toi pour le temps et la patience que tu as consacrés à ce projet (si difficile) en jonglant avec ton emploi du temps déjà bien surchargé de tes nombreux projets. Je te suis reconnaissante de tout le temps passé à regarder les grilles, à faire du manual picking, à réfléchir conjointement à comment améliorer l'échantillon. Je me sens chanceuse d'avoir pu profiter de ton travail de qualité, de ta disponibilité et de tes compétences.

Un grand merci à Hamida. Ça a été un réel plaisir de partager avec toi les derniers moments de stress de l'écriture de nos manuscrits, du choix de nos jury, de la mise en page qui n'en fait qu'à sa tête, de la réservation de la salle, de la dernière ligne droite de nos travaux....

Un grand merci à Sylvie et Sindy qui nous accompagnent tout au long de nos projets, qui sont à l'écoute de nos demandes « toujours urgentes » de verrerie, qui sont toujours à l'écoute de nos coups de mou.

Merci à toutes les personnes des plateformes de l'ISBG, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement ma maman, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, qui a su me guider, me soutenir et m'accompagner depuis un bon moment déjà... Et je souhaiterais remercier affectueusement les personnes sans qui je ne pourrais pas être celle que je suis, qui m'ont soutenue sans relâche, et ont également rendu possible cette thèse, ma famille et mes ami(e)s : Charlotte, Lucien, Patrick, Magali, Sandrine, Alexia, Pierre, Yannick, Christian, Annick, Dorothée, Marie Pierre, Adeline, Marion, Claire, Isabelle, Noémie, pour leur compréhension, leur amour et leur soutien. Eux qui, par l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de mes travaux, m'ont rendue fière et m'ont encouragée à poursuivre mes travaux avec optimisme en dépit des frustrations et des désillusions rencontrées. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir fait confiance. Maud, je ne sais pas par où commencer tant j'aurais à dire mais tu sais déjà ce que tu représentes pour moi ! Ton écoute, ton sourire, ta sensibilité m'ont toujours énormément touchée. Et ton soutien durant cette dernière année de thèse où les aléas de la vie m'ont mis particulièrement à l'épreuve, a été très important pour moi. Merci de m'avoir montré qu'il ne faut jamais baisser les bras, de m'avoir appris à être fière de ce que je suis et de ce que je fais. J'ai ta petite voix dans ma tête qui me rappelle jour après jour que la plus belle ambition dans la vie, c'est d'être heureuse, épanouie et en accord avec soi-même. Tu es ma pépite ! Merci d'être là pour moi !

J'espère n'avoir oublié personne lors de ces remerciements.

# Table des matières

ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	9
RESUME	15
ABSTRACT	17
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
I.    La protéine Alix	22
A.    Organisation de la protéine Alix	22
1.    Le domaine Bro-1 N-terminal	22
2.    Le domaine V central	24
3.    Le domaine PRD C-terminal	26
B.    Partenaires et fonctions de la protéine Alix	26
1.    Formation des vésicules intraluminales (VIL)	27
2.    La cytokinèse	29
3.    Le bourgeonnement viral	31
4.    Biogénèse des exosomes dépendante de la machinerie ESCRT	34
5.    Back fusion	36
6.    La réparation de la membrane plasmique	37
7.    Apoptose	37
C.    Les modifications post-traductionnelles de la protéine Alix	39
1.    La phosphorylation	39
a.    Phosphorylation et endocytose des récepteurs à facteur de croissance	39
b.    Phosphorylation et mitose	41
c.    Phosphorylation et maturation de l'ovocyte	41
d.    Phosphorylation et formation d'amyloïdes	42
2.    Ubiquitination de la protéine Alix	43
a.    La voie de tri endolysosomale indépendante de l'ubiquitination	43
b.    Le bourgeonnement des virus	44
II.    Alg-2	46
1.    Organisation de la protéine Alg-2	46
2.    Interaction avec la protéine Alix	47
a.    Structure cristallographique du complexe Alix/ Alg-2	47
b.    Implication du complexe Alix /Alg-2 dans le changement de conformation de la protéine Alix	49
III.    Fusion et fission membranaire	50
A.    La Fusion membranaire :	50
1.    Les protéines SNARE	51
2.    Les glycoprotéines virales	53
3.    L'Atlastine	55
4.    Les protéines « spikes » des virus pléomorphes d'archées	55
B.    La fission membranaire	57
1.    Les dynamines	57
2.    Les protéines du complexe ESCRT-III	59
C.    Mise en évidence expérimentale de la fusion membranaire	64
1.    Reconstitution de membranes cellulaires in vitro	65
2.    Microscopie confocale à fluorescence	66
3.    Les sondes colloïdales et microscopie à force atomique	67
4.    Camera CCD	68
5.    Test biochimique	69
IV.    Objectifs de l'étude	70

<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>73</b>
<b>1<sup>ere</sup> partie : Clonage et expression des protéines</b>	<b>75</b>
I. Clonage, expression et purification des différentes constructions d'Alix	75
1. Mutagenèse dirigée	75
2. Expression et purification de la protéine Alix ΔPRD	75
3. Expression et purification des différents mutants de la forme dimérique du domaine V d'Alix	76
4. Expression en cellules de mammifères et purification de la protéine Alix entière	77
II. Clonage, expression et purification de la protéine Alg-2	78
1. Clonage d'Alg-2 <sub>3des23</sub>	78
2. Expression de la protéine Alg-2 <sub>3 des 23</sub>	78
III. Production, expression et purification des nanocorps	79
1. Production des nanocorps	79
2. Expression et purification des nanocorps	80
3. Complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps	81
<b>2<sup>eme</sup> partie. Méthodes de caractérisation des protéines</b>	<b>82</b>
I. Spectrométrie de masse	82
1. Principe	82
2. Contrôle qualité par spectroscopie de masse dénaturante ESI	83
3. Spectrométrie de masse en conditions natives	83
II. BLI : bio layer interferometry	83
1. Principe	83
2. Caractérisation de l'affinité des oligomères des différentes constructions d'Alix pour les nanocorps	84
III. Ultracentrifugation analytique	85
IV. Cristallographie aux rayons X	85
1. Principe	86
2. Techniques de cristallisation	87
3. Criblage de conditions de cristallisation	88
4. Congélation et enregistrement des données de diffraction	88
5. Traitement des données	88
V. Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	89
A. Principe et acquisition des données	89
B. Traitement et analyse des données	91
1. Loi et représentation de Guinier	91
2. Fonction de distribution de distance	91
3. Interprétation des données SAXS et modélisation structurale	92
4. Calcul d'enveloppe <i>ab-initio</i>	92
5. Comparaison de structures aux données SAXS	93
VI. Microscopie électronique	93
<b>3<sup>eme</sup> partie : Interaction avec la membrane</b>	<b>94</b>
I. Reconstitution en Liposomes	94
1. Préparation des liposomes	94
2. Tests de flottaison des liposomes avec la protéine Alix ΔPRD	94
3. Test de Fluorescence DiD/Dil	95
4. NTA nanosight	95
<b>RESULTATS</b>	<b>97</b>
<b>1<sup>ere</sup> partie : Étude du dimère du domaine V de la protéine Alix par cristallographie aux rayons X</b>	<b>99</b>
I. Cristallisation initiale du dimère du domaine V de la protéine Alix	100
1. Production et purification de la protéine Alix-V dimérique	100
2. Étude de la phosphorylation du dimère du domaine V de la protéine Alix	102
3. Études biophysiques des mutants par SAXS	105

4.	Études cristallographiques du mutant de phosphorylation Alix-V S <sub>568</sub> A-S <sub>577</sub> A	114
5.	Modèle de dimérisation	117
II.	Étude structurale du dimère du domaine V de la protéine Alix en présence de nanocorps de lama	118
1.	Production et purification des nanocorps anti Alix-V	118
2.	Spectrométrie de masse native du complexe Alix-V QC8 dimérique en présence de nanocorps 120	
3.	Purification du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79	121
4.	Criblage des conditions de cristallisation du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79	122
5.	Analyse de la structure cristallographique du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79	124
6.	Validation du modèle dimérique obtenu	131
III.	Caractérisation de l'affinité des Nanocorps pour les différentes constructions d'Alix	134
IV.	Caractérisation structurale du dimère de la protéine Alix ΔPRD (Bro-V) en interaction avec le nanocorps NB96 par microscopie électronique	141
1.	Préparation des échantillons	141
2.	Microscopie électronique du complexe Alix ΔPRD dimérique/NB96	142
3.	Caractérisation du complexe Alix ΔPRD dimérique /NB96 en spectrométrie de masse	144
<b>2<sup>ème</sup> partie : Étude de l'interaction entre la protéine Alix et son partenaire Alg-2</b>		<b>147</b>
I.	Caractérisation structurale du complexe Alix FL /Alg-2	147
1.	Expression et purifications des protéines Alix FL et Alg-2 <sub>3-des23</sub>	147
2.	Formation du complexe Alix FL/Alg-2 <sub>3-des23</sub>	151
3.	Analyse en microscopie électronique du complexe Alix FL/ Alg-2 <sub>3-des23</sub>	153
4.	Caractérisation du complexe Alix FL / Alg-2 <sub>3-des23</sub> en spectrométrie de masse	155
<b>3<sup>ème</sup> partie : Étude de l'interaction entre la protéine Alix et les membranes biologiques</b>		<b>159</b>
I.	Rôle du pH dans l'interaction avec les liposomes	159
II.	Alix déforme les membranes lipidiques et provoque la fusion des liposomes	160
1.	Nanosight et microscopie électronique	160
2.	Tests de Fluorescence	161
3.	Protéolyse limitée	173
4.	Protéoliposomes remis à pH7	174
5.	Oligomérisation de la protéine Alix en présence de membranes	177
<b>DISCUSSION</b>		<b>179</b>
I.	Multimérisation et activation de la protéine Alix	181
	<i>Modifications post traductionnelle et activation d'Alix</i>	182
	<i>Alg-2 et activation d'Alix</i>	183
	<i>Interaction membranaire et activation d'Alix</i>	184
II.	Alix versus ESCRT-I/II : Deux voies concomitantes	186
<b>RÉFÉRENCES</b>		<b>191</b>
<b>ANNEXE</b>		<b>205</b>



# **Abréviations**



AIP1 : Apoptosis Interacting Protein 1  
Alg-2 : apoptosis-linked gene 2  
Alix : Alg-2 interacting protein X  
ARRDC3 :  $\alpha$ -arrestin arrestin domain-containing protein-3  
ALV : Avian Leukosis Virus  
CEP55 : Centrosomal Protein of 55 KDa  
CHMP : charged multivesicular protein  
CIN85 : Cbl Interacting of 85 kD  
CryoEM : Cryo Electron Microscopy  
DUIM : Double Ubiquitin Interaction Motif  
EGF : epithelium growth factor  
EGFR : epithelium growth factor receptor  
EIAV : equine infectious anemia virus  
ESCRT : endosomal sorting complexe required for transport  
GLUE : GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45  
GUV : Giant Unilamellar vesicle  
HRS : hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate  
IEAV : Infectious Equine Anemia Virus  
IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
ILV : intraluminal vesicle  
LBPA : Lysobisphosphatidic acid  
LUV : Large Unilamellar vesicle  
MIM : MIT Interacting Motif  
MIT : Microtubule Interacting and Trafficking  
MLV : virus de la leucémie murine  
MVB : multivesicular body  
MVE : multivesicular endosome  
PAR-1 : protease-activated receptor-1  
PEG : Poly Ethylène Glycol  
PI(3)P : phosphatidylinositol 3-phosphate  
PI(4,5)P2 : phosphatidylinositol (4,5) -bisphosphate  
PRD : prolin rich domain  
RE : endosomes de recyclage

RSV : sarcome roux

SAXS: Small Angle X-Ray Scattering

SETA : *src* homology 3 domain containing expressed in tumorigenic astrocytes

SH3: Src Homology type 3

SNARE : (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor)

STAM : signal transducing adaptor molecule

TEV: Tobacco Etch Virus

TNFR : Tumor Necrosis Factor receptor

TSG-101 : tumor susceptibility gene 101

UEV : Ubiquitin E2 Variant

UIM : Ubiquitin interacting motif

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIL : vésicules intraluminales

VLP : Virus-Like Particles

WT : wild type

# Liste des figures



Figure 1 : Processus cellulaires contrôlés par la machinerie ESCRT et la protéine Alix.....	21
Figure 2 : Représentation schématique des trois domaines de la protéine Alix humaine.....	22
Figure 3 : Structure cristallographique des domaines Bro-1 et V de la protéine Alix humaine (PDB 2OEV). .....	23
Figure 4 : Sites d'interactions membranaire du domaine Bro-1 de la protéine Alix (Bissig et al., 2013).....	24
Figure 5 : Structure cristallographique du domaine V de la protéine Alix (Lee et al., 2007).....	25
Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage séquentiel des complexes ESCRT.....	28
Figure 7 : Aperçu des acteurs cellulaires impliqués pendant le processus de scission de la cytokinèse.....	30
Figure 8 : Organisation structurale de la protéine Gag (Zhang et al., 2014).....	32
Figure 9 : Collaboration entre la machinerie ESCRT et la protéine Gag pendant la formation et le bourgeonnement des virus du VIH-1 .....	33
Figure 10 : Organisation schématique des deux branches utilisées par la machinerie ESCRT.....	34
Figure 11 : Compositions des exosomes et les différentes voies de biogenèse des exosomes (Villarroya- Beltri et al., 2014) .....	35
Figure 12 : Mécanisme contrôlant le ciblage des protéines cargos dans l'exosome (Adapté de Villarroya- Beltri et al., 2014) .....	36
Figure 13 : Inhibition de l'endocytose de l'EGFR par la protéine Alix (Schmidt et al., 2004).....	40
Figure 14 : Régulation négative de la protéine Alix par la protéine Src lors du processus d'endocytose de l'EGFR (Schmidt et al., 2004) .....	41
Figure 15 : Fibres amyloïdes et gel formé par GB1-PRD800-868 (Elias et al., 2021).....	42
Figure 16 : Voie de tri lysosomal des récepteurs de signalisation cellulaire indépendante de l'ubiquitine (Dores et al., 2015).....	43
Figure 17 : Complexes cellulaires et protéines impliqués dans l'activité du domaine tardif.....	45
Figure 18 : Identification in silico du domaine V de la protéine Alix (Alix-V) comme domaine de liaison à l'ubiquitine .....	46
Figure 19 : Représentation schématique de la protéine Alg-2 humaine et différences structurelles de Alg-2 en présence ou en absence de calcium .....	47
Figure 20 : Structure cristalline du complexe ALG-2/Alix en présence de zinc .....	48
Figure 21: Illustration schématique du rôle d'Alg-2 sur le changement conformation de la protéine Alix (Sun et al., 2016) .....	49
Figure 22 : Étapes du processus de fusion membranaire .....	51
Figure 23 : Fusion membranaire médiée par le complexe SNARE synaptique (Yoo et al., 2022).....	52
Figure 24 : Modèle de fusion membranaire virale (Barrett et al., 2020).....	54
Figure 25 : Modèle de fusion induite par l'Atlastine (Ozeir and Cohen, 2022).....	55
Figure 26 : Structure cristallographique et cryotomographie électronique de la protéine « spike » du HRPV-6 (El Omari et al., 2019).....	56
Figure 27 : Modèle proposé pour le réarrangement de la protéine « spike » lors de l'infection par le virus HRPV-6.....	57
Figure 28 : Structures des polymères et mécanisme de fission de la Dynamine (Zhang et al., 2001 ; (Ramachandran and Schmid, 2018).....	58
Figure 29 : Le complexe ESCRT-III.....	60
Figure 30 : Les structures des polymères du complexe ESCRT-III .....	61
Figure 31 : Modèle de remodelage de la membrane par les ESCRT .....	62
Figure 32 : Modèle de constriction membranaire induite par les filaments ESCRT-III CHMP2/CHMP3 (Caillat et al., 2019) .....	63
Figure 33 : Diffusion de lipides lors de la fusion membranaire de deux bicouches lipidiques .....	64
Figure 34 : Mise en évidence de la fusion membranaire grâce au FRET.....	65
Figure 35 : Redistribution du fluorophore R18 pendant la fusion virale (Schéma adapté de blumenthal et al., 2002) .....	66
Figure 36 : Exemple de fusion des GUV induite par des billes de SiO2 (Arribas et al., 2021).....	67
Figure 37 : Illustration de la microscopie à sonde colloïdale (Witt et al., 2021).....	68
Figure 38 : Images de fusion membranaire .....	68
Figure 39 : Anticorps produits par les camélidés .....	79
Figure 40 : Processus de production d'anticorps à domaine unique .....	80
Figure 41 : Schéma du principe d'ionisation par MALDI ou ESI .....	82
Figure 42 : Principe du BLI.....	84
Figure 43 : Caractérisation de l'affinité de la protéine Alix avec les nanocorps par BLI .....	84
Figure 44 : Principe de la cristallisation.....	86

Figure 45 : Principe de cristallisation par diffusion de phase vapeur en goutte suspendue ou en goutte assise.....	87
Figure 46 : Description du principe du SAXS.....	90
Figure 47 : Représentation de Guinier des données SAXS (adapté de Putnam, et al.,2007).....	91
Figure 48 : Fonction de distribution de distance (Nyman, & Fullmer, 2015).....	92
Figure 49 : Modèles générés par le logiciel DAMMIN.....	93
Figure 50 : Représentation schématique des trois constructions de la protéine Alix utilisées dans ce manuscrit.....	99
Figure 51 : Optimisation du protocole de purification du domaine V central de la protéine Alix .....	101
Figure 52 : Cristaux du dimère du domaine V central de la protéine Alix : Alix-V .....	101
Figure 53 : Mise en évidence de la phosphorylation du domaine V central de la protéine Alix.....	103
Figure 54 : Étude protéomique en gel 2D des monomères et dimères du domaine V central de la protéine Alix.....	104
Figure 55 : Spectrométrie de masse sur résidus phosphorylés sur les oligomères du domaine V de la protéine Alix .....	105
Figure 56 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle <i>ab initio</i> du monomère du domaine V de la protéine Alix (Alix-V WT).....	106
Figure 57 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle <i>ab initio</i> du monomère du mutant Alix-V QC1 .....	107
Figure 58 : Localisation de la mutation du mutant Alix-V QC1 .....	108
Figure 59 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle <i>ab initio</i> du monomère du mutant Alix-V QC8.....	109
Figure 60 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle <i>ab initio</i> du monomère du mutant Alix-V QC10.....	110
Figure 61 : Structure cristallographique du domaine V de la protéine Alix (Lee et al., 2007) .....	111
Figure 62 : Modèle <i>ab initio</i> du monomère du mutant Alix-V QC10.....	111
Figure 63 : Analyse SAXS des dimères Alix-V WT et des mutants Alix-V QC1, Alix-V QC10 et Alix-V QC8. ....	113
Figure 64 : Schématisation de la structure de Alix-V.....	114
Figure 65 : Données Cristallographiques du dimère du mutant Alix-V S <sub>568</sub> A-S <sub>577</sub> A (QC8).....	115
Figure 66 : Données Cristallographiques du cristal du dimère du mutant Alix-V S <sub>568</sub> A-S <sub>577</sub> A (QC8) trempé dans cluster de bromure de tantale.....	116
Figure 67 : Modèle de dimérisation du domaine V de la protéine Alix.....	117
Figure 68 : Production et purification des nanocorps et du complexe Alix-V QC8 dimérique/nanocorps .....	119
Figure 69 : Profil de spectrométrie de masse native du complexe Alix-V QC8 dimérique / Nanocorps 79 ou 96.....	121
Figure 70 : Production et purification du complexe Alix-V QC8 dimérique / Nanocorps 79.....	122
Figure 71 : Le système CrystalDirect (HTX-EMBL).....	123
Figure 72 : Cristaux du dimère du domaine V central de la protéine Alix en présence du nanocorps NB79 .....	124
Figure 73 : Cliché de diffraction du cristal du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79 .....	125
Figure 74 : Structure Xray du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79.....	126
Figure 75 : Comparaisons de structures cristallographiques du monomère et du monomère reformé dans le dimère d'Alix.....	126
Figure 76 : Comparaisons de Structure cristallographiques du monomère et du monomère reformé dans le dimère d'Alix .....	127
Figure 77 : Structure cristallographique de la région charnière du dimère du domaine V d'Alix.....	128
Figure 78 : Comparaisons des structures cristallographiques de la région charnière du monomère ou du dimère du domaine V d'Alix .....	129
Figure 79 : Extrapolation de la structure cristallographiques de la protéine entière dimérique Alix.....	130
Figure 80 : Validation de la structure dimérique d'Alix : Étude biochimique des mutants N <sub>538</sub> C-A <sub>540</sub> C et S <sub>381</sub> C-V <sub>615</sub> C.....	132
Figure 81 : Profil de spectrométrie de masse native du mutant Alix QC8 N <sub>538</sub> C-A <sub>540</sub> C monomérique ou dimérique .....	133
Figure 82 : Ligand et Analyte utilisés pour la caractérisation des affinités des différentes constructions de la protéine Alix en fonction des nanocorps.....	135
Figure 83 : Purification de la protéine Alix ΔPRD .....	136
Figure 84 : Purification de la protéine Alix FL .....	137
Figure 85 : Mesure d'affinité du domaine V dimérique de la protéine Alix avec le nanocorps 79 .....	138

Figure 86 : Mesure d'affinité des oligomères des différentes constructions de la protéine Alix avec les nanocorps.....	139
Figure 87 : Purification du complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96.....	142
Figure 88 : Image de microscopie électronique en coloration négative : Étapes de purification du complexe Alix ΔPRD dimérique/ NB96.....	143
Figure 89 : Spectres de masse déconvolué de la protéine Alix Δ PRD et du Nanocorps 96 seuls.....	144
Figure 90 : Spectre de masse du complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross linké.....	145
Figure 91 : Purification de la protéine Alg2 <sub>3-des23</sub> .....	148
Figure 92 : L'oligomérisation de la protéine Alg2 <sub>3-des23</sub> est dépendante de sa concentration et de la concentration en calcium.....	149
Figure 93 : Étude de l'oligomérisation de la protéine Alg2 <sub>3-des23</sub> par ultracentrifugation analytique.....	150
Figure 94 : Protocole de production et de purification du complexe Alix FL/ Alg-2 <sub>3-des23</sub> .....	151
Figure 95 : Purification du complexe Alix FL/ Alg-2 <sub>3-des23</sub> .....	153
Figure 96 : Coloration négative en microscopie électronique du complexe Alix FL/ Alg-2 <sub>3-des23</sub> .....	154
Figure 97 : Profils de spectrométrie de masse des protéines Alix FL et Alg-2 <sub>3-des23</sub> .....	155
Figure 98 : Profils de spectrométrie de masse du complexe Alix FL/Alg-2 <sub>3-des23</sub> .....	157
Figure 99 : Effet du pH sur l'interaction de la protéine Alix ΔPRD avec les liposomes.....	160
Figure 100 : Effet de l'interaction de la protéine Alix ΔPRD sur la taille des liposomes à pH 4,5.....	161
Figure 101 : Principe du test de fluorescence.....	162
Figure 102 : pH des différents compartiments subcellulaires d'une cellule de mammifères.....	163
Figure 103 : Test de Fusion.....	164
Figure 104 : Titration de la protéine Alix ΔPRD.....	165
Figure 105 : Vérification de l'interaction des protéines CHMP3 FL et des complexes Alix /Nanocorps aux liposomes.....	166
Figure 106 : Le processus de fusion est Alix dépendante.....	167
Figure 107 : Effet de l'interaction des protéines Alix ΔPRD, CHMP3FL ou des complexes Alix/Nanocorps sur la taille des liposomes à pH 5.....	168
Figure 108 : Titration de la protéine Alix.....	170
Figure 109 : Le processus de fusion est Alix et pH dépendant.....	171
Figure 110: Le processus de fusion est Alix dépendant.....	172
Figure 111 : Effet de l'interaction de la protéine Alix ΔPRD sur la taille et la forme des liposomes à pH 5.....	173
Figure 112 : L'interaction de la protéine Alix ΔPRD avec les liposomes lui confère une protection.....	174
Figure 113 : Effet du pH sur l'interaction de Alix ΔPRD avec les liposomes.....	174
Figure 114 : Analyse de la taille des protéoliposomes à pH4.5 ou pH7 par NTA.....	175
Figure 115 : Sensibilité des protéoliposomes à pH5 ou pH7 à la trypsine.....	176
Figure 116 : Microscopie électronique des protéoliposomes à pH7 montre une protéine Alix ΔPRD attachée à la membrane des liposomes.....	176
Figure 117 : Purification et détermination de l'oligomérisation de la protéine Alix ΔPRD attachée à la membrane des liposomes.....	177
Figure 118 : Modélisation de la structure dimérique de la protéine Alix Bro-V en interaction avec un homologue de CHMP4.....	189
Figure 119 : Comparaison des modélisations de la structure de la protéine Alix Bro-V dimérique et de la structure ESCRT-II en interaction avec un homologue de CHMP4.....	190
Tableau 1 : Résumé des interactions entre Alix et ses partenaires (Adapté de Odorizzi, 2006).....	26
Tableau 1 : Composants de la machinerie ESCRT.....	59
Tableau 3 : Statistiques des données de diffraction et d'affinement de la structure du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79.....	125
Tableau 4 : Comparaison des masses moléculaires théoriques des protéines Alix ΔPRD, du nanocorps 96 et du complexe Alix ΔPRD/NB96 avec les masses obtenues en spectrométrie de masse.....	145
Tableau 5 : Étude de l'oligomérisation de la protéine Alg2 <sub>3-des23</sub> par ultracentrifugation analytique.....	150
Tableau 6 : Comparaison des masses moléculaires théoriques des protéines Alix FL, Alg-2 <sub>3-des23</sub> et du complexe Alix FL/Alg-2 <sub>3-des23</sub> et des masses obtenues en spectrométrie de masse.....	156



# Résumé

Les membranes cellulaires sont des entités hautement dynamiques qui subissent au cours du temps, des processus continus de remodelage, notamment de fusion, de bourgeonnement ou de fission. Il a été démontré depuis quelques années que ces processus de remodelage des membranes, incluant entre autres, la formation de vésicules intraluminales, la formation d'endosomes, le bourgeonnement viral, la cytokinèse, la réparation membranaire, l'apoptose des neurones, la formation des pores nucléaires et la réparation de l'enveloppe nucléaire, sont médiés par les composants d'une machine multiprotéique connue sous le nom d'ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Alix (Alg-2 interacting protein-X) est une protéine accessoire cytosolique qui interagit avec les complexes ESCRT-I et ESCRT-III. Alix est composé d'un domaine Bro1 N-terminal lié à un domaine central en double hélice en forme de V et d'un domaine C-terminal riche en proline. Notre laboratoire et d'autres équipes ont montré qu'Alix est capable de dimériser via son domaine V central, fonction nécessaire entre autres pour le bourgeonnement du VIH-1. Bien que des structures monomériques cristallographiques des domaines V et Bro-1 aient été résolues, aucune information structurale à haute résolution n'est disponible à ce jour, pour la forme dimérique de la protéine Alix. Nous avons résolu ici la structure du domaine V dimérique. Des études de mutagenèse combinées à des analyses SAXS démontrent la flexibilité conformationnelle de la protéine Alix. Afin de comprendre le mécanisme moléculaire qui conduit à la dimérisation, nous avons commencé des travaux structuraux sur la protéine entière en complexe avec son partenaire Alg2, un activateur potentiel, par microscopie électronique. De plus, nous avons observé, par microscopie électronique, analyse de la distribution de la taille des liposomes au nanosight et des tests de fluorescence, que la protéine Alix interagit avec les membranes d'une manière pH-dépendante ce qui conduit à la fusion des liposomes *in vitro*. Cette nouvelle activité d'Alix pourrait être liée au processus de fusion des exosomes. Ensemble, nos travaux fournissent un premier aperçu du mécanisme structural et fonctionnel de la dimérisation de la protéine Alix.



# Abstract

Cellular membranes are highly dynamic entities that undergo continuous remodeling including fusion, budding or fission events. Many membrane remodeling processes are catalyzed by the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), which include multivesicular endosomes formation, cytokinesis, nuclear envelope reformation, membrane repair, autophagy, exosome biogenesis, neuronal pruning, dendritic spine maintenance, enveloped virus budding, release of peroxisomes and of recycling endosomes. Alix (ALG-2 interacting protein-X) is a cytosolic protein that interacts with the ESCRT-1 and ESCRT-III complexes exerting important adaptor functions. Alix is composed of an N-terminal Bro1 domain linked to a central V-shaped coiled-coil domain and a C-terminal proline-rich domain. Alix has been shown to dimerize via its central V-domain, a function necessary for HIV-1 budding. Although structures of the monomeric V-domain and of the Bro-V domain have been solved no high-resolution structural information is available on dimeric Alix.

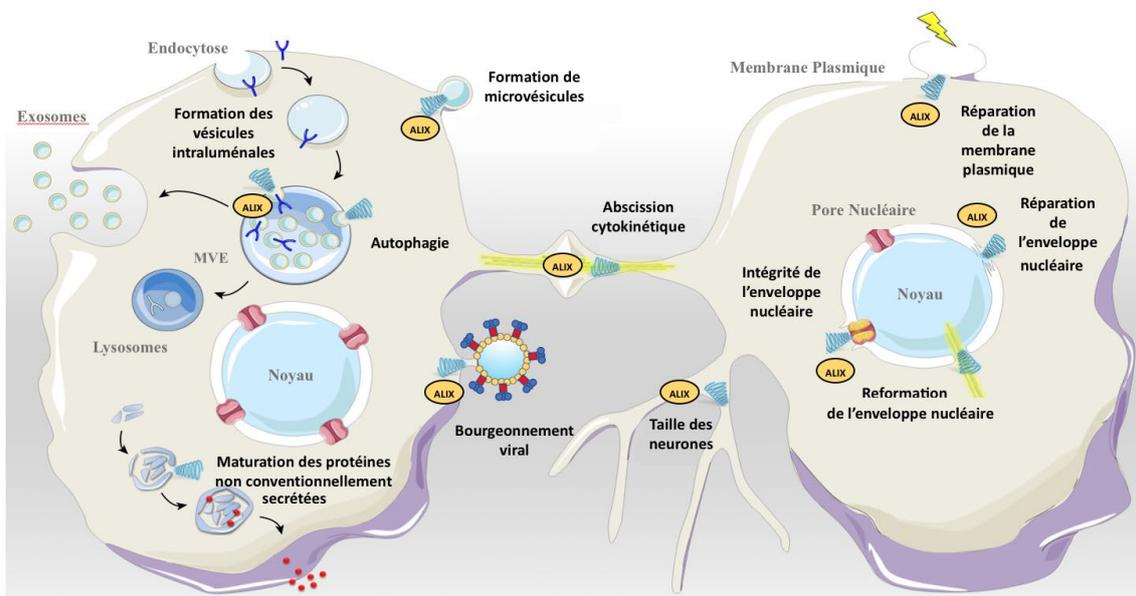
Here we solved the structure of the dimeric V domain. The crystal structure reveals that dimerization is achieved by domain exchange. Structure-based mutagenesis studies combined with SAXS analyses further demonstrate the conformational flexibility of Alix. In order to understand the molecular mechanism that leads to dimerization we started structural work on full-length Alix in complex with Alg2 a potential activator of Alix by electron microscopy. Furthermore, we observed *in vitro* that Alix interacts with membranes in a pH-dependent manner that leads to the fusion of liposomes *in vitro*. This novel activity of Alix may be linked to the fusion of exosomes required for cargo delivery. Together, our work provides first insight into the structural and functional mechanism of Alix dimerization.



# **Introduction**



Les membranes cellulaires sont des entités hautement dynamiques. Elles subissent au cours du temps, des processus continus de remodelage, de fusion, de bourgeonnement ou de fission. Il a été démontré depuis quelques années que ces processus de remodelage, incluant entre autres, la formation de vésicules intraluminales (ILV) (Larios et al., 2020), la formation d'endosomes (MVE), le bourgeonnement viral (Weissenhorn and Göttinger, 2011), la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007), la réparation membranaire (Jimenez et al., 2014), l'apoptose des neurones (Loncle et al., 2015), la formation des pores nucléaires, la réparation de l'enveloppe nucléaire (Olmos and Carlton, 2016), sont médiés par les composants d'une machine multiprotéique connue sous le nom d'ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) associée à la protéine accessoire Alix (Figure1).



**Figure 1 : Processus cellulaires contrôlés par la machinerie ESCRT et la protéine Alix** (Adapté de Christ et al., 2017) Aperçu des fonctions de la machinerie ESCRT (représentée avec une spirale bleue) et la protéine Alix (notée en jaune).

Alix (Alg-2 Interacting Protein X) ou AIP1 (Apoptosis Interacting Protein 1) est une protéine cytosolique initialement décrite comme un partenaire de la protéine Alg-2 (Apoptosis linked gene 2) (Missotten et al., 1999 ; Vito et al., 1999). Cette protéine ubiquitaire est très conservée chez les mammifères, ce qui a permis, grâce à de nombreux travaux, d'identifier ses multiples partenaires et de mettre en évidence son rôle dans différents processus cellulaires de remodelage de la membrane. Alix est une protéine présente sous plusieurs formes oligomériques (monomère, dimère, multimère). Bien que des structures cristallographiques de la protéine Alix monomérique humaine aient été obtenues (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007), à ce jour, le processus d'oligomérisation et

les mécanismes moléculaires par lesquels Alix assure ses fonctions sont encore largement inexpliqués. Dès lors, Alix reste une protéine attractive à étudier.

Ce premier chapitre aura à la fois, pour but de donner un aperçu des processus cellulaires dans lesquels elle a été impliquée, et à la fois, de décrire les mécanismes moléculaires par lesquels ses fonctions sont régulées.

## I. La protéine Alix

### A. Organisation de la protéine Alix

Alix est une protéine cytosolique de 868 acides aminés. Elle est organisée en 3 domaines distincts : Le domaine Bro-1 N-terminal (360 résidus), le domaine V dans la partie centrale (résidus 360-702). Enfin le domaine riche en proline C-terminal PRD (Prolin Rich Domain) qui connecte la protéine Alix dans différents processus cellulaires (Figure 2).

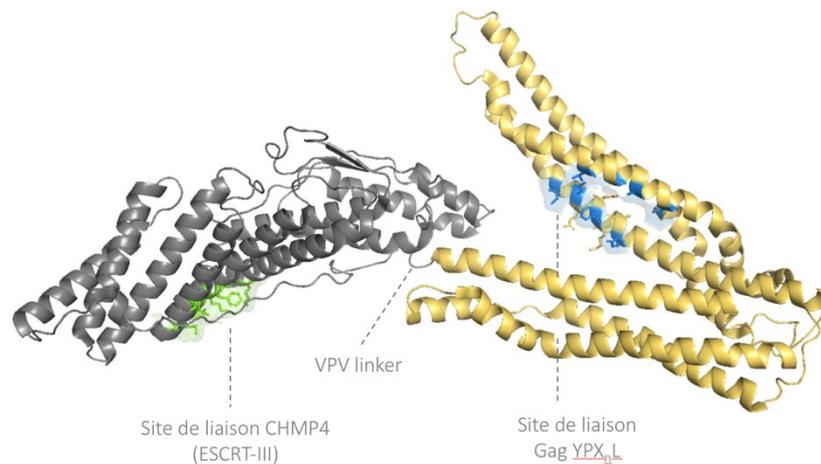


Figure 2 : Représentation schématique des trois domaines de la protéine Alix humaine

#### 1. Le domaine Bro-1 N-terminal

Le domaine Bro-1 comprend les résidus 1 à 360. Il est composé de 3 hélices en épingle, longues d'environ 50 résidus, dans lesquelles sont logées deux poches hydrophobes (Fisher et al., 2007) (Figure 3). La première poche hydrophobe située autour de l'acide aminé Ile<sub>212</sub> (Figure 3 : poche représentée en vert) permet l'interaction avec la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III (Katoh et al., 2003 ; Kim et al., 2005). La mutation Ile<sub>212</sub>Asp inhibe l'interaction avec la protéine CHMP4A ainsi que la capacité de la protéine Alix à soutenir le relargage du VIH-1. Dès lors, il apparait qu'un des rôles de la protéine Alix dans le bourgeonnement viral consisterait, entre autres, à recruter la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III. La deuxième poche hydrophobe située autour de l'acide aminé Tyr<sub>319</sub> permet, quant à elle, l'interaction avec le domaine SH2 de la kinase Src. En effet, lorsque la tyrosine Tyr<sub>319</sub> est phosphorylée, Src est recrutée et provoque à son tour la phosphorylation d'Alix (Schmidt et al., 2005). D'autre part, la tyrosine Tyr<sub>527</sub>

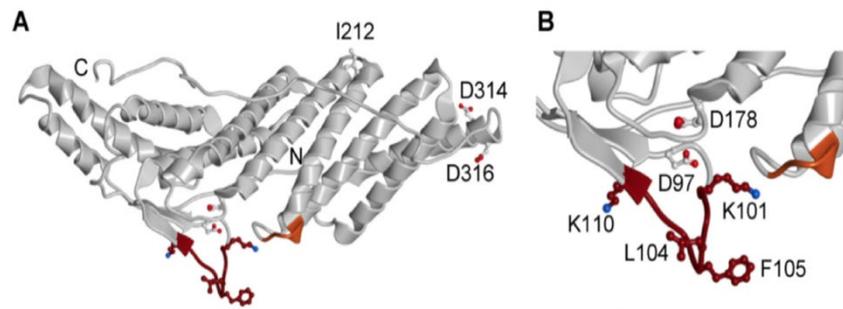
peut lier le domaine SH3 de Src, ayant pour effet l'hyperphosphorylation de plusieurs tyrosines en positions C-terminale (Schmidt et al., 2005). Il a été proposé que cette hyperphosphorylation permettrait de moduler l'activité de liaison d'Alix avec ses partenaires et provoquer l'endocytose de récepteurs à facteur de croissance (Schmidt et al., 2004).



**Figure 3 : Structure cristallographique des domaines Bro-1 et V de la protéine Alix humaine (PDB 2OEV).**

Les poches hydrophobes permettant la fixation de CHMP4 et les protéines Gag<sup>P6</sup> et Gag<sup>P9</sup> virales sont représentées en vert et en bleu respectivement. Le tripeptide de liaison entre les deux domaines Bro-1 et V est noté VPV. Le domaine Bro-1 est noté en gris. Le domaine V central est noté en jaune (Adapté de Fisher et al., 2009)

Le domaine Bro-1 est connecté au domaine central V par un tripeptide hydrophobe <sup>359</sup>VPV<sub>361</sub> (Figure 3). Ce tripeptide n'établit que des contacts limités et non covalents ce qui pourrait permettre aux différents domaines de changer leurs orientations relatives en réponse à des facteurs environnementaux. Ce tripeptide ainsi que la région charnière située entre les deux bras du domaine central V concède une large flexibilité à la molécule. Le domaine Bro-1 permet également, via les résidus hydrophobes Lys<sub>104</sub> et Phe<sub>105</sub> situés à l'extrémité de la boucle flexible (Figure 4), de lier le lipide endosomal LBPA et favorise ainsi son interaction avec les membranes endosomales (Bissig et al., 2013 ; Matsuo et al., 2004). En 2011, Sette et Zhai amènent l'idée que l'association de la protéine Alix avec la membrane implique à la fois des interactions électrostatiques et hydrophobes mais nécessite aussi une liaison au calcium sur les acides aminés Asp<sub>97</sub> et Asp<sub>178</sub>. Le calcium, en se liant près de la boucle d'interaction au LBPA, induit un changement conformationnel de la boucle flexible ce qui est favorable à l'interaction membranaire. Ainsi, il est proposé qu'Alix est recruté sur les endosomes via le LBPA, où il peut alors engager les complexes ESCRT-I et ESCRT-III, et ainsi réguler la libération des nucléocapsides virales.

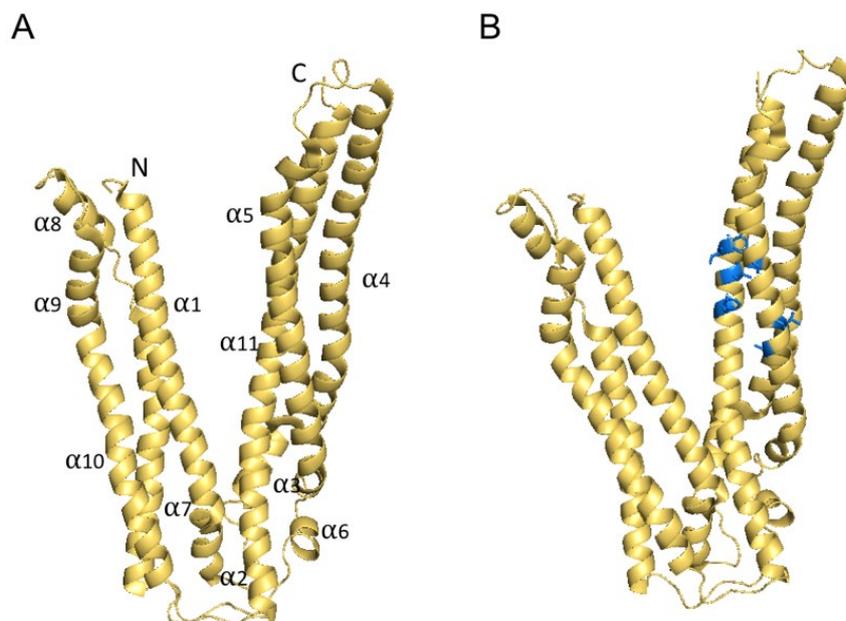


**Figure 4 : Sites d'interactions membranaire du domaine Bro-1 de la protéine Alix (Bissig et al., 2013)**  
 Modèle de structure cristalline PDB 2R03 (Zhai et al., 2008).  
**(A)** Les résidus d'interaction membranaire prévus par le logiciel MODA sont représentés en rouge et orange. **(B)** Vue à fort grossissement de la zone d'interaction de la membrane.

Enfin, Alix a également la capacité de lier la F-actine via son domaine Bro-1, ce qui connecte Alix avec le processus de régulation de l'assemblage du cytosquelette d'actine dans les fibroblastes de mammifères (Pan et al., 2006).

## 2. Le domaine V central

Le domaine V central, compris entre les acides aminés 360 et 702, est composé de deux bras de 3 hélices chacun. Les deux bras se replient sur eux-mêmes avec un angle de 30° par l'intermédiaire d'une région charnière. Ils sont principalement stabilisés par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales (Figure 5).



**Figure 5 : Structure cristallographique du domaine V de la protéine Alix (Lee et al., 2007)**  
 A. Structure cristalline PDB 2OJQ B. La poche hydrophobe permettant la fixation des protéines virales Gag<sup>P6</sup> et Gag<sup>P9</sup> est représentée en bleu.

Le domaine V présente une flexibilité conformationnelle intrinsèque, qui a été révélée par des comparaisons des positions des deux bras dans les différentes structures cristallines. Les différences visibles dans les structures découlent plutôt de petits changements dans les interactions inter hélices le long des deux bras plutôt que d'une réorganisation drastique de la région. Cependant la signification biologique de cette flexibilité reste à élucider. Au centre du deuxième bras, une poche hydrophobe centrée sur la Phe<sub>676</sub>, (Figure 5.B poche bleue) a été identifiée comme étant le site de liaison aux protéines Gag des virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et de l'EIAV (Equine Infectious Anemia Virus)(Strack et al., 2003). En effet, Alix est capable de lier les motifs YPXL des protéines Gag<sup>P6</sup> du VIH-1 et Gag<sup>P9</sup> de l'EIAV avec des constantes de dissociation respectives de 59 mM et 1,2 mM. Enfin, Alix interagit, toujours au niveau de cette poche hydrophobe, avec les motifs YPXL des synténines, protéines cytosoliques capables d'interagir avec les syndécans, protéoglycanes transmembranaires. Le complexe tripartite Alix - synténine - syndécane a été impliqué dans le processus de formation des exosomes (Baietti et al., 2012).

### 3. Le domaine PRD C-terminal

Enfin, le domaine PRD (Prolin Rich Domain) dont la structure n'a jamais pu être résolue, est composé des 166 derniers acides aminés. Il est enrichi en prolines et en tyrosines et présente de nombreux motifs de liaisons. Ce domaine lie la grande majorité des partenaires d'Alix ce qui connecte la protéine à un grand nombre de processus cellulaires. En effet, ce domaine PRD est composé notamment de plusieurs motifs permettant la liaison d'Alix avec les domaines SH3 de la protéine CIN-85 (Cbl-interacting protein of 85kDa) (Chen et al., 2000), des endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002), ainsi qu'un motif permettant l'interaction avec la protéine Tsg-101 (Tumor susceptibility gene 101) (Strack et al., 2003) et des motifs pour l'interaction avec l'ubiquitine ligase Nedd-4 et enfin Alg-2 (Chatellard-Causse et al., 2002; Chen et al., 2000; Morita et al., 2007 ; Shibata, 2004 ; Strack et al., 2003)

#### B. Partenaires et fonctions de la protéine Alix

Avant de présenter plus précisément les processus cellulaires dans lesquels la protéine Alix a été mise en évidence, voici un récapitulatif de ses différents partenaires, référencés dans la littérature selon leur localisation sur les trois domaines présentés précédemment (Tableau 1).

	Partenaires	Motifs de liaisons	Processus cellulaires
BRO-1	CHMP4 (ESCRT-III)	I <sub>212</sub>	Cytokinèse, bourgeonnement viral
	LBPA	L <sub>104</sub> P <sub>105</sub> et Q <sub>97</sub> Q <sub>178</sub>	Back fusion des ILVs
	Src - Domaine SH2	Phospho Y <sub>319</sub>	Adhésion cellulaire, endocytose des récepteurs de facteurs de croissance
	Actine	Région 1-167	Adhésion cellulaire
	Cortactine	Région 167-436	Adhésion cellulaire
V	α actinine	Région 436-605	Adhésion cellulaire
	GAG <sup>p6 p9</sup>	F <sub>676</sub>	Bourgeonnement viral
	Syntenine	F <sub>676</sub>	Régulation des exosomes
PRD	TSG101 (ESCRT-I)	717PSAP <sub>720</sub>	Cytokinèse, bourgeonnement viral
	CIN85 ou SETA	740PTPAPR <sub>745</sub>	Endocytose des récepteurs de facteurs de croissance, apoptose
	Endophilines	755PARPPP <sub>761</sub>	Endocytose des récepteurs de facteurs de croissance
	ALG-2	802PGY <sub>813</sub> répétition	Apoptose
	CEP55	800GPP <sub>802</sub>	Cytokinèse
	Src - Domaine SH3	752PQPPAR <sub>761</sub>	Adhésion cellulaire, endocytose des récepteurs de facteurs de croissance
	Ubiquitine ligase Nedd-4.	723PPXY <sub>726</sub> 835PPXY <sub>838</sub>	

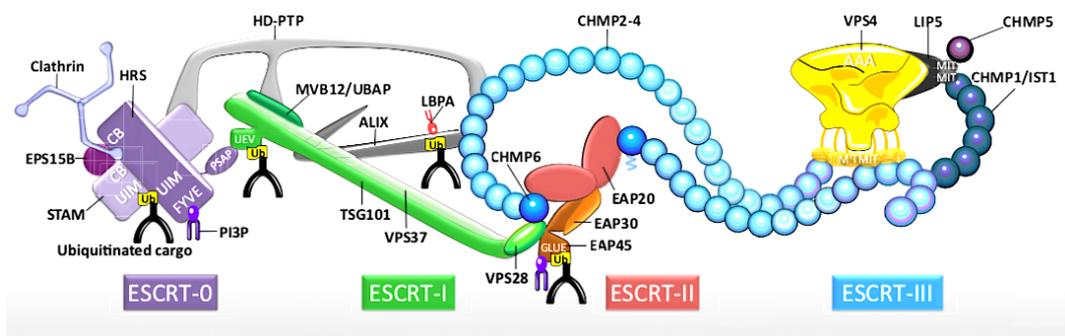
**Tableau 1 : Résumé des interactions entre Alix et ses partenaires (Adapté de Odorizzi, 2006)**

## 1. Formation des vésicules intraluminales (VIL)

La voie endocytaire assure l'homéostasie cellulaire et contrôle plusieurs processus tels que la communication intercellulaire, la signalisation et la dégradation des protéines transmembranaires et des protéines mal repliées. Lors de l'endocytose, les vésicules contenant le cargo transmembranaire sont dirigées vers les endosomes précoces aussi appelés endosomes de tri car ils sont à l'interface des voies de recyclage et des voies de dégradation. A partir de là, les molécules transmembranaires endocytées devant être recyclées à la membrane plasmique sont adressées aux endosomes de recyclage (RE). Et celles qui sont destinées à la dégradation sont adressées à des compartiments tardifs de la voie endocytaire : les corps multivésiculaires, les endosomes tardifs et les lysosomes. Le signal de tri permettant d'adresser les molécules vers les endosomes de recyclage ou vers la voie de dégradation est l'ubiquitine puisque seuls les récepteurs de surface ubiquitinylés sont triés et incorporés dans les vésicules intraluminales (VIL) générant ainsi des endosomes multivésiculaires (MVE). Les endosomes multivésiculaires fusionnent alors avec les lysosomes et leur contenu est dégradé par les hydrolases lysosomales (Gruenberg and Stenmark, 2004).

La machinerie ESCRT a été caractérisée pour la première fois chez la levure, en raison de son rôle essentiel dans cette formation de vésicules intraluminales (Henne et al., 2011), dans la genèse des endosomes multivésiculaires (MVE) ainsi que dans le tri des récepteurs ubiquitinylés. Il a été montré que l'activité endosomale de la machinerie ESCRT est déclenchée par la liaison de la protéine HRS du complexe ESCRT-0, à la fois au cargo ubiquitinylé, via son domaine DIUM et au niveau du lipide endosomal : phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) par son domaine FYVE (domaine en doigt de zinc) (Misra and Hurley, 1999; Raiborg et al., 2001)(Figure 6). La partie C-terminale de la protéine HRS est capable d'interagir avec la chaîne lourde de la clathrine. Cette interaction permet à la fois le recrutement de la clathrine au niveau des endosomes précoces (Raiborg et al., 2002) et la séquestration de la sous unité HRS avec son cargo dans des microdomaines membranaires spécifiques. Une fois les cargos rassemblés, la protéine HRS du complexe ESCRT-0 peut se lier, via son motif PSAP, au domaine N-terminal UEV (Ubiquitin E2 Variant) de la protéine Tgs101 du complexe ESCRT-I (Bache et al., 2003; Pornillos et al., 2003). Le domaine UEV de la protéine Tgs101 a été impliqué dans deux interactions distinctes. A savoir, une interaction avec le motif PTAP de la protéine virale

Gag<sup>p6</sup> du VIH-1 qui connecte la protéine Tsg101 directement aux sites du bourgeonnement des virus enveloppés (Pornillos et al., 2002). Et une interaction avec l'ubiquitine, interaction nécessaire dans la sélection des protéines qui seront dirigées vers les VIL et par la suite vers la dégradation qui connecte directement la protéine Tsg101 dans la voie des corps multivésiculaires (MVE) (Sundquist et al., 2004). Le complexe ESCRT-I peut alors à son tour recruter le complexe ESCRT-II en forme de Y (Figure 6). Les deux sous-unités EAP20 du complexe ESCRT-II interagissent et permettent, à leur tour, le recrutement de la protéine CHMP6 du complexe ESCRT-III. Le complexe de nucléation induisant la polymérisation des filaments ESCRT-III, composés principalement des protéines CHMP4, CHMP2 et CHMP3, se produit par le biais d'interactions entre Vps28 (ESCRT-I) et la protéine CHMP6 (ESCRT-III). Les filaments ESCRT-III peuvent alors interagir avec la membrane endosomale et ainsi initier la formation de la vésicule.



**Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage séquentiel des complexes ESCRT**

Le complexe ESCRT-0 lie les protéines ubiquitinylées et le phosphatidylinositol-3-phosphate puis recrute le complexe ESCRT-I qui, à son tour, recrute le complexe ESCRT-II. Le complexe ESCRT-II permet le recrutement de la protéine CHMP6 du complexe ESCRT-III. Tandis que la protéine Alix recrute la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III initiant ainsi la polymérisation des filaments ESCRT-III et la déformation de la membrane. (Adapté de Christ 2017)

Les preuves reliant la protéine Alix à la formation de ces vésicules proviennent d'observations des processus de dégradation de récepteurs. En 2012, Dores et ses collaborateurs montrent que le tri du récepteur PAR1, un récepteur de la thrombine couplé aux protéines G vers les VIL peut se faire indépendamment de l'ubiquitine. Dans cette voie, Alix, via son domaine central V, lie le motif YPXXXL du récepteur PAR-1 et permet le recrutement de CHMP4 (ESCRT III) ce qui conduit à la formation de la vésicule intraluménale et à la dégradation du récepteur (Dores et al., 2015). Le bourgeonnement des vésicules intraluminales (VIL) dans les endosomes nécessite la scission de la membrane par le complexe ESCRT-III. Chez la levure, cette étape est régulée négativement

par Doa4, une ubiquitine hydrolase qui déubiquitine les protéines transmembranaires triées comme « cargo » dans les VIL. En effet, la liaison de Doa4 à Snf7 (CHMP4) du complexe ESCRT-III inhibe le remodelage des polymères Snf7 nécessaires à la réaction de scission de la membrane des VIL. Cette liaison est antagonisée *in vivo* par Vps20 (CHMP6) du complexe ESCRT-III. Il a été montré que la protéine Bro1 (homologue de la protéine Alix) en se liant directement à Vps20 a un rôle central dans la suppression de la relation antagoniste que Vps20 a envers Doa4 (Buysse et al., 2022).

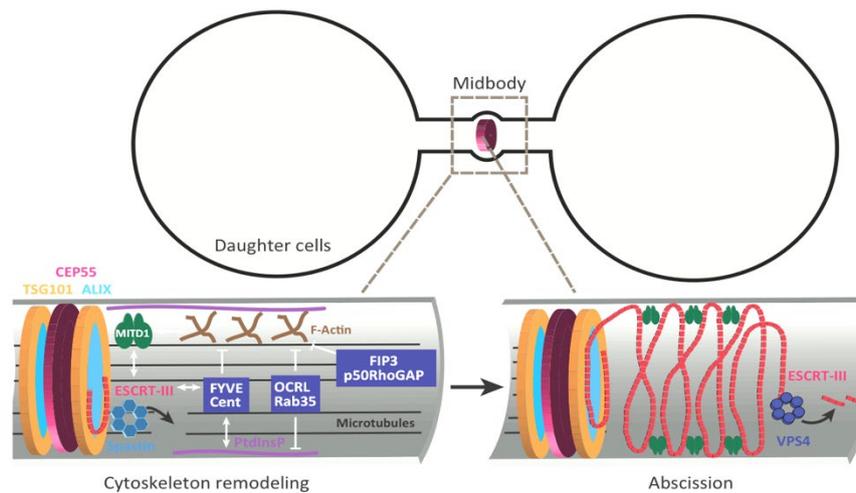
Des travaux antérieurs d'invalidation de la protéine Alix avaient montré un effet mineur sur l'inhibition de la dégradation du récepteur à l'EGF dans les lignées cellulaires de mammifères, ce qui suggérait que la protéine Alix n'est pas impliquée dans le tri des récepteurs membranaires ubiquitinylés (Schmidt et al., 2004 ; Cabezas, 2005). En 2015, Sun et ses collaborateurs montrent que la protéine Alix interagit directement avec le récepteur à l'EGF ubiquitinylé et joue un rôle essentiel dans sa dégradation (Sun et al., 2015). Tous ces résultats placent directement la protéine Alix au cœur du processus de formations des VIL.

## **2. La cytokinèse**

L'étape de cytokinèse est définie comme l'étape de la mitose où la cellule mère va se séparer en deux cellules filles. Elle se caractérise par la formation d'un anneau contractile, puis d'un sillon de division, suivi enfin de la formation du corps intermédiaire, ou « midbody ». Au cours de la cytokinèse des cellules animales, la contraction de l'anneau d'actomyosine sépare le cytoplasme, entraînant la formation d'un pont intercellulaire reliant les deux futures cellules filles. Ce pont intercellulaire est composé majoritairement d'un faisceau de microtubules, avec en son centre, une zone dense appelée le corps intermédiaire constituée de nombreuses protéines associées aux microtubules. Les protéines du complexe ESCRT-III et la protéine Alix sont au cœur du processus final de la cytokinèse qui fait intervenir un remodelage de la membrane plasmique pour aboutir à la scission des deux cellules (Carlton and Martin-Serrano, 2007 ; Morita et al., 2010 ; Schöneberg et al., 2017).

Dans les cellules de mammifères, au fur et à mesure que la cytokinèse progresse, la protéine adaptatrice centrosomale CEP55 (Centrosomal Protein 55) est recrutée au milieu de l'anneau par le complexe du fuseau central (Zhao et al., 2006) composé de la

kinésine mitotique MKLP1 et de la protéine d'activation, la GTPase MgcRacGAP (Mishima et al., 2002). Dès lors, CEP55 initie l'abscission en recrutant par leurs domaines riches en proline, les acteurs de la machinerie ESCRT : Tsg101 (ESCRT-I) et la protéine Alix (Morita et al., 2010) (Lee et al., 2008) (Figure 7). Ces deux acteurs permettent le recrutement des protéines CHMP4B (Carlton et al., 2008), CHMP6 et CHMP2A du complexe ESCRT-III qui seront responsables de la scission de la membrane au niveau du pont intercellulaire (Schöneberg et al., 2017). Guizetti et ses collaborateurs sont parvenus à reconstruire, à partir d'images de tomographie, un réseau de filaments transversaux de 17 nm distinct du réseau de microtubules, à un stade tardif de l'abscission qu'ils attribuent à la polymérisation de CHMP2A du complexe ESCRT-III (Guizetti et al., 2011). En effet, la déplétion de CHMP2A par ARN interférence, inhibe la formation de ces structures. Des expériences de time lapse montrent que l'action de VpS4 et de CHMP4B est nécessaire à l'abscission des cellules (Morita et al., 2010).



**Figure 7 : Aperçu des acteurs cellulaires impliqués pendant le processus de scission de la cytokinèse** (Agromayor and Martin-Serrano, 2013 review)

Cependant, une observation de longue date indique que ce modèle ne peut pas être universel. En effet, il n'existe pas d'homologue de CEP55 chez les organismes non vertébrés, y compris chez la drosophile. Pourtant, il a été montré que la protéine Alix et la protéine Shrub du complexe ESCRT-III (CHMP4) fonctionnent ensemble pour contrôler l'abscission cytokinétique des lignées germinales de drosophile. (Matias et al., 2015)(Eikenes et al., 2015). En 2019, une étude de Lie-Jensen fournit une explication moléculaire de la façon dont la machinerie ESCRT et la protéine Alix sont recrutées au niveau du corps intermédiaire en l'absence de CEP55 dans les cellules de drosophile (Lie-

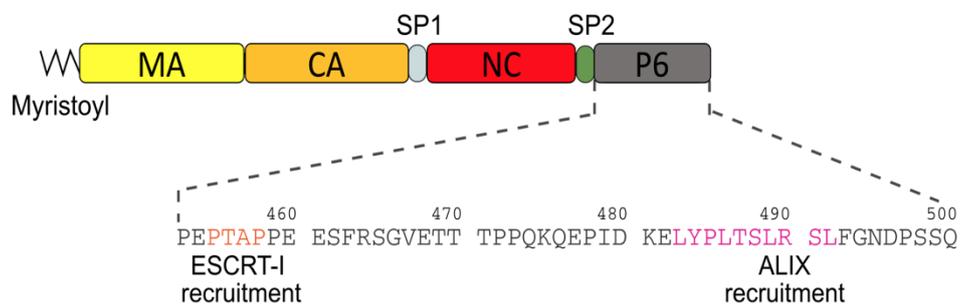
Jensen et al., 2019). Par des essais d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse, ils ont identifié deux protéines analogues au complexe du fuseau central, Pavarotti et RacGAP50C comme partenaires d'Alix. Des expériences *in vitro* ont révélé que cette interaction implique le patch hydrophobe du domaine V de la protéine Alix, responsable de l'interaction avec les motifs LYPL des protéines virales Gag<sup>p6</sup> du VIH et Gag<sup>p9</sup> de l'EIAV (Strack et al., 2003) et que cette interaction est essentielle pour le recrutement d'Alix au niveau du corps intermédiaire. En effet, les mutations perturbant l'interaction d'Alix avec Pavarotti, que ce soit dans le motif LxxLF de Pavarotti ou dans le domaine V d'Alix, empêchent le recrutement d'Alix au niveau du corps intermédiaire. Il est important de noter que la déplétion de Pavarotti ou d'Alix altère la localisation de la protéine Shrub (CHMP4) du complexe ESCRT-III au niveau du corps intermédiaire, ce qui explique que l'interaction Pavarotti-Alix est essentielle pour une abscission cytokinétique correcte.

Maintenant, regardons de plus près la régulation de la cytokinèse. Dans les cellules de mammifères, la phosphorylation de CEP55 sur l'acide aminé S436 par la sérine/thréonine kinases PLK1 (Polo Like Kinase 1) empêche son interaction avec la protéine MKLP1 (mitotic kinesin-like protein 1) du complexe de fuseau central et garantit que CEP55 et le complexe ESCRT-III ne soient pas recrutés prématurément sur le fuseau central, ce qui serait préjudiciable à cytokinèse (Bastos and Barr, 2010). Dans les cellules de drosophile, dépourvues de CEP55, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la régulation serait mise en place par la phosphorylation de la protéine Alix et/ou Pavarotti peut-être par PLK1 ou par d'autres kinases mitotiques.

### **3. Le bourgeonnement viral**

Les virus enveloppés s'assemblent et bourgeonnent généralement au niveau de la membrane plasmique. La topologie du bourgeonnement viral diffère des processus de vésiculation cellulaire connus tels que l'endocytose. En effet, pour l'endocytose, la déformation de la membrane plasmique se fait de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur, alors que le bourgeonnement viral implique un bourgeonnement de la membrane vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, les facteurs qui catalysent la fission des membranes des virus en bourgeonnement doivent agir à l'intérieur du cou du bourgeon. La seule machinerie cellulaire connue pour effectuer de tels événements de fission membranaire, communément appelé de "topologie inverse" est la machinerie ESCRT. Pour mettre en

évidence l'implication de la machinerie ESCRT et de la protéine Alix lors du bourgeonnement viral, je prendrais l'exemple du bourgeonnement du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1. Le VIH découvert au début des années 80, appartient à la famille des rétrovirus et au genre des lentivirus. Il possède un génome d'ARN simple brin encapsidé à l'intérieur d'une structure lipoprotéique qui forme le virion. Le génome du VIH est composé entre autres de trois principaux gènes *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour les protéines Gag, la polymérase et la protéine d'enveloppe du virion. La protéine Gag est constituée de quatre domaines reliés par des peptides de liaison : matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), et p6 (Figure 8).



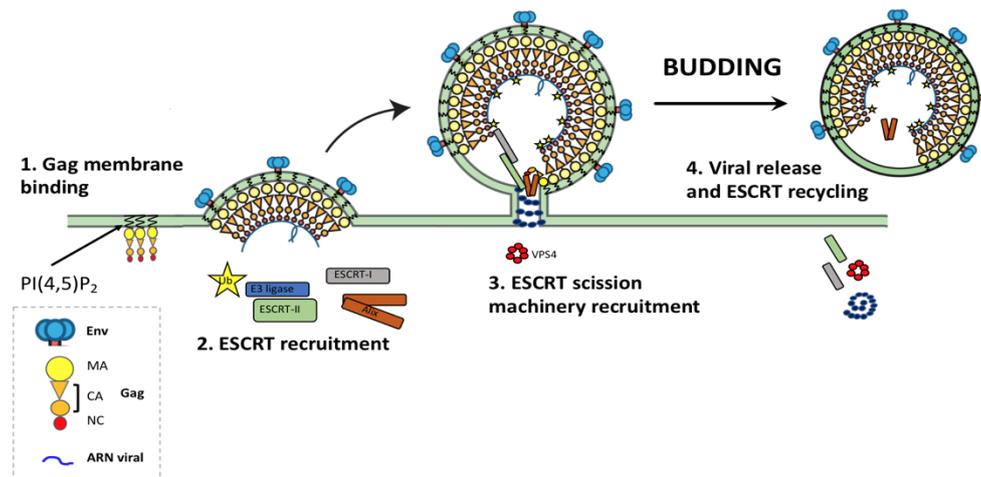
**Figure 8 : Organisation structurale de la protéine Gag (Zhang et al., 2014)**

MA : matrice ; CA : capside ; NC : nucléocapside ; SP : peptide de liaison

- Le domaine N-terminal de la protéine Gag est appelé MA, il sert de site de liaison à la membrane plasmique et permet de recruter la protéine d'enveloppe virale.
- Le domaine central est appelé CA, il sert aux interactions protéine-protéine nécessaires à l'assemblage des virions immatures et à la formation de la capside virale mature.
- Le domaine NC contient deux motifs en doigt de zinc. Il incorpore le génome viral dans la capside et contribue à la polymérisation de la protéine Gag.
- le domaine C-terminal de la protéine Gag<sup>p6</sup> contient plusieurs sites de liaison dont deux motifs appelés domaines d'assemblage tardif. Ces domaines d'assemblage tardif permettent la liaison et le recrutement des protéines de la cellule hôte: Tsg101(ESCRT-I) et Alix.

Le cycle répliatif du VIH-1 se déroule en deux parties : les étapes précoces et les étapes tardive qui nécessitent à la fois des protéines virales et les protéines ESCRT de la cellule hôte. L'assemblage des virions du VIH-1 se produit au niveau de la membrane plasmique, au sein de microdomaines membranaires spécialisés. La protéine de matrice

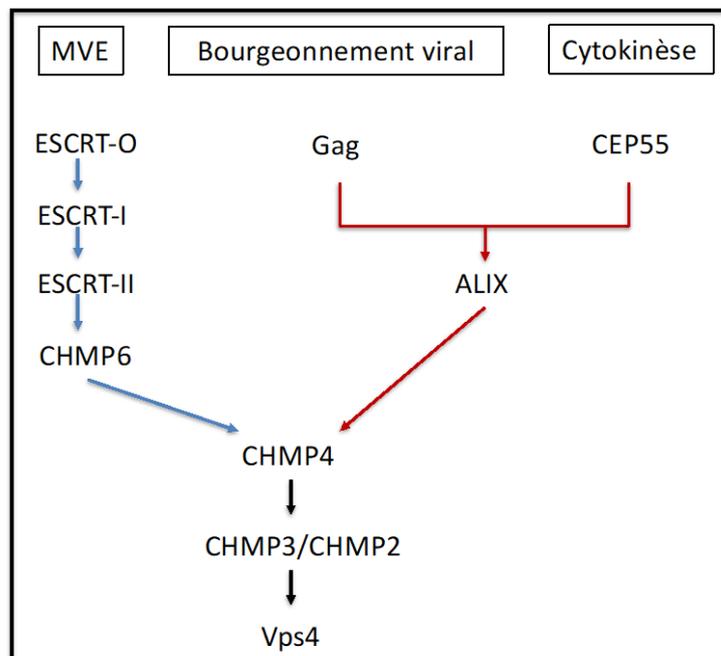
MA de la protéine Gag se lie au phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate (PI (4,5) P<sub>2</sub>) de la membrane plasmique. Dès lors, l'assemblage du virion peut commencer (Figure 9). Les protéines Gag fixent l'ARN viral et s'assemblent en un virion sphérique. Il est intéressant de noter que la polyprotéine Gag intacte est suffisante pour l'assemblage et le bourgeonnement de particules virales (Viral Like Particules) à la membrane plasmique en l'absence d'autres composants viraux.



**Figure 9 : Collaboration entre la machinerie ESCRT et la protéine Gag pendant la formation et le bourgeonnement des virons du VIH-1**  
(Adapté de Hurley and Cada, 2018; Sundquist and Krausslich, 2012)

Il est établi depuis déjà plusieurs années, que le bourgeonnement des particules virales du VIH-1 est initié par l'oligomérisation de la protéine Gag et que l'étape de fission membranaire nécessaire à la libération du virion est médiée par les facteurs de la machinerie ESCRT. En effet, en l'absence de recrutement de la machinerie ESCRT, l'assemblage du virus s'arrête généralement à un stade tardif où l'enveloppe virale Gag entièrement assemblée, reste connectée à la membrane plasmique par une fine "tige" de membrane (Göttlinger et al., 1991). Le recrutement de la machinerie ESCRT est possible grâce à la présence, sur la protéine Gag<sup>P6</sup>, de deux domaines d'assemblage tardif. Le premier motif d'assemblage tardif P(T/S) AP se lie directement au domaine UEV (ubiquitin E2 variant) de Tsg101 du complexe ESCRT-I, permettant ainsi le recrutement du complexe hétérotétramérique ESCRT-I (Demirov et al., 2002 ; Martin-Serrano et al., 2001). Le deuxième motif d'assemblage tardif YPXL permet le recrutement de la protéine Alix, via son domaine V central (Fisher et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Strack et al., 2003 ; Usami et al., 2007 ; Zhai et al., 2008). Il existe d'autre part, un deuxième site de liaison à la

protéine Alix. En effet, il a été montré que la protéine Gag<sup>NC</sup> contient, elle aussi, un site de liaison au domaine Bro-1 de la protéine Alix et que des mutants NC peuvent présenter des défauts de bourgeonnement (Popov et al., 2008 ; Dussupt et al., 2009). Pendant des années, il a été soutenu que la déformation de la membrane, au niveau des sites de bourgeonnement du VIH-1, n'était réalisée efficacement que par la combinaison des deux complexes ESCRT-I et -II (Hurley and Hanson, 2010). Cependant, il est devenu courant de penser que, à la différence du processus de formation des corps multivésiculés, le complexe ESCRT-II et la protéine CHMP6 (ESCRT-III) ne sont pas indispensables ni dans ce bourgeonnement (Carlson and Hurley, 2012) ni pour l'abscission cytokinétique (Christ et al., 2016). L'hypothèse émise est donc que la protéine Alix jouerait à la fois le rôle d'ESCRT-II et de CHMP6 lors de ces deux processus cellulaires (Figure 10).



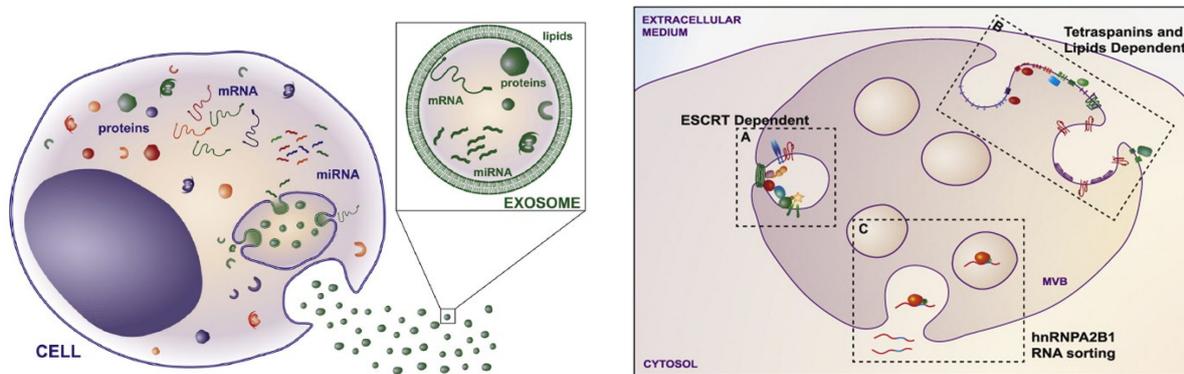
**Figure 10 : Organisation schématique des deux branches utilisées par la machinerie ESCRT**

La genèse des corps multivésiculés (MVE) constitue la première branche qui utilise ce que l'on nommera « la voie classique » : ESCRT-I, ESCRT-II, CHMP6. Tandis que la cytokinèse et le bourgeonnement viral du VIH-1 utilisent la protéine accessoire Alix pour recruter la protéine CHMP4. A partir de CHMP4, CHMP2 et CHMP3 recrutent Vps4 pour permettre la dépolymérisation des filaments ESCRT-III.

#### 4. Biogénèse des exosomes dépendante de la machinerie ESCRT

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires d'origine endosomale, d'une taille allant de 40 à 100 nm, sécrétées dans le milieu extracellulaire par les cellules après la fusion des MVE avec la membrane. Ces vésicules contiennent divers composants

membranaires et cytoplasmiques communément appelés protéines cargo. Les protéines présentes dans les exosomes comprennent les tétraspanines (CD63, CD81), les intégrines, les immunoglobulines, les récepteurs des facteurs de croissance, les protéines du cytosquelette (tubuline, actine), les protéines de choc thermique (hsp70, hsp90), certaines petites espèces d'ARN et les protéines associées à la machinerie ESCRT (Alix, Tsg101) (Figure 11). Malgré les progrès récents, la biogénèse des exosomes et les mécanismes contrôlant le tri des cargaisons dans les exosomes ne sont que partiellement compris au niveau moléculaire. Cependant, différents mécanismes ont été identifiés dans le ciblage spécifique des protéines dans les exosomes, notamment un mécanisme dépendant de la machinerie ESCRT, un mécanisme dépendant des tétraspanines et des lipides et un mécanisme dépendant la ribonucléoprotéine A2B1 (Figure11).

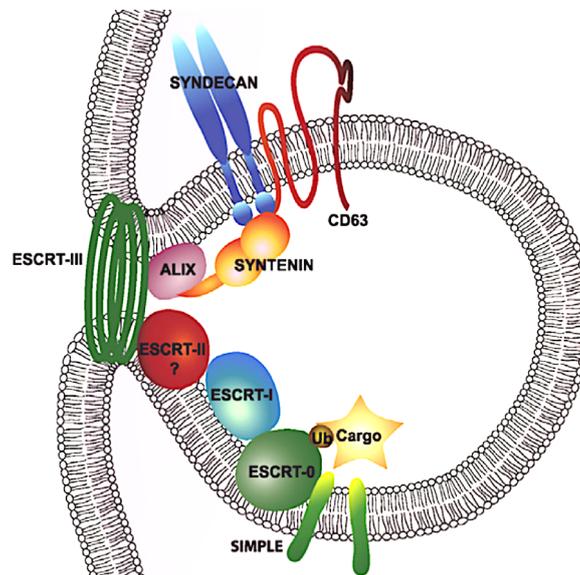


**Figure 11 : Compositions des exosomes et les différentes voies de biogénèse des exosomes (Villarroya-Beltri et al., 2014)**

- A.** Mécanisme dépendant de la machinerie ESCRT : Les complexes ESCRT 0, I et III, et la protéine Alix contrôlent le tri des protéines ubiquitinylées dans les vésicules intraluminales des corps multivésiculaires.
- B.** Mécanisme dépendant des tétraspanines et des lipides : Les tétraspanines (CD81, CD9, CD63) jouent un rôle clé dans la composition des exosomes indépendants de la machinerie ESCRT. Différents lipides et enzymes liés aux lipides contrôlent la sécrétion de ces exosomes.
- C.** Mécanisme dépendant de la ribonucléoprotéine A2B1 (hnRNP A2B1) sumoylé : La ribonucléoprotéine A2B1sumoylé contrôle le tri des ARNm dans les exosomes en se liant à de courts motifs spécifiques (EXOmotif).

Je me focaliserai sur la description du mécanisme dépendant de la machinerie ESCRT (Figure 11A). En 2012, Baietti et al montrent que la biogénèse des exosomes dépendante de la machinerie ESCRT est contrôlée par la synténine-1 et les syndécans (Baietti et al., 2012) (Figure 12). Les syndécans sont des récepteurs de surface transmembranaire, ils recrutent à la membrane plasmique, la protéine cytosolique synténine, qui, à son tour, interagit avec Alix (via le motif LYPXL) et CD63. Ils montrent

que la surexpression de la synténine augmente la sécrétion d'exosomes. En revanche, la répression des syndécanes, de la synténine-1 ou de la protéine Alix provoque une diminution de la sécrétion d'exosomes libérés et réduit l'accumulation exosomale d'Alix et de CD63.



**Figure 12 : Mécanisme contrôlant le ciblage des protéines cargos dans l'exosome (Adapté de Villarroya-Beltri et al., 2014)**

Les complexes ESCRT 0, I et III, et la protéine Alix contrôlent le tri des protéines ubiquitinylées dans les vésicules intraluminales des corps multivésiculaires. La synténine et la petite protéine membranaire intégrale du lysosome/endosome tardif (SIMPLE) sont également impliquées dans la sécrétion des exosomes par leur interaction avec des composants spécifiques du complexe ESCRT

En 2013, Bissig et al. montrent que la protéine Alix est recrutée aux membranes des endosomes via son domaine Bro-1 qui interagit avec le lipide endosomal, LBPA (acide lysobisphosphatidique) (Bissig et al., 2013). En 2020, ils confirment le recrutement des protéines du complexe ESCRT-III ; CHMP4B, CHMP1A, CHMP1B et CHMP3, par la protéine Alix dans les endosomes tardifs sur les sites LBPA (Larios et al., 2020).

## 5. Back fusion

Le processus de « Back fusion » est un processus qui permet aux vésicules intraluminales de fusionner avec la membrane des endosomes multivésiculés pour libérer leur contenu dans le cytosol afin d'échapper à la dégradation lysosomale. Ce mécanisme de « back fusion » a été initialement caractérisé comme un mécanisme utilisé par les cellules présentatrices d'antigènes pour réguler la distribution des molécules du

complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Murk et al., 2002) mais il est particulièrement important pour certains virus et pour certaines protéines bactériennes comme la toxine de l'anthrax (*Bacillus anthracis*) (Abrami et al., 2013), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)(Le Blanc et al., 2005), le virus de Lassa et le virus de la chorioméningite lymphocytaire. Il a été proposé que le processus de back fusion des vésicules intraluminales avec la membrane endosomale assurerait la libération de la toxine ou de l'ARN viral dans le cytoplasme selon un processus contrôlé par le lipide LBPA, la protéine Alix et les ESCRT. Le lipide endosomal LBPA recrute la protéine Alix sur les endosomes tardifs dans un processus contrôlé par le calcium, ce qui déclencherait des changements de conformation d'Alix (oligomérisation) qui elle-même serait capable de recruter les ESCRT-III (Bissig et al., 2013).

## **6. La réparation de la membrane plasmique**

Les lésions dues à un stress mécanique, à des conditions pathologiques ou à des toxines forment des pores et provoquent un afflux massif toxique de  $Ca^{2+}$ . Quelle que soit la taille de la lésion de la membrane et le processus cellulaire impliqué dans sa réparation, une caractéristique commune à tous les processus de réparation est leur dépendance à l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytosolique. A la suite d'une lésion de la membrane causée par un laser pulsé, une accumulation des protéines du complexe ESCRT-III : CHMP1A et CHMP4B et des protéines accessoires Alg-2, Alix et Vps4B sur le site de la lésion a été mise en évidence. Il a été montré que cette accumulation de protéine est directement dépendante de la présence en  $Ca^{2+}$  extracellulaire. En effet, les cellules lésées en l'absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire ne montrent aucune accumulation de protéines du complexe ESCRT-III (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). Comme pour la cytokinèse ou le bourgeonnement viral, les lésions de la membrane déclenchent l'assemblage séquentiel des membres du complexe ESCRT-III.

## **7. Apoptose**

La protéine Alix a été initialement découverte en tant que partenaire de Alg-2, une protéine impliquée dans la mort cellulaire programmée. La mort cellulaire programmée est un processus garantissant l'homéostasie des cellules. L'apoptose est considérée comme une mort caspases-dépendante, c'est-à-dire, nécessitant l'activation

de la cascade protéolytique des caspases. À ce jour, deux grandes voies moléculaires conduisant à l'activation des caspases ont été identifiées : la voie déclenchée par les protéines relarguées par des mitochondries endommagées et la voie déclenchée au niveau de la membrane plasmique en réponse à la fixation de ligands sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort.

En 2004, Trioulier et ses collaborateurs montrent que la surexpression d'Alix dans les neurones granulaires de cervelet, est capable déclencher l'activation des caspases. Par contre, l'expression de la partie C-terminale d'Alix, délétée du site de liaison à la protéine Alg-2: <sup>802</sup>PGY<sub>813</sub> (Tableau 1), dans ces cultures de neurones bloque la mort induite par une déprivation en potassium et abolit la fonction pro-apoptotique d'Alix (Trioulier et al., 2004). Ces premières observations suggèrent que le rôle d'Alix dans la mort cellulaire passe par sa capacité à interagir avec Alg-2. En 2008, en utilisant la spectrométrie de masse sur les protéines co immunoprécipitées avec la protéine Alix dans des neurones mourants, Mahul Mellier et ses collaborateurs mettent en évidence que les protéines Alix et Alg-2 interagissent avec la pro caspase 8 et forment un complexe avec le TNFR1. Le TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) est un récepteur qui peut, après fixation de son ligand (TNF $\alpha$ ), déclencher la mort cellulaire programmée de la cellule suite à l'activation de la caspase 8, au niveau de l'endosome. Là encore, l'expression du mutant d'Alix  $\Delta$ PGY délété du site d'interaction avec Alg-2 protège les cellules HEK 293 et HeLa de la mort induite par le TNFR1 (Mahul-Mellier et al., 2008). Toutes ces données permettent d'affirmer que les deux protéines Alix associées à Alg-2 sont impliquées dans l'apoptose caspase dépendante induite par le TNFR1 (Mahul-Mellier et al., 2008).

La protéine CIN85 (Cbl Interacting Proteine) a été identifiée pour la première fois dans des cellules humaines comme une protéine de 85 kDa interagissant avec l'ubiquitine ligase Cbl (Casitas B-lineage lymphoma). En association avec Cbl, elle est tout d'abord connue pour contrôler l'internalisation, le trafic et le tri de plusieurs récepteurs à tyrosine kinase activés, dont le récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR). Mais il a été mis aussi en évidence son implication dans l'apoptose des astrocytes. En effet, la surexpression de la protéine CIN85 sensibilise les astrocytes à l'apoptose induite par les radiations aux ultraviolets. Cette activité proapoptotique est corrélée avec la capacité de la protéine CIN85 à se lier aux protéines Alix et Alg-2 (Chen et al., 2000).

## **C. Les modifications post-traductionnelles de la protéine Alix**

L'assemblage de complexes protéiques par des protéines accessoires joue un rôle important dans les processus cellulaires fondamentaux, tels que la régulation du cycle cellulaire et la transduction du signal. Au cours de ces processus, les modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation et l'ubiquitination des protéines, régulent souvent l'interaction des protéines adaptatrices avec leurs partenaires de liaison. Plusieurs études ont montré que la phosphorylation ou l'ubiquitination de la protéine accessoire Alix, au cours de différents processus biologiques, constitue une étape importante pour la régulation de sa fonction.

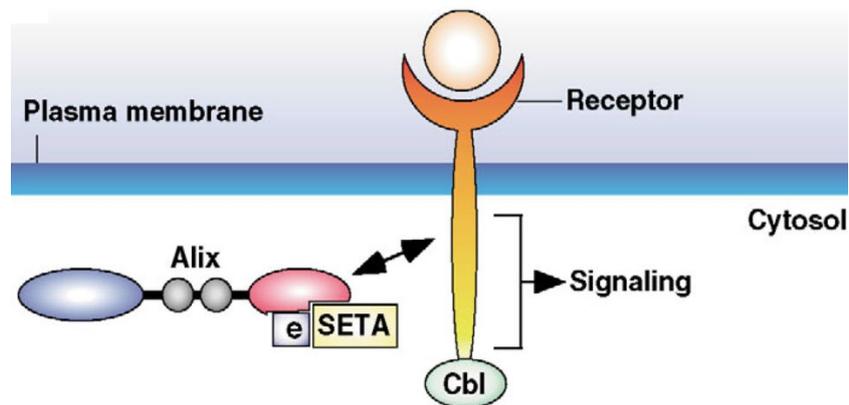
### **1. La phosphorylation**

#### **a. Phosphorylation et endocytose des récepteurs à facteur de croissance**

Alix joue un rôle dans la régulation négative de l'endocytose du récepteur à l'EGF (noté EGFR) au niveau de la membrane plasmique. En l'absence de ligand, le récepteur à l'EGF existe sous forme de monomère inactif. La fixation d'un ligand entraîne la formation d'un dimère actif. Dès lors, l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur phosphoryle des tyrosines du récepteur lui-même, qui conduit au recrutement des protéines possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines : les domaines SH2 ou PTB (PhosphoTyrosine Binding) dont celui d'une ubiquitine ligase, la protéine Cbl. La protéine Cbl activée recrute alors la protéine SETA (*src* homology 3 domain containing expressed in tumorigenic astrocytes) également connue sous le nom de CIN85, qui elle-même est constitutivement associée aux endophilines. L'association du complexe SETA-endophiline-Cbl permet l'internalisation du récepteur activé. En effet, Soubeyran et ses collaborateurs ont montré que les protéines CIN85 mutantes dépourvues soit de leur région C-terminale, incapables de lier les endophilines, soit de leur région N-terminale, incapables d'interagir avec Cbl, ont pour effet d'inhiber l'internalisation des récepteurs à l'EGF et de retarder leur dégradation (Soubeyran et al., 2002).

Le rôle de la protéine Alix dans ce processus d'endocytose de l'EGFR est central (Figure 13). En effet, Alix est capable de se lier au domaine SH3 de la protéine SETA (CIN85) via son motif <sup>740</sup>PTPAPR<sub>745</sub> situé sur son domaine PRD (Tableau 1) (Chen et al.,

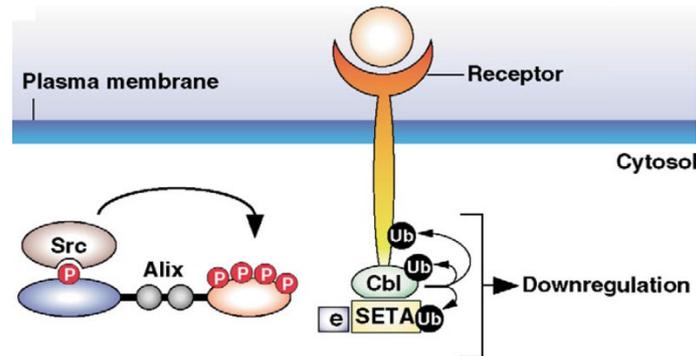
2000). En 2004, Schmidt et ses collaborateurs montrent que la surexpression d'Alix empêche le complexe SETA-endophiline de se lier au Cbl et entraîne une réduction de l'internalisation de l'EGFR (Schmidt et al., 2004). En revanche, l'inactivation d'Alix améliore l'internalisation et la dégradation de l'EGFR. D'autre part, Alix est capable de se lier au domaine SH3 des endophilines via son motif à base de proline  $^{755}$ PARPPPP $^{761}$  situé sur son domaine PRD (Tableau 1 - Chatellard-Causse et al., 2002) ce qui pourrait faciliter la séquestration du complexe SETA-endophiline.



**Figure 13 : Inhibition de l'endocytose de l'EGFR par la protéine Alix (Schmidt et al., 2004)**

La protéine Alix empêche le complexe SETA-endophiline de se lier au Cbl et entraîne une réduction de l'internalisation de l'EGFR.

Les mécanismes de régulation de la fonction et l'activité de la protéine Alix pendant ce processus d'endocytose de l'EGFR ont été mis en évidence en 2004 par Schmidt et ses collaborateurs. Ils montrent que la protéine Alix est régulée négativement par la protéine kinase Src, activée en réponse à la stimulation de l'EGFR, dans un processus en deux étapes. Le domaine SH2 de Src se lie au résidu phosphoTyr $_{319}$  (Tableau 1) du domaine Bro1 d'Alix puis le domaine SH3 de la kinase Src se lie au motif  $^{752}$ PQPPAR $^{761}$  du domaine PRD d'Alix (Tableau 1). En conséquence de ces interactions, Src hyperphosphoryle le domaine C-terminal d'Alix (Schmidt et al., 2005). L'hyperphosphorylation contribue à diminuer la capacité d'Alix à interagir avec SETA et l'amène à se déplacer vers le cytosol, neutralisant ainsi sa capacité à réguler négativement l'endocytose du récepteur (Figure 14).



**Figure 14 : Régulation négative de la protéine Alix par la protéine Src lors du processus d'endocytose de l'EGFR (Schmidt et al., 2004 ; Schmidt et al., 2005)**

L'hyperphosphorylation de la protéine Alix diminue son interaction avec la protéine SETA et neutralise sa capacité à réguler négativement l'endocytose du récepteur.

### **b. Phosphorylation et mitose**

En 2015, Sun et ses collaborateurs mettent en évidence que la phosphorylation de deux résidus serine  $S_{718}$  et  $S_{721}$  du domaine PRD de la protéine Alix induit le changement d'une conformation fermée à une conformation ouverte pendant la phase mitotique (M). Ils montrent que ces phosphorylations sont à la fois requises pour la relocalisation de la protéine Alix au niveau du pont intercellulaire lors de l'abscission cytokinétique et pour la fonction de la protéine Alix dans le bourgeonnement du virus EIAV mais qu'à l'inverse, ces phosphorylations ne sont pas requises pour l'endocytose du récepteur à l'EGF (Sun, Zhou, Corvera, et al., 2015a).

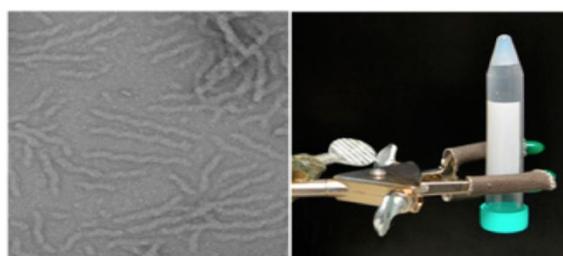
### **c. Phosphorylation et maturation de l'ovocyte**

D'autre part, il a été montré que l'orthologue de la protéine Alix de Xenope, Xp95 est phosphorylé sur au moins deux sites, dans la région comprise entre les résidus 706-756 du domaine PRD, pendant la maturation des ovocytes de Xenope. L'un des sites de phosphorylation est l'acide aminé  $Thr_{745}$  situé dans la séquence SSIPTAPRPT. L'alignement du peptide avec la séquence d'Alix a montré que le PTPAPR contenu dans cette séquence correspond aux sites de liaison de la protéine SETA. La phosphorylation dans ce site de liaison pendant la maturation des ovocytes de Xenope est responsable de l'inhibition de l'interaction entre Xp95 et SETA pendant l'induction en phase M (Sun et al., 2015).

#### d. Phosphorylation et formation d'amyloïdes

Très récemment en 2020, Elias et ses collaborateurs mettent en évidence que la partie C -terminale du domaine PRD de la protéine Alix : PRD<sub>800-868</sub> forme des fibres amyloïdes. Cette découverte a été d'autant plus importante que les domaines PRD, prédits comme étant des domaines complètement désordonnés sont souvent enlevés des constructions de protéines recombinantes car ils sont la cause de nombreux problèmes de solubilité ou d'instabilité des protéines lors des études en cristallographie ou en résonance magnétique nucléaire. En effet, jusqu'à maintenant, la structure du domaine PRD de la protéine Alix, contenant de nombreux sites de liaisons aux partenaires de la protéine n'a jamais été résolue du fait de l'extrême difficulté à l'exprimer en bactéries.

Afin d'obtenir des données reproductibles et de caractériser les propriétés physiques de cette région C-terminale de PRD, ils ont généré une protéine de fusion avec comme étiquette le domaine B1 de la protéine G : GB1-PRD<sub>800-868</sub>. Ils montrent par résonance magnétique nucléaire que l'hyperphosphorylation du domaine PRD par la kinase Src provoque la dissolution de ces fibres en espèce monomérique soluble (Elias et al., 2021).



**Figure 15 : Fibres amyloïdes et gel formé par GB1-PRD800-868 (Elias et al., 2021)**

Images de microscopie électronique des fibres amyloïdes en coloration négative et gel formé par 0.1mM GB1-PRD<sub>800-868</sub>.

En 2021, ils confirment que le domaine PRD<sub>703-868</sub> forme des fibres amyloïdes riches en feuilletés beta (Figure 15). Ces fibres amyloïdes se dissolvent en monomère soluble lors de l'hyperphosphorylation par Src et sont capables de se reformer après déphosphorylation par PTP1B. Ils montrent que la partie de ces fibres PRD<sub>800-813</sub> résistante à la protéinase K, correspondent aux épitopes codant pour les liaisons à CEP55 et Alg-2, ce qui suggère que la dissolution et la formation de ces fibres seraient la base d'un processus de contrôle du recrutement de certains partenaires impliqués dans la cytokinèse et l'apoptose. Ils

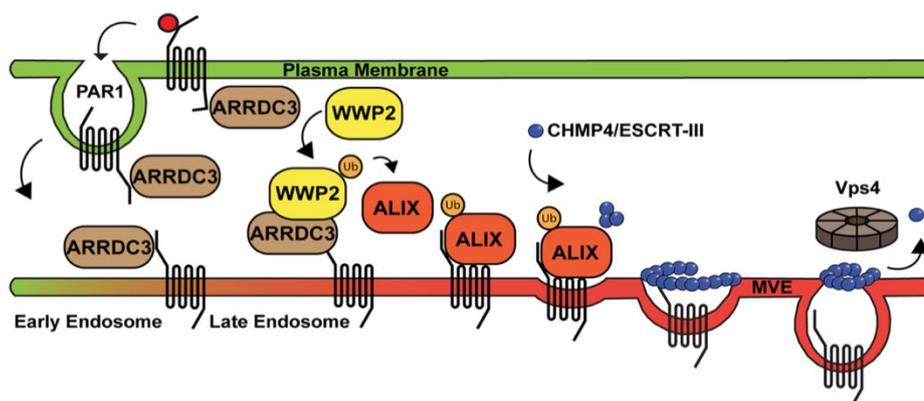
suggèrent enfin que l'hyperphosphorylation du domaine PRD entre en compétition avec les phospholipides pour se lier au domaine Bro-1 entraînant la redistribution de la protéine Alix dans le cytosol.

## 2. Ubiquitination de la protéine Alix

L'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés, agit comme un signal post-traductionnel polyvalent qui régule un large éventail de processus biologiques. En effet, plus d'un tiers du protéome eucaryote est ubiquitinylé (Kim et al., 2011).

### a. La voie de tri endolysosomale indépendante de l'ubiquitination

Le tri des récepteurs de signalisation est un processus essentiel dans les cellules de mammifères. Lors de leurs dégradations, les récepteurs sont ubiquitinylés et triés par la machinerie ESCRT dans les vésicules intraluminales (VIL) des corps multivésiculaires (MVE). Toutefois, il existe un sous-ensemble de récepteurs, dont le PAR1 (protease-activated receptor-1) et le P2Y1, qui utilisent la voie de tri endolysosomale indépendamment de l'ubiquitination, une voie qui requiert la protéine Alix et le complexe ESCRT-III dans les cellules mammifères (Dores et al., 2012, 2016). Si la voie de tri endolysosomale du récepteur PAR1 est indépendante de l'ubiquitine, les mécanismes qui régulent la fonction et l'activité de la protéine Alix pendant ce tri lysosomal sont eux, dépendants, de l'ubiquitination.



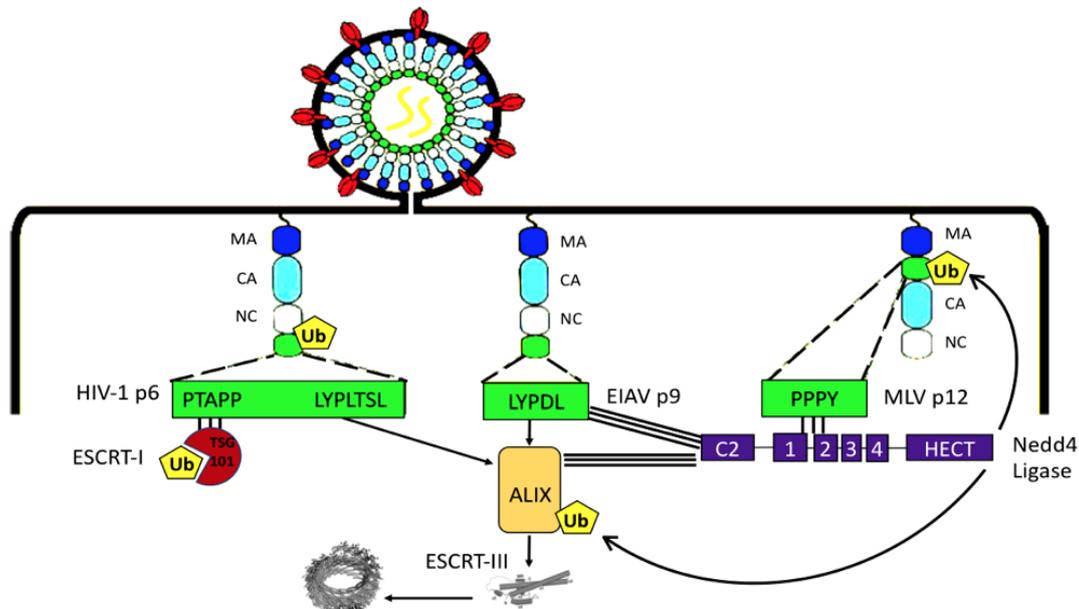
**Figure 16 : Voie de tri lysosomal des récepteurs de signalisation cellulaire indépendante de l'ubiquitine (Dores et al., 2015)**

L'interaction de la protéine Alix ubiquitinylée avec la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III initie la vésiculation conduisant à la formation de la vésicule intraluménale et à la dégradation du récepteur PAR1.

En 2015, Dores et ses collaborateurs montrent grâce à des études de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) et de la microscopie confocale que le récepteur PAR1 non activé est lié à la protéine ARRDC3 ( $\alpha$ -arrestin arrestin domain-containing protein-3) au niveau de la membrane plasmique (Figure 16). Après l'activation de celui-ci, il est rapidement internalisé et dirigé vers les endosomes (Dores et al., 2012), la protéine ARRDC3 reste liée au récepteur et initie l'ubiquitination de la protéine Alix en recrutant l'ubiquitine ligase E3 WWP2 (Figure 16). Dès lors la protéine Alix, par son interaction avec la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III initie la vésiculation conduisant à la formation de la vésicule intraluménale et à la dégradation du récepteur (Dores et al., 2015). Si l'on se réfère aux travaux de Keren Kaplan qui ont montré que l'ubiquitination facilite la dimérisation de la protéine Alix (Keren-Kaplan et al., 2013), on peut donc faire l'hypothèse que l'ubiquitination régulerait la dimérisation de la protéine Alix et induirait la dégradation du récepteur PAR1 (Dores et al., 2015).

#### **b. Le bourgeonnement des virus**

Avant d'aller plus avant pour expliquer le lien entre processus d'ubiquitination et la protéine Alix lors du bourgeonnement du HIV-1, il est nécessaire de rappeler que l'ubiquitination fait partie intégrante du bourgeonnement viral. En effet, plusieurs études ultérieures ont montré que l'ubiquitination de la protéine provirale Gag joue un rôle important dans la libération des rétrovirus. La première indication du rôle de l'ubiquitine dans l'assemblage rétroviral a été mise en évidence par Putterman ; il existe un enrichissement d'ubiquitine libre dans les particules du virus de la leucocytose aviaire (Avian Leukosis Virus) (Putterman et al., 1990). Par la suite, est venue la découverte de la monoubiquitination des protéines Gag provirales ; 2 % de la protéine Gag<sup>p6</sup> mature du VIH-1 et 5 % de la protéine Gag<sup>p12</sup> mature du virus de la leucémie murine (MLV) (Ott et al., 1998). Il est à noter que les polyprotéines rétrovirales Gag portent de courtes séquences conservées qui contrôlent le bourgeonnement et la libération du virus. Trois de ces motifs, dont j'ai déjà évoqué le rôle, appelés domaines tardifs ont été caractérisés jusqu'à présent : PTAP, LYPXL, et les motifs PPPY ; ils sont capables de modifier les niveaux d'ubiquitination des protéines Gag (Figure 17).



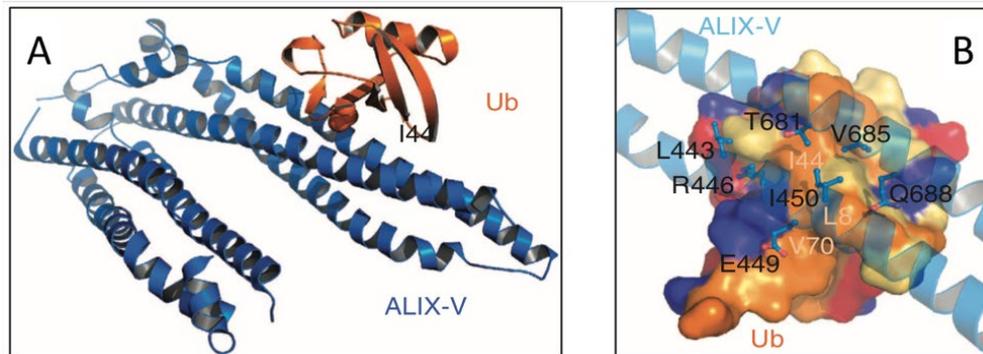
**Figure 17 : Complexes cellulaires et protéines impliqués dans l'activité du domaine tardif.**

Les motifs PTAP recrutent le complexe ESCRT-I par l'intermédiaire de Tsg101, les motifs LYPXL lient les motifs Alix et les motifs PPXY interagissent avec les ubiquitine ligases de type Nedd4 (Adapté de Martin-Serrano., 2007)

Les motifs PPPY se lient aux membres de la famille des ubiquitine ligases de type Nedd4 (Blot et al., 2004), dont la fonction cellulaire normale est d'ubiquitinyler les protéines cargos et de les diriger dans la voie de dégradation des MVE. D'autres études ont par ailleurs montré que, la diminution des pools cellulaires d'ubiquitine libre par un traitement avec des inhibiteurs du protéasomes ou la diminution d'ubiquitine conjuguée à la protéine Gag, par la mutation des résidus de lysine de la protéine Gag dans le virus VIH-1 et le virus du sarcome de Rous (RSV) affectent la libération des rétrovirus (Ott et al., 2000 ; Patnaik et al., 2000)

Maintenant, regardons de plus près le processus de régulation par lequel l'ubiquitination agit directement sur la protéine Alix. En 2010, des résultats soutiennent un modèle dans lequel Alix recrute une Nedd4 ligase pour faciliter les étapes tardives de la libération du VIH-1 via un mécanisme impliquant l'ubiquitination de la protéine Alix (Figure 17) (Sette et al., 2010). Ces résultats sont corroborés, à la fois, par les travaux de Keren Kaplan qui, par une approche « *in silico* », a mis en évidence un domaine de liaison à l'ubiquitine hautement conservé chez les procaryotes, dans la protéine Alix (E449-I450-T681-Q688) (Figure 18) (Keren-Kaplan et al., 2013). Il a pu être déterminé par des mesures d'affinité biophysique utilisant, entre autres, la thermophorèse (MST) et le pontage chimique (cross link), d'une part, que le domaine V de la protéine Alix est capable

de se lier à la mono-ubiquitine avec une affinité de  $119\mu\text{M}$  et d'autre part que, cette mono-ubiquitine est capable d'induire son oligomérisation *in vitro*. De plus, les travaux de Dowlatshahi et ses collaborateurs démontrent que ce domaine est capable de se lier aux chaînes polyubiquitine liées à la lysine K63 (Dowlatshahi et al., 2012).



**Figure 18 : Identification *in silico* du domaine V de la protéine Alix (Alix-V) comme domaine de liaison à l'ubiquitine**

(A) Vue d'ensemble du modèle structurel du complexe Alix-V:Ub dérivé de la procédure *in silico*.

(B) Vue de dessus, zoom sur l'interface Alix-V:Ub montrant des interactions spécifiques. Les résidus de la protéine Alix participant à l'interaction sont schématisés sous forme de bâtonnets. Surface moléculaire de l'Ub : bleu, résidus positifs ; rouge, résidus négatifs ; orange, résidus hydrophobes ; et jaune, résidus chargés. (Keren-Kaplan et al., 2013).

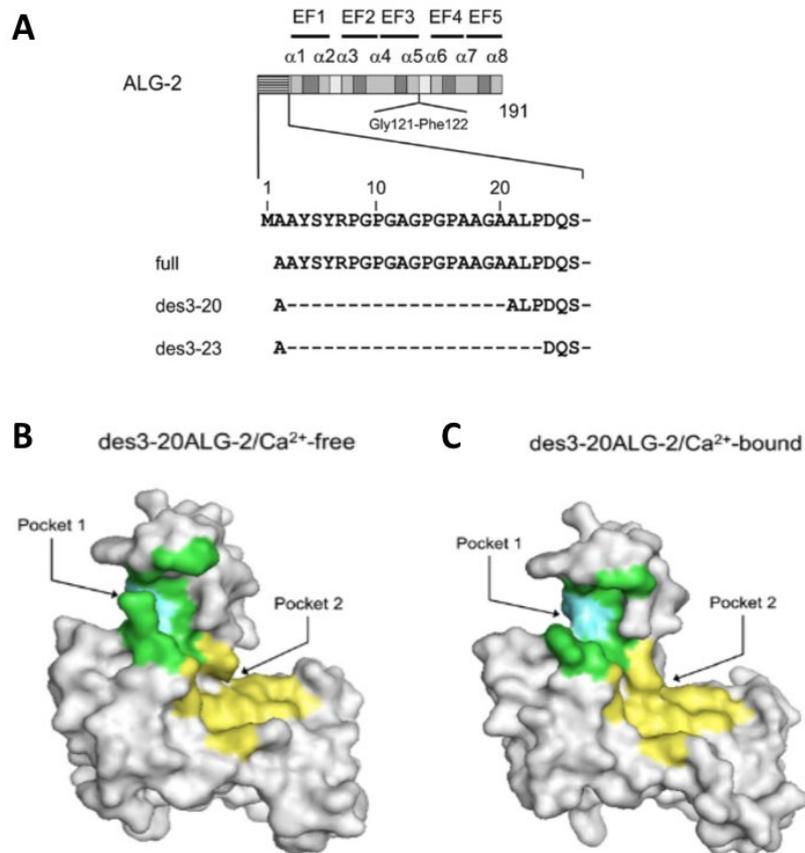
Mises ensemble, toutes ces données tendent à démontrer que l'interaction du domaine V de la protéine Alix à l'ubiquitine provoque sa dimérisation, qui elle-même, induit une interaction avec les filaments du complexe ESCRT-III ce qui joue un rôle physiologique significatif dans la libération des rétrovirus pendant le bourgeonnement viral.

## II. Alg-2

### 1. Organisation de la protéine Alg-2

Alg-2 (apoptosis-linked gene 2) est une protéine de 22 kDa, découverte dans un criblage génétique comme une protéine pro-apoptotique (Vito et al., 1996). Alg-2 appartient à la famille des protéines « Penta-EF-hand » (possédant 5 répétitions « EF-hand ») (Maki, 2020). Une caractéristique importante de cette famille de protéines est la présence d'une région N-terminale riche en proline/glycine de longueur variable qui joue un rôle important dans la liaison aux membranes dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de ses domaines EF1, EF3 et EF5 (Jia et al., 2001) induit des

changements conformationnels dans la protéine, qui conduisent à l'exposition de ses régions hydrophobes. Dès lors, elle acquiert la capacité d'interagir avec d'autres protéines dont elle régule la fonction (Figure 19).



**Figure 19 : Représentation schématique de la protéine Alg-2 humaine et différences structurales de Alg-2 en présence ou en absence de calcium (Suzuki et al., 2008)**

(A) Alg-2 a une région N-terminale riche en proline et en glycine suivie du domaine PEF contenant cinq mains EF (EF1-EF5) avec huit hélices ( $\alpha 1$ -  $\alpha 8$ ) ; (B) Structure de Alg-2<sub>des3-20</sub> sans  $\text{Ca}^{2+}$  ; (C) Structure de Alg-2<sub>des3-20</sub> lié au  $\text{Ca}^{2+}$

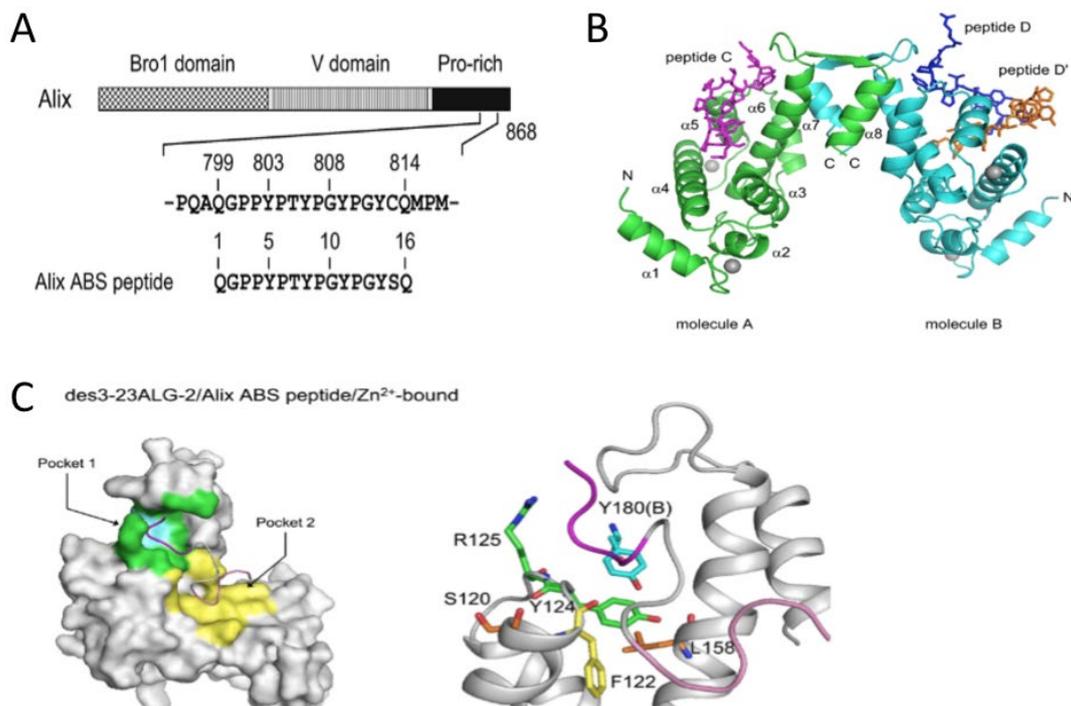
Deux sites de haute affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  avec une constante de dissociation (Kd) de l'ordre du micromolaire (1,2  $\mu\text{M}$ ) ont été mis en évidence par calorimétrie par titrage isotherme. De manière intéressante, un site de liaison de haute affinité (Kd  $\sim$  20  $\mu\text{M}$ ) au  $\text{Mg}^{2+}$  a été prédit dans EF5 (Henzl et al., 2016).

## 2. Interaction avec la protéine Alix

### a. Structure cristallographique du complexe Alix/ Alg-2

La protéine Alix a été initialement découverte en tant que partenaire de Alg-2, pour son rôle dans la mort cellulaire programmée. En 2008, cette interaction entre les

protéines Alix et Alg-2 est confirmée par Suzuki et ses collaborateurs lorsqu'ils résolvent la structure du complexe entre la protéine Alg-2, tronquée de ses 20 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale (Alg-2<sub>des3-23</sub>), et d'un oligopeptide comprenant 16 résidus (<sub>1</sub>GPPYPTYPGYPGYSQ<sub>16</sub>) correspondant aux acides aminés AA<sub>799-814</sub> de la protéine Alix (nommé ABS), en présence de Zn<sup>2+</sup> (code PDB 2ZNE) à 2,2 Å (Suzuki et al., 2008). Alg-2 se lie à la protéine Alix sur un site qui contient quatre répétitions PXY en tandem. Les domaines EF1 et EF3 lient le Zn<sup>2+</sup> au niveau de leurs boucles de liaison au Ca<sup>2+</sup>. Le peptide d'Alix est visible dans un sillon composé des résidus allant, de la fin de l'hélice α3 au milieu de la boucle entre les hélices α7 et α8. Le sillon d'Alg-2 contient deux poches hydrophobes (Figure 20 C : poches 1 et 2). La poche 1 est formée par les résidus de la boucle située entre les hélices α5-α6 et ceux de l'EF5 (α7-α8). La poche 2 est formée par les résidus des hélices α3, α4, α5 et α7.



**Figure 20 : Structure cristalline du complexe ALG-2/Alix en présence de zinc** (Suzuki et al., 2008)

**(A)** Représentation schématique du peptide ABS de la protéine Alix utilisé pour la cocristallisation.

**(B)** Deux monomères (molécules A et B) sont représentés en vert et en cyan, respectivement. Les peptides sont représentés en magenta (peptide C), en bleu (peptide D) et en orange (peptide D'). Les atomes de zinc sont représentés par des sphères grises.

**(C)** A droite : vue rapprochée de la poche 1, les résidus nommés sont les résidus critiques impliqués dans l'ouverture de la poche 1 ou dans la liaison avec le peptide ABS.

La résolution des structures d'Alg-2 de la forme sans  $\text{Ca}^{2+}$ , de la forme liée au  $\text{Ca}^{2+}$  et du complexe avec le peptide Alix ont révélé que la liaison du calcium au niveau du domaine EF3 induit un petit mouvement local de l'hélice  $\alpha 5$  et initie un changement de la chaîne latérale de l'Arginine  $\text{R}_{125}$  située dans la boucle reliant  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$ , entraînant ainsi l'ouverture d'une poche hydrophobe qui accepte le peptide ABS d'Alix (Figure 20). Alg-2 forme un homodimère par l'intermédiaire des deux motifs EF5 qui s'apparient de façon antiparallèle. Chaque molécule de monomère accepte une molécule de peptide ABS d'Alix. Ainsi, un dimère d'Alg-2 peut lier, de manière calcium dépendante, deux molécules d'Alix.

### b. Implication du complexe Alix /Alg-2 dans le changement de conformation de la protéine Alix

En 2015, Sun et ses collaborateurs montrent que l'interaction, dépendante du calcium, de la protéine Alg-2 avec le domaine riche en proline PRD de la protéine Alix initie un changement conformationnel global de la protéine Alix, qui diminue son interaction intramoléculaire et facilite son ouverture. Cette conformation ouverte peut être maintenue après la dissociation d'Alg-2 par des protéines partenaires nouvellement recrutées. La protéine Alix ainsi activée se déplace vers la fraction membranaire par interaction avec la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III liée à la membrane et remplit ainsi la fonction ESCRT associée à la membrane (Figure 21).

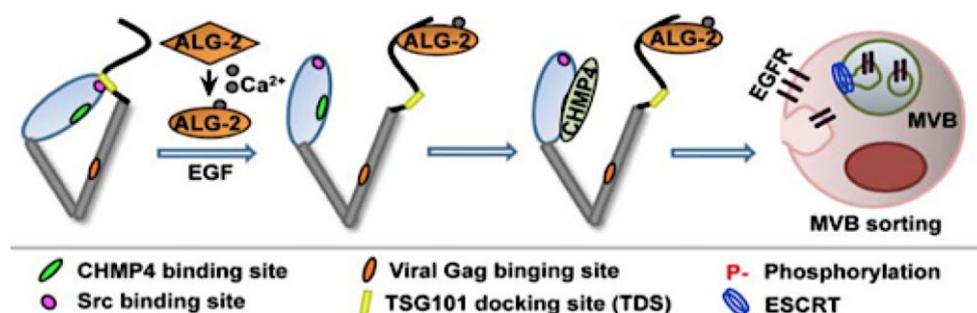


Figure 21: Illustration schématique du rôle d'Alg-2 sur le changement conformationnel de la protéine Alix (Sun et al., 2016)

A l'image des protéines CHMP du complexe ESCRT-III, il est maintenant reconnu que la protéine Alix existe dans deux conformations, l'une ouverte (active) et l'autre fermée (inactive). En effet, en 2016 les résultats obtenus par Sun et ses collaborateurs

confirment leur modèle proposé en 2015, à savoir, que la queue C-terminale constituée par le domaine PRD se replie sur le domaine N-terminal Bro-1 (Sun et al., 2016).

### **III. Fusion et fission membranaire**

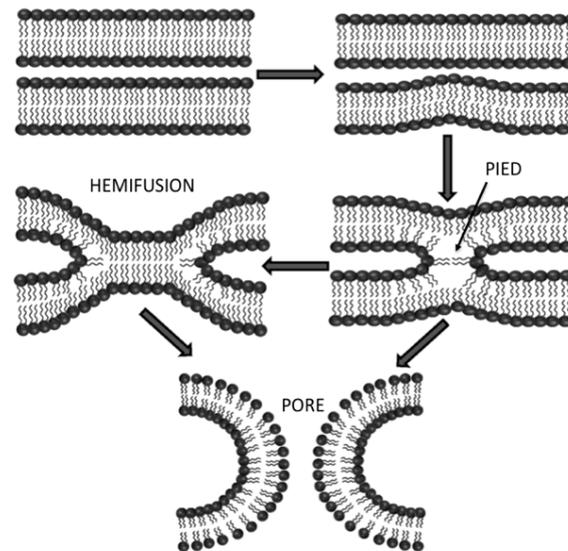
Dans cette dernière partie, je souhaiterais aborder les processus de fusion et de fission membranaire. Je commencerai par décrire les acteurs cellulaires connus pour être impliqués dans ces processus pour finir sur les méthodologies permettant de mettre en évidence ces processus. La fusion et la fission membranaire sont des processus ubiquitaires essentiels dans un grand nombre de processus biologiques tels que la transmission neuronale, l'endocytose, l'exocytose, l'entrée et le bourgeonnement des virus enveloppés dans la cellule. Ce sont des processus complexes, dynamiques et transitoires.

#### **A. La Fusion membranaire :**

Les différents compartiments des cellules eucaryotes : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes, les lysosomes, la membrane plasmique, communiquent entre eux grâce à des vésicules. Cette voie de transport d'information est appelée trafic vésiculaire. Ce trafic dépend de trois mécanismes : d'une part, le bourgeonnement de vésicules à partir du compartiment donneur, le déplacement de ces vésicules vers le compartiment accepteur et enfin leur fusion avec ce dernier. Cette dernière étape de fusion membranaire est une étape qui nécessite de l'énergie. En effet, les forces répulsives, d'origine entropique et électrostatique, tendent à conserver une mince couche d'eau entre les deux membranes. Ces forces induisent des barrières d'énergie devant être surpassées pour que la fusion survienne. L'énergie d'activation du processus doit être suffisamment importante pour empêcher des événements de fusion spontanée et non spécifique, mais elle doit être suffisamment faible pour pouvoir être surmontée par des protéines de fusion.

Le processus de fusion membranaire comprend quatre phases. La première, le contact de deux membranes, la deuxième, la formation d'une structure appelée « stalk », que l'on pourrait appeler tige, la troisième, la fusion des deux monocouches externes étroitement apposées (hémifusion) et enfin la dernière, l'ouverture d'un pore suivi de son

agrandissement, permettant le mélange du contenu des compartiments préalablement séparés par les membranes (Figure 22).



**Figure 22 : Étapes du processus de fusion membranaire**

La première étape de la fusion est la formation de la structure appelée « stalk » ou tige. L'hémifusion est obtenue par le contact des monocouches externes, elle est suivie par l'ouverture du pore (Adapté de Joardar *et al* 2022)

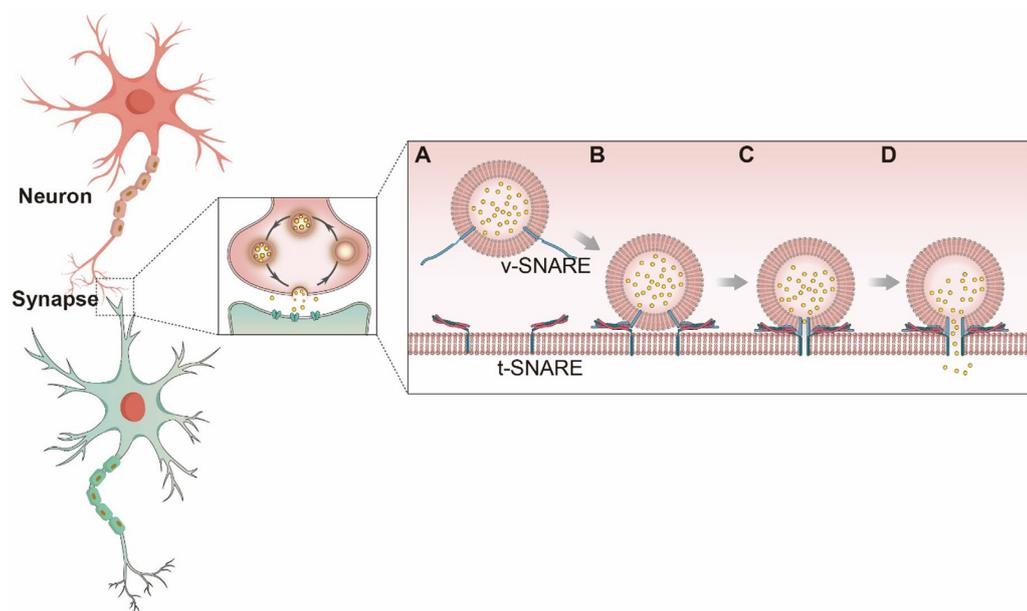
Le processus de fusion membranaire intervient dans de nombreux processus biologiques, comme le transport intracellulaire, le développement musculaire (pour revue (Towler *et al.*, 2004 ; Demonbreun *et al.*, 2015), la transmission synaptique (pour revue Rothman, 2015), lors de la spermatogenèse (Washington and Ward, 2006) et lors de l'infection virale (pour revue Weissenhorn *et al.*, 2007). Pour chacun de ces processus, les catalyseurs de la fusion membranaires sont différents.

## 1. Les protéines SNARE

La communication entre les neurones repose principalement sur des synapses chimiques et sur la libération de neurotransmetteurs. Au niveau des terminaisons nerveuses, des vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs s'arriment à la membrane plasmique avant de subir une étape de maturation qui leurs permet d'acquérir la capacité de fusionner avec cette membrane plasmique. La libération de neurotransmetteurs s'effectue par un processus d'exocytose dépendant du calcium. Dès lors, quand l'influx calcique déclenche la machinerie de fusion membranaire, un pore de

fusion connectant la lumière des vésicules synaptiques à la fente synaptique s'ouvre et permet la libération des neurotransmetteurs. Ce processus d'exocytose nécessite l'assemblage de complexes moléculaires très conservés appelés protéines SNARE.

Les SNARE synaptiques constituent la machinerie de fusion membranaire la mieux caractérisée et sont formées de deux SNARE de la membrane plasmique : la syntaxine et SNAP-25 et d'une SNARE vésiculaire : VAMP2 (ou synaptobrevine). Ce complexe est composé d'un faisceau de quatre hélices  $\alpha$  torsadées: une provenant de VAMP2 qui contient une hélice cytosolique unique et un domaine transmembranaire fixé à la vésicule synaptique, une de la syntaxine et deux hélices de SNAP25 (Figure 23). SNAP25 ne possède aucune région transmembranaire, elle est ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de la palmitoylation de ses résidus cystéine. Lorsque le faisceau de quatre hélices  $\alpha$  torsadées est formé, la rigidité de la structure et les forces appliquées sur les parties transmembranaires permettent de resserrer les deux membranes jusqu'à ce que les deux domaines transmembranaires s'alignent l'un avec l'autre et créent un pore de fusion (pour revue Brukman et al., 2019 ; Risselada and Mayer, 2020 ; Mion et al., 2022). La formation du complexe SNARE libère une partie de l'énergie nécessaire pour franchir la barrière de potentiel correspondant à la fusion de deux bicouches lipidiques.



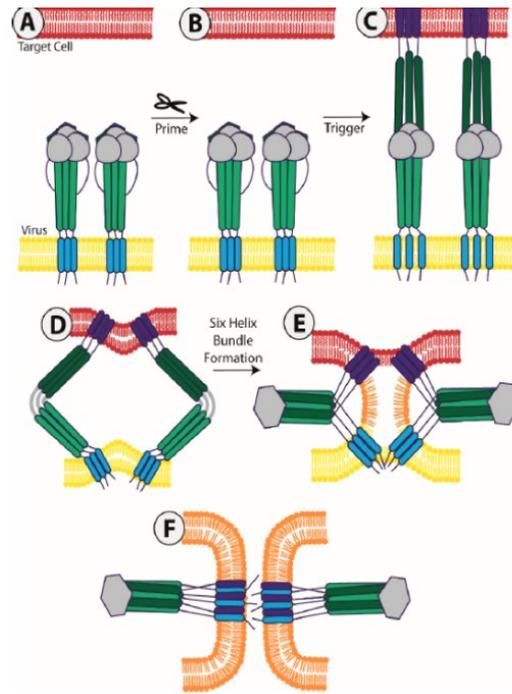
**Figure 23 : Fusion membranaire médiée par le complexe SNARE synaptique (Yoo et al., 2022)**

Le cœur du complexe SNARE est formé par la syntaxine (en bleu), la synaptobrevine (en bleu clair) et SNAP25 (en rouge). **A.** La vésicule synaptique et la membrane plasmique sont à proximité l'une de l'autre. **B.** La vésicule synaptique est arrimée à la membrane plasmique par l'assemblage du complexe SNARE. **C et D.** Les feuillettes internes se rapprochent progressivement les uns des autres, poussés par une force appliquée sur les parties C-terminales des SNARE jusqu'à l'ouverture d'un pore de fusion permettant la fusion complète de la vésicule à la membrane présynaptique et la libération du neurotransmetteur.

L'invalidation du gène codant pour la synaptobrevine (Schoch et al., 2001) ou pour SNAP-25 chez la souris (Washbourne et al., 2002) affecte la libération de neurotransmetteurs, confirmant ainsi la nécessité de protéines SNARE pour assurer la fusion des vésicules d'exocytose. Des études de substitutions d'un seul acide aminé dans les domaines transmembranaires de la syntaxine et de la synaptobrevine influencent la conductance et la dynamique du pore de fusion (Chang and Jackson, 2015 ; Hastoy et al., 2017). Il a été montré que le domaine transmembranaire de la synaptobrevine est nécessaire pour permettre une libération efficace du contenu dans un système de fusion *in vitro* entre des liposomes et des nanodisques (Shi et al., 2012). Les substitutions au niveau des parties C-terminales du domaine transmembranaire peuvent retarder la fusion lorsque l'hydrophobicité des parties C-terminales est diminuée, ou accélérer la fusion lorsque celle-ci est augmentée (Wehland et al., 2016).

## **2. Les glycoprotéines virales**

Lors de la première étape du cycle infectieux des virus enveloppés, les virus entrent dans leurs cellules cibles suite à la fusion de leur enveloppe virale avec la membrane plasmique cible. Il peut s'agir de la membrane plasmique, ou de la membrane d'un endosome. Les catalyseurs de cette fusion membranaire sont les glycoprotéines ancrées dans l'enveloppe virale (pour revue Weissenhorn et al., 2007). Une fois entré dans la cellule, le virus réplique son génome et assemble de nouvelles particules virales qui quittent la cellule par bourgeonnement. Sur la base de leurs structures, trois classes différentes de glycoprotéines virales ont été identifiées. L'activité de fusion est associée à un changement conformationnel important de la glycoprotéine d'un état natif dit de « pré fusion » à un état final dit de « post fusion ». Dépendant de la famille virale, cette transition structurale peut être déclenchée à la membrane plasmique par l'interaction du virus avec son récepteur, soit dans les endosomes où l'environnement acide conduit à la protonation de résidus clés qui déclenche le changement conformationnel de la glycoprotéine.



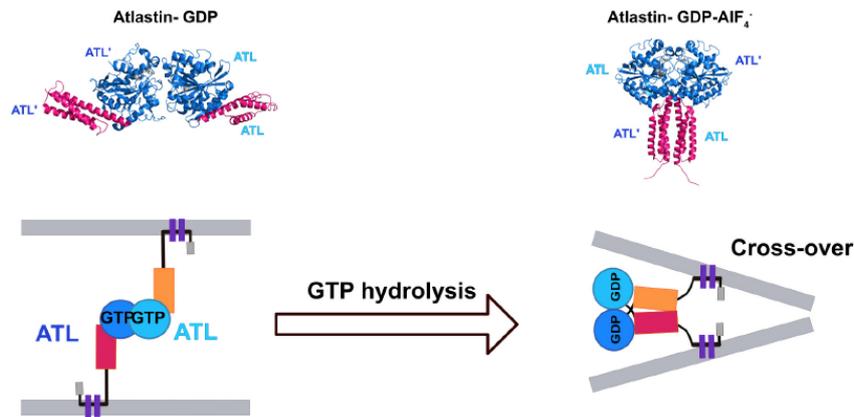
**Figure 24 : Modèle de fusion membranaire virale (Barrett and Dutch, 2020)**

Cette figure représente un modèle de fusion médié par une protéine de fusion virale de classe I. Toutefois, des processus similaires se produisent également dans le cas des protéines de fusion virale de classe II et III. **A.** Étape d'amorçage : La protéine subit un traitement protéolytique afin de préparer à la fusion (classe I) **B.** conformation métastable de pré-fusion **C.** la protéine forme une structure allongée, permettant au peptide de fusion (violet) de pénétrer dans la membrane cible (rouge). **D.** la structure commence alors à se replier sur elle-même, en formant une structure en épingle à cheveux **E.** les répétitions N-terminales et C-terminales se rapprochent pour former un faisceau de six hélices **F.** Enfin, le peptide de fusion (violet) et le domaine transmembranaire (bleu clair) s'approchent pour achever la fusion des deux membranes et l'ouverture du pore de fusion.

Les données expérimentales indiquent que les glycoprotéines catalysent la fusion membranaire de façon très similaire chez tous les virus. En réponse à la liaison d'un ligand (proton, protéine), la protéine change de conformation permettant au peptide de fusion préalablement enfoui d'être exposé et de pénétrer dans la membrane cible : structure intermédiaire étirée (Figure 24C). Cette structure étirée de la glycoprotéine, lui permet ainsi d'être connectée aux deux membranes à fusionner. Le domaine transmembranaire est ancré dans l'enveloppe virale alors que la partie N -terminale est insérée dans la membrane de la cellule cible. La structure commence alors à se replier sur elle-même, formant une structure en épingle à cheveux, rapprochant les deux membranes : virale et cible. La membrane cible et la membrane virale atteignent un état d'hémifusion. Enfin, le peptide de fusion et le domaine transmembranaire s'approchent pour achever la fusion des deux membranes et l'ouverture du pore de fusion (Barrett and Dutch, 2020).

### 3. L'Atlastine

Le réticulum endoplasmique est constitué d'un réseau de tubules connectés par des jonctions formant un maillage dynamique. Chez la drosophile, il a été montré que la régulation de la formation des tubules est dépendante d'une protéine de la famille des dynamines, la protéine Atlastine (Orso et al., 2009). En 2011, Moss *et al* proposent le modèle selon lequel deux membranes du RE se faisant face pourraient fusionner grâce aux Atlastines de chaque membrane opposée pour former des intersections dans le réseau. Un modèle de fusion a été proposé impliquant la dimérisation de la protéine en trans via ses domaines GTPase (Byrnes et al., 2013). La formation de cet homodimère permettrait le rapprochement et la fusion des membranes du RE (Figure 25).



**Figure 25 : Modèle de fusion induite par l'Atlastine (Ozeir and Cohen, 2022)**

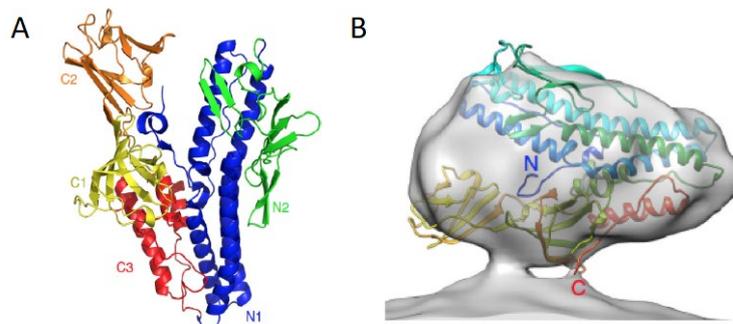
Panneaux du haut : structures cristallographiques du dimère d'Atlastine dans une conformation ouverte (PDB : 3QOF) ou dans une conformation fermée (PDB : 4IDQ)

Panneaux du bas : Lors de la fusion induite par l'Atlastine, c'est l'oligomérisation de l'Atlastine par le domaine GTPase qui est responsable de la fusion de la membrane du réticulum endoplasmique. La bicouche fusionnée contient le dimère d'Atlastine en conformation postfusion fermée.

### 4. Les protéines « spikes » des virus pléomorphes d'archées

Une cinquantaine de virus infectant les micro-organismes ont été isolés depuis les années 1980. La plupart de ces virus proviennent d'environnements hypersalins ou géothermaux. Ils présentent une très importante diversité de morphotypes. Leurs hôtes sont hyperthermophiles, acidothermophiles, halophiles extrêmes ou méthanogènes.

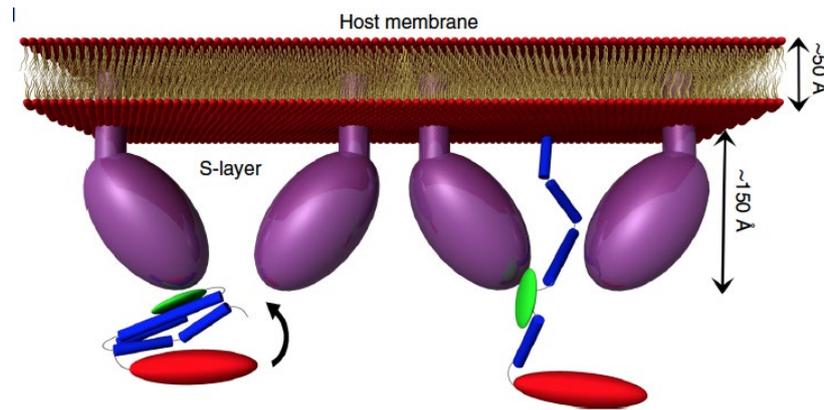
Les virus pléomorphes ne possèdent pas de capsid protéique rigide. Au lieu de cela, leurs virions sont des vésicules membranaires simples, sphériques et flexibles. Elles ne possèdent que 2 à 4 types de protéines structurelles majeures, soit situées à l'intérieur de la membrane, soit distribuées de manière irrégulière à la surface du virion : les protéines « spike ». La structure cristallographique de la protéine « Spike » du virus pléomorphe Halorubrum 6 (HRPV-6) a été déterminée à une résolution de 2.7Å (El Omari et al., 2019)(Figure 26A). La structure a révélé la présence de deux domaines de longueur égales qui se replient en forme de V, qui n'est pas sans rappeler la structure du domaine V central de la protéine Alix. Grâce à la cryotomographie électronique, il a pu être déterminé qu'à la surface du virion, la protéine « spike » est monomérique et attachée à la membrane par sa partie C-terminale (Figure 26B).



**Figure 26 : Structure cristallographique et cryotomographie électronique de la protéine « spike » du HRPV-6 (El Omari et al., 2019)**

**A.** La partie N-terminale comprend deux sous domaines nommés N1 et N2. La partie C-terminale comprend 3 sous domaines C1-C3 **B.** cryotomographie électronique de la protéine « spike » du HRPV-6. La protéine de surface « spike » est attachée à la membrane par son extrémité C-Terminale.

Lors de l'infection virale, la liaison de la protéine « spike » avec le récepteur de la cellule hôte induit un changement de conformation de la protéine « spike ». L'ouverture de la protéine pourrait conduire à amener la région comprenant les 20 premiers acides aminés hydrophobes, protégés du solvant dans la structure cristalline, prédits pour former un peptide de fusion, à s'insérer dans la membrane de la cellule hôte et initier ainsi la fusion des membranes virale et hôte (Figure 27).



**Figure 27 : Modèle proposé pour le réarrangement de la protéine « spike » lors de l'infection par le virus HRPV-6 (El Omari et al., 2019)**

Les domaines N et C-terminaux de VP4 sont colorés en bleu et rouge, respectivement, tandis que le domaine de reconnaissance au récepteur de la cellule hôte (N2) est coloré en vert. Après l'interaction de la protéine « spike » avec le récepteur à la surface de la cellule hôte, peut-être via son sous-domaine N2 (vert), le faisceau  $\alpha$ -hélicoïdal du sous-domaine N1 (bleu) s'ouvrirait et s'étendrait de  $\sim 150$  Å. L'ouverture de la protéine pourrait conduire à amener le peptide de fusion, à s'insérer dans la membrane de la cellule hôte et initier ainsi la fusion des membranes virale et hôte

La fusion membranaire est un processus fondamental qui est catalysé par des protéines spécifiques. Il existe de nombreux processus de fusion membranaire, chacun de ces processus faisant appel à des fusogènes spécifiques. En dépit de la diversité des machineries formées par ces protéines, les réactions de fusion partagent de nombreux points communs et semblent procéder par la formation des mêmes intermédiaires lipidiques.

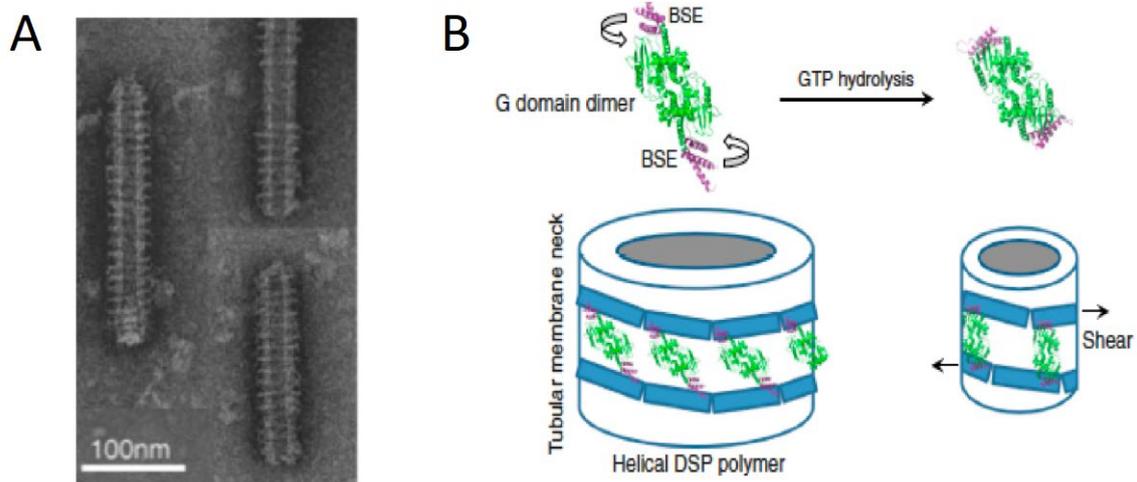
## B. La fission membranaire

Deux classes majeures de machineries cellulaires sont impliquées dans les processus de fission membranaire, les protéines dynamines qui catalysent entre autres la fission mitochondriale et la machinerie ESCRT impliquées dans les processus cellulaires tels que la cytokinèse, les formations des vésicules intraluminales, le bourgeonnement viral, la réparation de la membrane plasmique.

### 1. Les dynamines

L'endocytose par des vésicules recouvertes de clathrine est une voie majeure d'internalisation dans les cellules de nombreux récepteurs transmembranaires ayant des rôles-clés dans de multiples fonctions cellulaires. La formation de vésicules recouvertes

de clathrine requiert l'action concertée de plusieurs dizaines de protéines. Les étapes nécessaires sont la déformation de la membrane plasmique et le recrutement du manteau de clathrine et enfin la fission de la vésicule de la surface cellulaire. La Dynamine est une protéine dont la fonction a été reliée génétiquement et biochimiquement à la fission membranaire pendant ce processus d'endocytose. Le membre le plus connu de la superfamille des dynamines est la dynamine de mammifères Dyn1 (Pour revue Antony et al., 2016 ; Ozeir and Cohen, 2022). La dynamine purifiée polymérise spontanément en anneaux et en hélice lorsqu'elle est incubée dans des solutions à faible concentration ionique ou en présence d'éléments tubulaires étroits chargés négativement (Hinshaw and Schmid, 1995). La reconstruction 3D de la structure des polymères de Dynamine a été mise en évidence par microscopie électronique (Zhang and Hinshaw, 2001). Grâce à son oligomérisation, la dynamine peut tubuler des bicouches lipidiques (Figure 28A). La fonction essentielle de la dynamine est d'utiliser l'énergie de l'hydrolyse du GTP pour couper les tubules membranaires. En effet, lors de l'hydrolyse du GTP, les réarrangements conformationnels de la protéine induiraient une constriction des membranes jusqu'à induire la fission (Ramachandran and Schmid, 2018).



**Figure 28 : Structures des polymères et mécanisme de fission de la Dynamine (Zhang and Hinshaw, 2001 ; Ramachandran and Schmid, 2018)**

**A.** Image de microscopie électronique montrant un polymère hélicoïdal de Dynamine purifiée qui a entraîné la formation d'un tubule à partir d'un liposome.

**B.** Lors de l'hydrolyse du GTP, le mouvement du domaine BSE (magenta) vers l'intérieur fait glisser les deux échelons hélicoïdaux dans des directions opposées (flèches) ce qui crée un cisaillement et la constriction de la membrane.

## 2. Les protéines du complexe ESCRT-III

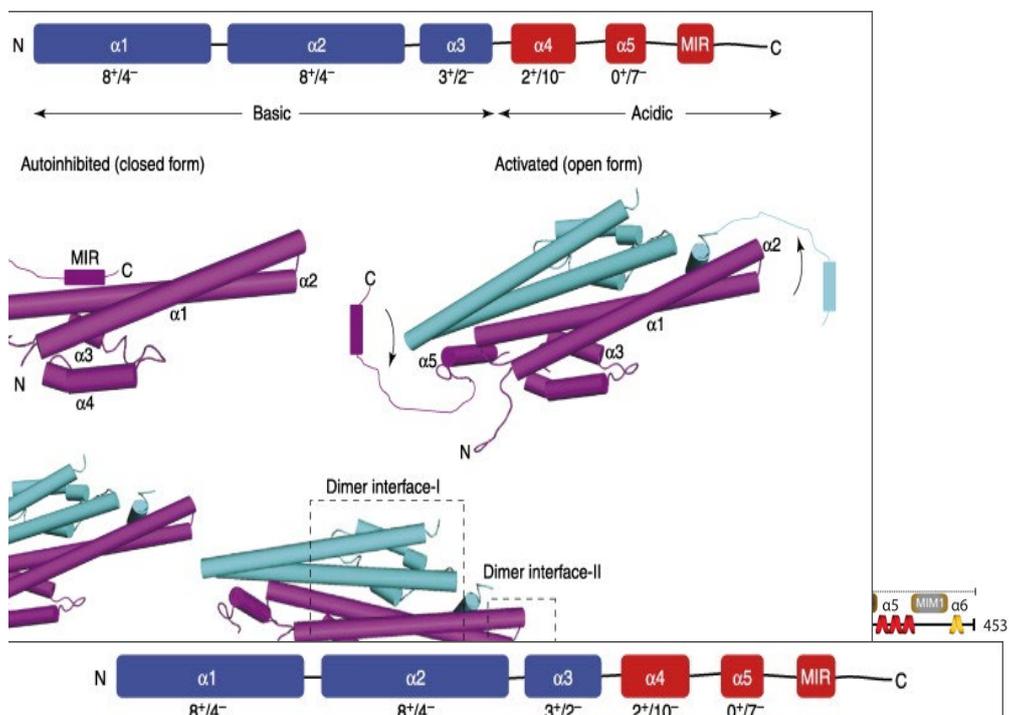
La machinerie ESCRT est une machinerie cellulaire conservée à travers l'évolution impliquée dans de nombreux processus de remodelage de la membrane dont nous avons parlé dans le premier chapitre. Le cœur de la machinerie ESCRT est constitué des complexes ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III, la protéine accessoire Alix et l'ATPase Vps4 (Tableau2).

	Levure	Mammifères	Fonctions biologiques	
<b>ESCRT-0</b>	Vps27	HRS (HGS)	MVB	
	Hse1	STAM1, STAM2	MVB	
<b>ESCRT-I</b>	Vps23	TSG101		
	Vps28	VPS28	MVB, Bourgeoisement	
	Vps37	VPS37A, B, C, D	viral, cytokinèse	
	Mvb12	MVB12A MVB		
<b>ESCRT-II</b>	Vps22	EAP30, SNF8		
	Vps25	EAP20	MVB	
	Vps36	EAP45		
<b>ESCRT-III</b>	Vps20	CHMP6	MVB	
	Vps32/Snf7	SNF7A/CHMP4A; SNF7B/CHMP4B; SNF7C/CHMP4C	MVB, Bourgeoisement	
	Vps2/Did4	VPS2A/CHMP2A VPS2B/CHMP2B	viral, cytokinèse	
	Vps24	CHMP3		
	Vps60/Mos10	CHMP5	MVB, cytokinèse	
	Vps46/Did2	DID2A/CHMP1A DID2B/CHMP1B	MVB, Bourgeoisement viral, cytokinèse	
	Aucun	CHMP7	MVB, Bourgeoisement viral	
	Ist1	IST1	MVB, cytokinèse	
	<b>Complexe Vps4</b>	Vps4	VPS4 A, B / SKD1	MVB, Bourgeoisement
		Vta1	LIP5	viral, cytokinèse
<b>Protéine accessoire</b>	Vps31	Alix/AIP	MVB, Bourgeoisement viral, cytokinèse, taille des neurones, apoptose...	

**Tableau 2 : Composants de la machinerie ESCRT**  
(Adapté de Saksena et al., 2007; Hurley and Hanson, 2010)

Les complexes ESCRT-I et ESCRT-II activent et orchestrent le processus de scission membranaire en recrutant le complexe ESCRT-III vers les sites de scission. Le complexe ESCRT-III est un complexe dynamique capable de polymériser en un complexe hétérologomérique au niveau de la membrane. Chez l'homme, il existe 12 protéines constituant le complexe ESCRT-III (Figure 29). Ces protéines sont appelées protéines

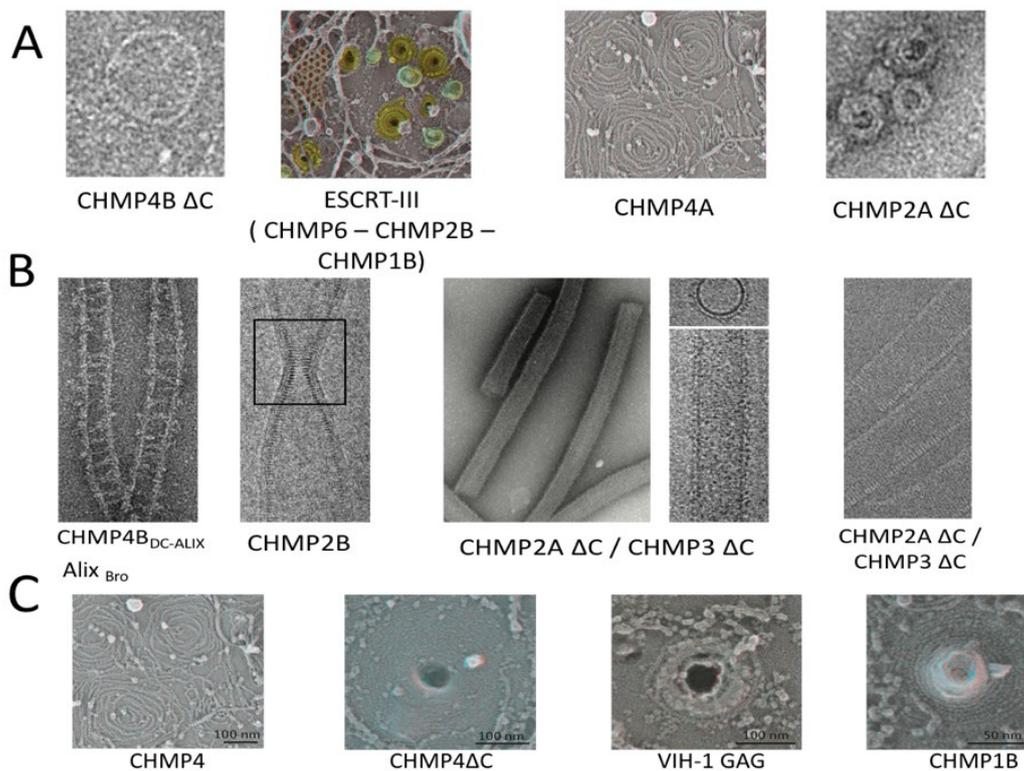
CHMP (Charged Multivesicular Body Protein). Elles ont été initialement découvertes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, lors des études menées sur le transport vésiculaire. Chez la levure, les protéines constituant le complexe ESCRT-III se nomment VPS (vacuolar protein sorting) : Did2 (CHMP1), Vps2 (CHMP2), Vps24 (CHMP3), Snf7 (CHMP4), Vps60 (CHMP5), Vps20 (CHMP6), Chm7(CHMP7) et IST1. Toutes les protéines CHMP possèdent une organisation similaire (Figure 29) (Christ et al., 2017 ; Schöneberg et al., 2017). Ces protéines CHMP sont généralement constituées de 6 hélices  $\alpha$  repliées dans une même structure tridimensionnelle malgré une structure primaire peu conservée (Muzioł et al., 2006). Elles possèdent une extrémité N-terminale basique composée de deux longues hélices  $\alpha$  ( $\alpha1$  et  $\alpha2$ ) suivies de deux autres hélices plus courtes ( $\alpha3$  et  $\alpha4$ ) qui se replient respectivement sur les deux premières hélices. La partie C-terminale, impliquée dans l'autoinhibition ainsi que dans le recrutement d'autres protéines, est généralement composée de deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha5$  et  $\alpha6$ ). A la différence des sous unités des complexes ESCRT-I et -II, qui sont recrutées sur la membrane sous forme de complexes préformés provenant du cytosol, les sous-unités du complexe ESCRT-III résident sous forme de monomères fermés dans le cytosol en l'absence de signaux d'activation et de recrutement (Lata et al., 2008 ; Lin et al., 2005 ; McCullough et al., 2015 ; McMillan et al., 2016 ;(Tang et al., 2016).



**Figure 29 : Le complexe ESCRT-III**

Organisation structurale des 12 protéines du complexe ESCRT-III humain (Schöneberg et al., 2017)

Comme d'autres machines de remodelage de membranes, de nombreux efforts ont été faits pour comprendre comment le complexe ESCRT-III intervient lors du processus de fission membranaire. Le principe général de la réaction de fission, médiée par ce complexe ESCRT-III, repose sur un assemblage transitoire d'une variété de filaments sur la membrane pour induire une courbure de la membrane, ce qui aiderait à resserrer un col de membrane au point où la fission survient. En effet, les protéines du complexe ESCRT-III oligomérisent ou polymérisent sous une grande variété de formes : tubes, spirales, anneaux, filaments ou cônes (Pires et al., 2009 ; Effantin et al., 2013 ; Bodon et al., 2011 ; Lata et al., 2008 ; Hanson et al., 2008 ; Cashikar et al., 2014) (Figure 30).

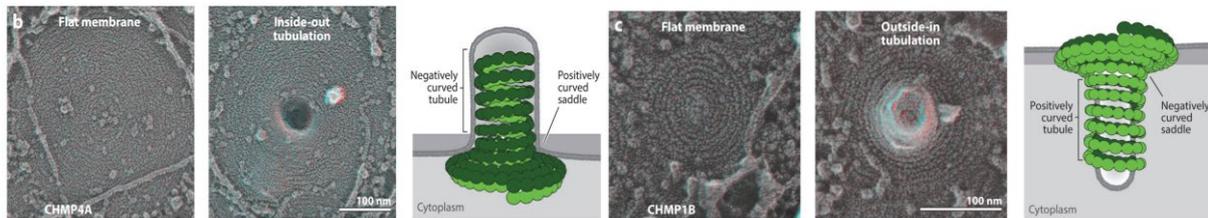


**Figure 30 : Les structures des polymères du complexe ESCRT-III**

Les sous unités du complexe ESCRT peuvent polymériser en un large éventail de structures qui ont toutes été visualisées en microscopie électronique. **A.** Spirales **B.** Tubes **C.** Assemblage en spirales des ESCRT sur la membrane plasmique. (Pires et al., 2009 ; Effantin et al., 2013 ; Bodon et al., 2011 ; Lata et al., 2008 ; Hanson et al., 2008 ; Cashikar et al., 2014)

Il a été montré que la surexpression de la protéine CHMP4A du complexe ESCRT-III, dans une cellule humaine dépourvue de l'activité de l'ATPase VPS4 induit l'extrusion de tubules membranaires incurvés négativement à partir de la membrane plasmique. Ces tubules sont remplis de spirales de filaments fins d'ESCRT-III (Figure 31). En revanche, la

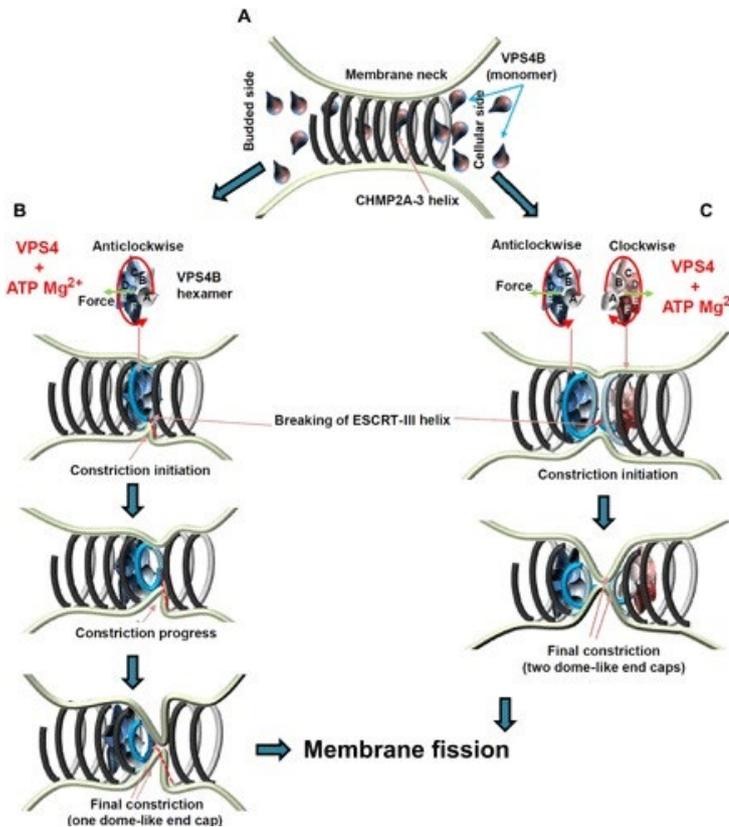
surexpression de la protéine CHMP1B du complexe ESCRT-III, dans une cellule dépourvue de l'activité de l'ATPase VPS4 induit l'invagination de tubules membranaires incurvés positivement à partir de la membrane plasmique (Figure 31). Dans ce cas, les minces filaments d'ESCRT-III s'enroulent à l'extérieur du tubule. Ces études ont permis de montrer que les différents filaments ESCRT-III peuvent stabiliser des tubules membranaires dans des directions opposées.



**Figure 31 : Modèle de remodelage de la membrane par les ESCRT**

Les deux premiers panneaux présentent des photos de microscopie électronique de cellules humaines surexprimant CHMP4A (Hanson et al. 2008, McCullough et al. 2015). Les filaments cytoplasmiques contenant CHMP4A peuvent s'assembler sur des membranes plates et peuvent favoriser l'extrusion des tubules membranaires. Le troisième panneau montre une représentation schématique de cette extrusion. Les trois derniers panneaux montrent des photos de microscopie électronique de cellules humaines surexprimant la protéine CHMP1B. Les filaments de CHMP1B peuvent stabiliser les membranes plates et les tubules de la membrane plasmique incurvée positivement et ainsi promouvoir les réactions de fission membranaire de l'extérieur vers l'intérieur (Cashikar et al. 2014, Hanson et al. 2008, McCullough et al. 2015).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les filaments ESCRT-III et l'ATPase Vps4 catalysent ensemble le remodelage, la constriction et la fission des membranes (Chiaruttini and Roux, 2017 ; Fabrikant et al., 2009 ; Chiaruttini et al., 2015 ; Peel et al., 2011 ; Saksena et al., 2009 ; Schöneberg et al., 2017 ; Azad et al., 2022). Un des modèles implique les filaments CHMP2A-CHMP3 (Figure 32)(Maity et al., 2019). Dans ce modèle, CHMP3 et CHMP2A vont être recrutés au niveau d'un col membranaire. Ils vont s'assembler en un hétéropolymère. Au fur et à mesure de sa progression, la surface externe du polymère impose à la membrane une réduction de diamètre et fournit l'énergie nécessaire à la fermeture du col membranaire. 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 par désassemblage du polymère.



**Figure 32 : Modèle de constriction membranaire induite par les filaments ESCRT-III CHMP2/CHMP3 (Caillat et al., 2019)**

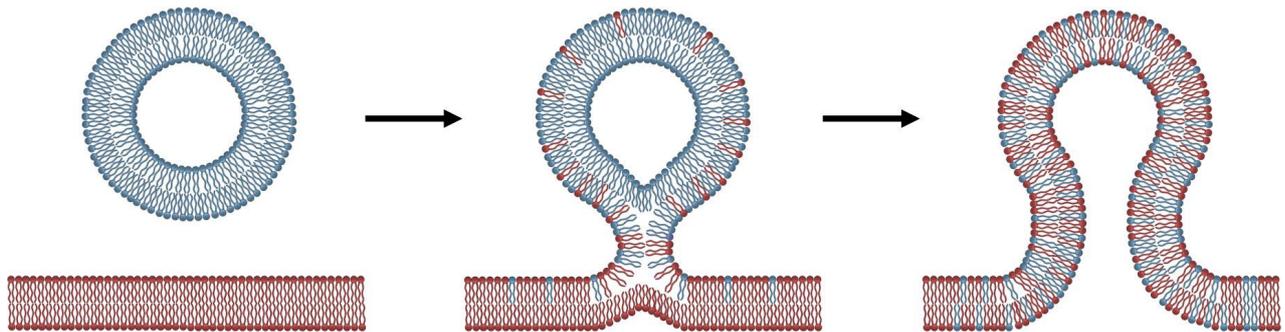
A. Les filaments hélicoïdaux CHMP2A-CHMP3 s'assemblent au niveau d'un col de membranaire B. VPS4 forme une structure hexamérique en présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ . Cette structure est capable de s'assembler au milieu des filaments ESCRT-III. L'assemblage d'un complexe VPS4 pourrait être suffisant pour conduire à la constriction de la membrane et au clivage du filament CHMP2A-CHMP3. C. Alternativement, deux complexes VPS4B adjacents remodelent les filaments CHMP2A-CHMP3 conduisant ainsi à la génération de deux coiffes terminales en forme de dôme et au clivage du filament CHMP2A-CHMP3.

La structure de filaments CHMP2A-CHMP3 recouverts de membrane a été obtenue par cryo-microscopie électronique à une résolution de 3,6 Å (Azad et al., 2022). Elle révèle des filaments hélicoïdaux assemblés par les hétérodimères de protéines CHMP2A-CHMP3 en conformation ouverte. Les interactions inter-filaments sont électrostatiques, ce qui facilite le glissement des filaments lors du remodelage du polymère médié par VPS4. Des données par microscopie à force atomique montrent que ces mêmes polymères de CHMP2A-CHMP3 et l'ATPase VPS4 peuvent resserrer et couper les tubes membranaires, agissant ainsi comme un mécanisme minimal de fission membranaire.

Il semble que les différentes structures observées et les différents modèles proposés répondent à la variété des processus cellulaires dans lesquels la machinerie ESCRT-III est impliquée.

### C. Mise en évidence expérimentale de la fusion membranaire

La fusion membranaire est un processus qui consiste en l'assemblage de deux membranes. Lors de ce processus, les lipides des deux membranes sont mélangés et le contenu respectif des deux compartiments sont fusionnés (Figure 33).



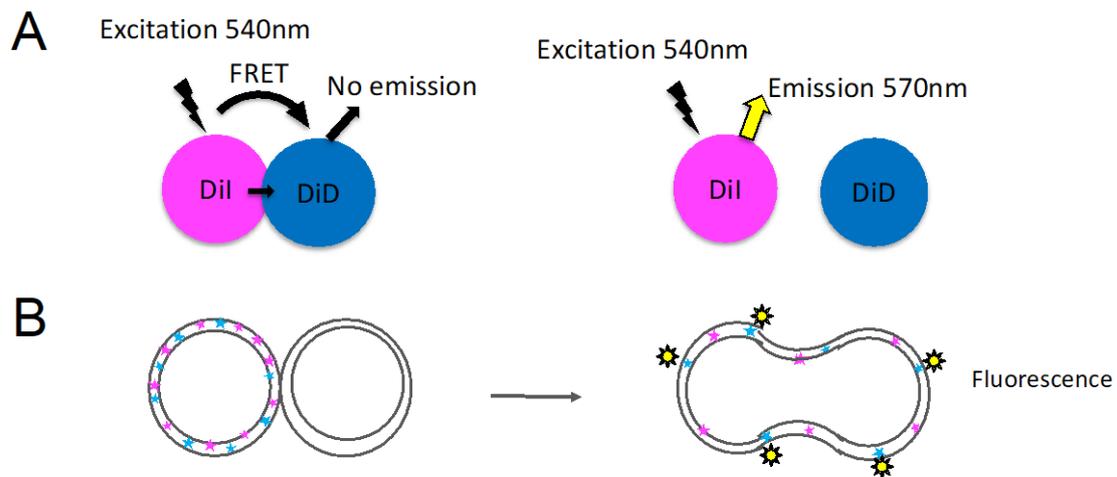
**Figure 33 : Diffusion de lipides lors de la fusion membranaire de deux bicouches lipidiques (Schéma provenant de la Thèse de Claire François Martin «Mesure expérimentale de l'énergie d'activation de la fusion de membranes lipidiques»)**

Dans un premier temps les membranes se rapprochent localement. Une distorsion locale favorise la formation d'une connexion lipidique entre les feuillets des membranes. Cette connexion s'étend pour former le stade d'hémifusion. Finalement, il y a la formation d'un pore qui conduit à la fusion complète.

Toute molécules, protéines de fusion ou ions déclenchant la fusion des bicouches lipidiques et catalysant ce passage de barrières d'énergie est communément appelées fusogène. Plusieurs études menées sur des systèmes membranaires artificiels *in vitro* tels que les liposomes, les larges vésicules unilamellaires (LUV), les vésicules unilamellaire géantes (GUV), ont mis en évidence qu'il existe des fusions membranaires indépendantes de protéines, induites en utilisant des compositions lipidiques particulières (Lira et al., 2019), des peptides (Mora et al., 2020), des ions multivalents comme le calcium ou le magnésium ou des stimuli physiques tels que des nanoparticules d'or chauffées optiquement (Bolognesi et al., 2018) ou des impulsions électriques (Haluska et al., 2006). De nombreuses technologies ont été mises en œuvre afin de pouvoir visualiser ce processus de fusion membranaire et de nombreux efforts sont réalisés pour en développer de nouvelles. Dans cette partie, je décrirais certaines d'entre elles.

## 1. Reconstitution de membranes cellulaires in vitro

Dans l'optique de mettre en évidence ce processus de fusion membranaire, un des modèles de choix reste la reconstitution de membranes cellulaires : liposomes, GUV (Giant Unilamellar Vesicle), LUV, associé à des essais de transfert d'énergie par fluorescence (FRET). Le FRET est un processus de transfert entre deux molécules fluorescentes appelées donneur et accepteur. Lorsque le donneur est excité et qu'il est suffisamment proche de l'accepteur, alors l'énergie du donneur est absorbée par l'accepteur. Par contre, si le donneur est assez éloigné de l'accepteur, le donneur sera capable d'émettre de la fluorescence. Pour que ce transfert d'énergie puisse avoir lieu, les molécules fluorescentes doivent remplir deux conditions. Dans un premier temps, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur. Deuxièmement, comme il a été spécifié auparavant, les deux molécules fluorescentes doivent être suffisamment proches l'une de l'autre (Figure 34).



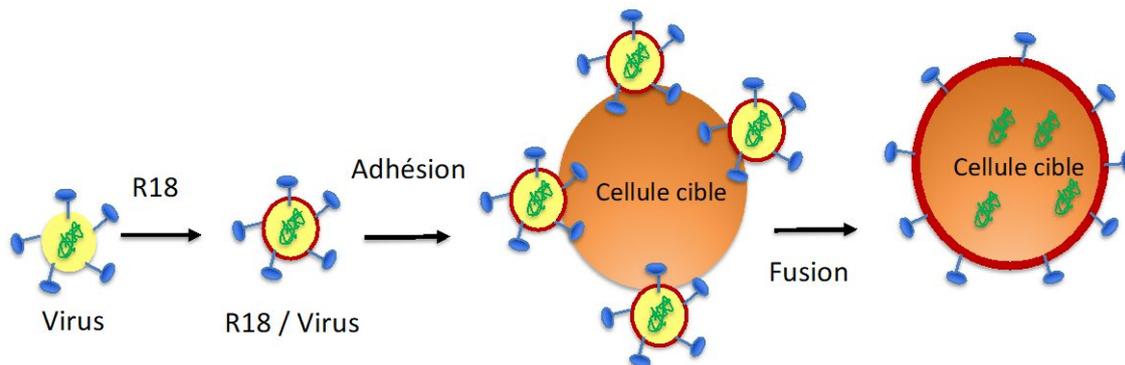
**Figure 34 : Mise en évidence de la fusion membranaire grâce au FRET**

**A.** Principe du FRET: Le FRET est un processus de transfert d'énergie entre deux fluorophores: l'un donneur nommé DiI (rose), l'autre accepteur nommé DiD (bleu).

Panneau de gauche: Si le donneur (rose) est excité et qu'il est suffisamment proche de l'accepteur (bleu), le donneur cède une partie de son énergie à l'accepteur. Il n'y a pas d'émission de fluorescence à la longueur d'onde d'émission du donneur. Panneau de droite : Si le donneur (rose) est excité et qu'il est suffisamment loin de l'accepteur (bleu), le donneur sera capable d'émettre de la fluorescence.

**B.** Le test de fusion membranaire consiste à observer la fusion d'une membrane contenant des lipides fluorescents de deux types (donneur et accepteur) avec une membrane non fluorescente. Si les deux membranes fusionnent, les fluorophores présents sur la première membrane vont diffuser sur la deuxième membrane, ce qui va provoquer la dilution des sondes fluorescentes. Lorsque l'on excite le donneur et que l'on suit son intensité de fluorescence, celle-ci augmentera puisque le donneur transférera moins d'énergie au profit de l'accepteur (diminution du FRET par dilution).

Afin de mesurer la fusion des virus avec les cellules cibles, une méthode similaire est utilisée : la méthode de « dequenching ». Le colorant lipophile octadecylrhodamine R18 est incorporé dans les membranes virales. A forte concentration, le colorant n'émet pas de fluorescence, on parle de « self quenching ». La fusion entraînant une dilution de ce colorant, a pour effet, une augmentation de la fluorescence : « dequenching » (Figure 35).

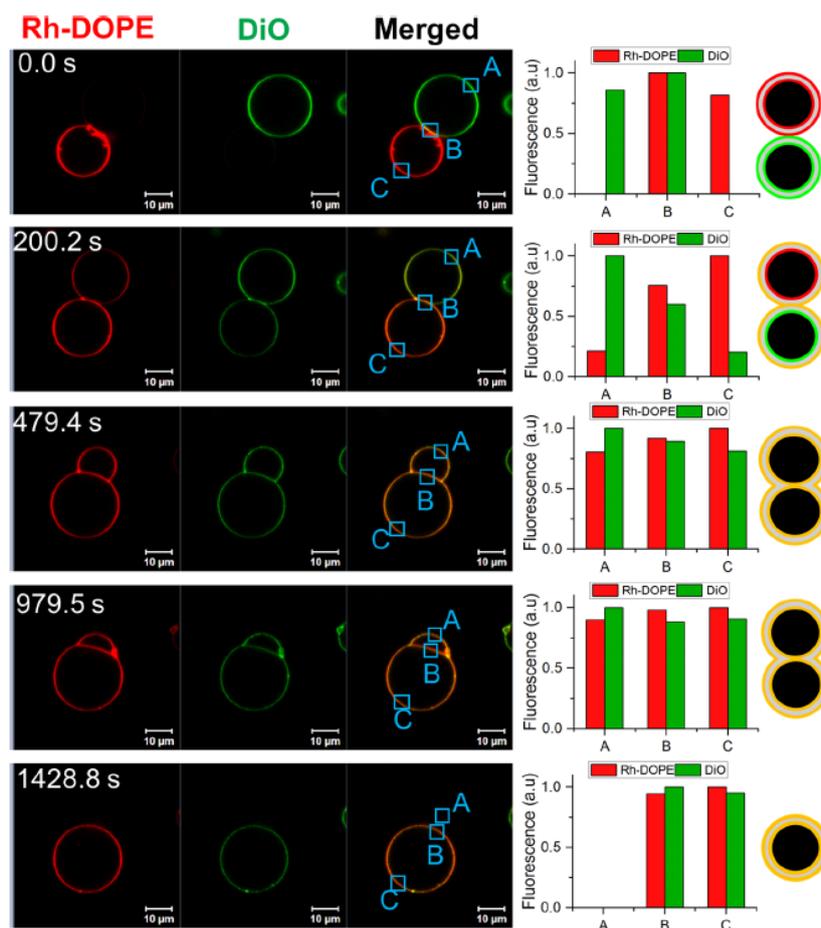


**Figure 35 : Redistribution du fluorophore R18 pendant la fusion virale (Schéma adapté de Blumenthal et al., 2002)**

Le colorant lipophile R18 est incorporé dans les virions. Lors de la fusion, le R18 est redistribué et dilué dans la membrane des cellules cible, le « self quenching » est levé : on parle de « dequenching », la fluorescence augmente.

## 2. Microscopie confocale à fluorescence

Les vésicules unilamellaires géantes (GUV) sont des modèles couramment utilisés en biologie pour imiter la membrane plasmique. Elles constituent d'excellents candidats pour l'étude de processus biologiques complexes comme la fusion membranaire lorsqu'elles sont associées à de la microscopie confocale à fluorescence (Figure 36).

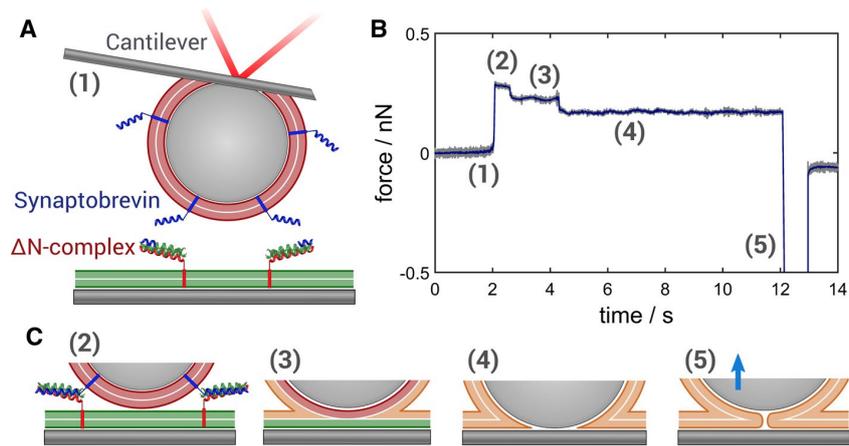


**Figure 36 : Exemple de fusion des GUV induite par des billes de SiO<sub>2</sub> (Arribas Perez and Beales, 2021)**

Les images de microscopie confocale montrent les étapes du processus de fusion. Les GUV sont marquées avec Rh-DOPE (canal rouge) ou avec le colorant DiO (canal vert). Les diagrammes montrent l'intensité de fluorescence de chaque fluorophore mesuré au niveau des carrés bleus. Les dessins sont des représentations schématiques du mélange des lipides et des transformations topologiques qui se produisent à ce moment précis.

### 3. Les sondes colloïdales et microscopie à force atomique

Les sondes colloïdales sont des sphères lisse de 10 microns de diamètre collées sur un micro levier (Figure 37). Montée sur le microscope à force atomique (AFM), la sonde colloïdale permet d'étudier les forces d'interactions entre surfaces dans une géométrie sphère-plan bien définie. Les sondes colloïdales recouvertes de membranes offrent un avantage supplémentaire par rapport aux membranes fixées à des supports solides, une géométrie tridimensionnelle plus complexe. Cette combinaison en fait un système modèle puissant qui permet la visualisation de processus biologiques dynamiques et une dépendance minimale aux marqueurs fluorescents.

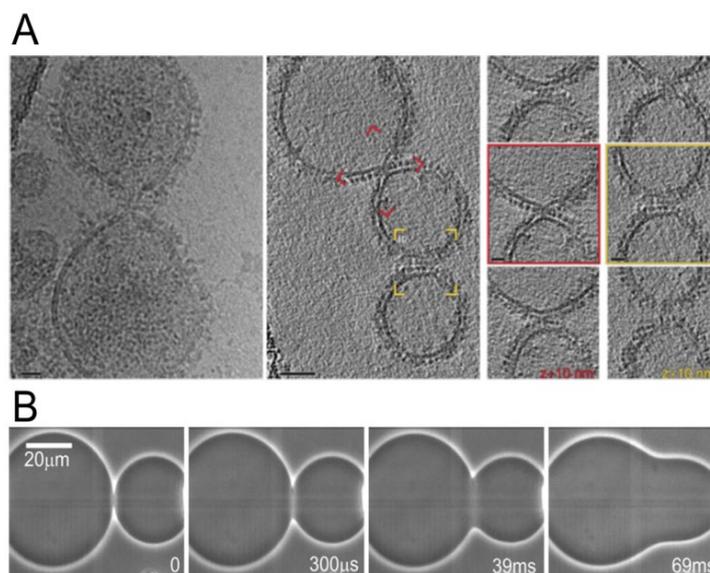


**Figure 37 : Illustration de la microscopie à sonde colloïdale (Witt et al., 2021)**

A. La sonde colloïdale est recouverte d'une bicouche lipidique et est mise en contact avec une membrane plane, toutes deux portant des protéines de fusion. B. Tracé typique de l'expérience de fusion. C. Les différents événements de fusion : (2) formation du complexe SNARE, (3) hémifusion, (4) fusion complète et (5) détachement de la surface.

#### 4. Camera CCD

Les différentes sortes de microscopies, la microscopie électronique, la microscopie à balayage, la diffraction des rayons X produisent, elles aussi, des images détaillées des produits de fusion. Cependant, elles ne peuvent produire que des images de structures immobilisées sur la surface d'un substrat. La vidéo-microscopie optique est une nouvelle technique prometteuse qui permet d'imager la dynamique de la fusion des bicouches lipidiques et de capturer des événements de l'ordre de 50 microsecondes (Figure 38).



**Figure 38 : Images de fusion membranaire**

A. en cryo microscopie électronique (Zeev-Ben-Mordehai et al., 2014)  
 B. en vidéo microscopie optique (Haluska et al., 2006)

## 5. Test biochimique

Les tout premiers évènements de fusion intercellulaire ont été mis en évidence par des tests biochimiques. Rothman et ses collaborateurs ont étudié le transport de la glycoprotéine membranaire G, exprimée en abondance pendant l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). La modification différentielle des chaînes d'oligosaccharides de la protéine G pendant le transit intragolgien fournissait l'outil biochimique indispensable pour suivre le transport de la protéine à travers les différents compartiments du Golgi. Le test était plus particulièrement basé sur la dernière modification effective dans le compartiment de Golgi médian à savoir l'acquisition de la résistance au clivage par l'endoglycosidase H après l'addition du sucre terminal N-acetylglucosamine. Il consistait simplement à incuber deux homogénats ensemble l'un produit à partir de cellules mutantes 15B infectées par le VSV (donneur), et l'autre produit à partir de cellules sauvages non infectées (accepteur). La protéine Endo H sensible (provenant des membranes 15B donneuses) pouvait alors être traitée par l'enzyme NAGT-I (N-Acetyl-Glucosamine Transférase I) présente dans les membranes cellulaires de type sauvage et devenir par la suite Endo-H résistante. Ce test de complémentation mettait en évidence la fusion membranaire intracellulaire.

#### IV. Objectifs de l'étude

Comme nous venons de le voir, la protéine accessoire Alix, est présente dans de nombreux processus cellulaires impliquant un remodelage de la membrane. Notre laboratoire et d'autres équipes ont montré qu'elle était capable de dimériser via son domaine V central, fonction nécessaire, entre autres, pour le bourgeonnement du VIH-1 (Pires et al., 2009). Bien que des structures monomériques de ses domaines V et Bro-1 aient été résolues, à ce jour, aucune information structurale à haute résolution n'est disponible pour sa forme dimérique. Malgré le fait que de nombreux partenaires de liaison d'Alix soient connus, le processus physiologique qui induit sa dimérisation et son rôle exact dans la régulation des complexes ESCRT, sont encore mal compris. Sachant que ces monomères ne peuvent induire la formation de dimère en solution, nous proposons l'hypothèse que la dimérisation de la protéine Alix impliquerait des changements conformationnels significatifs de la protéine. De nombreuses études conduisent à une idée, maintenant largement répandue, selon laquelle la protéine Alix existe sous deux formes, une forme monomérique fermée inactive et une forme dimérique ouverte active. Il reste donc à définir comment la protéine Alix est activée (dimérisation) pour coordonner le complexe ESCRT-III à différents emplacements cellulaires. L'activation de la protéine Alix serait régulée par plusieurs phénomènes distincts, comprenant entre autres, les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, qui libère l'auto-inhibition (Sun et al., 2016), l'ubiquitination (Dores et al., 2015) et par l'interaction avec des adaptateurs membranaires comme CEP55 (Carlton and Martin-Serrano, 2007) et Alg-2 (Suzuki et al., 2008).

Dans l'optique de comprendre ce processus de dimérisation, ce projet de thèse s'articule donc autour de trois grands points.

*- La résolution de la structure cristalline du dimère du domaine V de la protéine Alix.*

Ricardo Pires avait initialisé ce travail, rendu difficile par l'importante flexibilité de la molécule et la difficulté d'obtenir un dimère pur. J'ai donc concentré mes efforts sur l'amélioration du protocole de purification et sur l'obtention d'un dimère plus homogène. J'ai ensuite poursuivi ce travail en utilisant des nanocorps afin de bloquer la flexibilité de

la molécule qui restait un frein à la cristallisation et à la résolution de la structure cristallographique.

*- La formation du complexe Alix entière /Alg-2 et la résolution de sa structure en microscopie électronique.*

Au début de mon travail de thèse, seules la structure de la protéine Alg-2 et la structure de la protéine Alix monomérique dépourvue de son domaine PRD étaient connues. Ce deuxième point a deux objectifs, à savoir la possibilité de résoudre la structure de la protéine Alix entière et de déterminer si l'interaction avec son partenaire Alg-2 est nécessaire et suffisante pour la dimérisation de la protéine Alix. Pour cela, j'ai mis au point la purification, l'isolation du complexe, réalisé de la microscopie électronique par coloration négative et de la cryo-microscopie électronique.

*- Étude de l'interaction de la protéine Alix avec un modèle membranaire (liposomes).*

De nombreux travaux ont mis en évidence que la protéine Alix est capable d'interagir avec les membranes via son domaine Bro-1. Mes travaux ont cherché à savoir si l'interaction avec les lipides est nécessaire et suffisante pour la dimérisation de la protéine Alix et mesurer les conséquences de cette interaction sur les bicouches lipidiques.



# **Matériels et Méthodes**



## 1<sup>ère</sup> partie : Clonage et expression des protéines

### I. Clonage, expression et purification des différentes constructions d'Alix

#### 1. Mutagenèse dirigée

Le plasmide Alix V 358-714 pGEX6P, clone numéro 4 de Ricardo Pires est utilisé comme ADN parental pour la mutagenèse dirigée selon la méthode Quick Change (Stratagene). La mutagenèse s'effectue par PCR avec le programme suivant : 95°C pour 3min, (95°C pour 30s, 55°C pour 9min, 65°C pour 5min) 30 fois. Les produits de réactions sont ensuite digérés l'enzyme DpnI 1hr à 37°C (Thermo Fisher Scientific). Ceci permettant de digérer tous les sites méthylés et ainsi sélectionner spécifiquement l'ADN nouvellement synthétisé. Après transformation, les cellules TOP10 d'*E.coli* sont étalées sur milieu sélectif. Les plasmides ont été extraits par minipréparation d'ADN plasmidique et les séquences sont vérifiées par Eurofins genomic.

Liste des primers :

Clones	primer forward	primer reverse
QC1A S481A	CAAAGGACTCCA <b>GCCA</b> ATGACCT GTAC	GTACAGGTCATT <b>GGCT</b> TGGAGTCCTTTG
QC1E S481E	CAAAGGACTCCA <b>GAA</b> AATGACCT GTAC	GTACAGGTCATT <b>TTCT</b> TGGAGTCCTTTG
QC8 S568A-S577A	AAGGAAAGAGAG <b>GCC</b> CTTGAGA ATGACCTGAAG <b>GCCG</b> TGAATTTT GAC	GTCAAATTCAC <b>GGCC</b> TTTCAGGTCATTCTCAAG <b>GGC</b> CTCTCTTTCCTT
QC10 T422A-T432A	ATACTTACCAAG <b>TCTGCC</b> TCTGT AGTTGAACAGGGAGGCATCCAG <b>GCC</b> GTCGACCAGCTG	CAGCTGGTCGAC <b>GGC</b> CTGGATGCCTCCCTGTTC AACTACAGA <b>GGC</b> AGACTTGGTAAGTAT

#### 2. Expression et purification de la protéine Alix ΔPRD

L'ADN codant pour la forme tronquée en C-terminal de la protéine Alix ΔPRD - *mus musculus* (UniProtKB/Swiss-prot Q9WU78) (clone de Remy Sadoul) a été recloné dans le vecteur pETM11 contenant une étiquette Histidine. Des cellules compétentes *Escherichia coli* BL21(DE3) sont transformées avec le plasmide pETM11/Alix ΔPRD et incubées une nuit à 37°C sur une plaque de LB agar (Miller) contenant 100µg/ml de kanamycine. L'expression de la protéine de fusion HIS-Alix ΔPRD est induite avec 0.1mM

isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) lorsque la  $DO_{600}=0.6$  pendant 4h à 37°C. Les cellules sont centrifugées 15 min à 6500rpm dans le rotor JLA8.1000 (Beckman). Le culot est resuspendu dans 25ml de tampon A (50mM Tris-HCl pH7.5 ; 100mM NaCl ; 2mM  $\beta$ mercaptoethanol). Les cellules sont lysées par sonication. Le lysat est centrifugé 20min à 20.000rpm dans le rotor JA25.50 (Beckman) et le surnageant est chargé sur une colonne de nickel préalablement équilibrée dans le tampon A. L'élution de la protéine est obtenue avec le tampon A supplémenté de 250mM d'imidazole, elle est suivie en utilisant une solution de bradford (Bio rad). La protéine est ensuite chargée sur une colonne de filtration sur gel Superdex S200 Increase (GE Healthcare) prééquilibrée dans le tampon HBS (20mM Hepes pH 7.5 ; 150mM NaCl).

### **3. Expression et purification des différents mutants de la forme dimérique du domaine V d'Alix**

Des cellules compétentes *Escherichia coli* Rosetta sont transformées avec le plasmide pETM11/Alix-V et incubées une nuit à 37°C sur une plaque de LB agar (Miller) contenant 100 $\mu$ g/ml de kanamycine et de chloramphénicol. L'expression de la protéine de fusion His-Alix-V est induite avec 0.1mM isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) lorsque la  $DO_{600}=0.8$  pendant 3h à 37°C. Les cellules sont centrifugées 15 min à 6500rpm dans le rotor JLA8.1000 (Beckmann). Chaque culot est resuspendu dans 25ml de tampon A (50mM Tris-HCl pH7.5 ; 100mM NaCl ; 2mM  $\beta$ mercaptoethanol). Les cellules sont lysées par sonication. Le lysat est centrifugé 20min à 20.000rpm dans le rotor JA25.50 (Beckmann) et le surnageant est chargé sur une colonne de nickel préalablement équilibrée dans le tampon A. Un lavage est réalisé avec du tampon A supplémenté de 10mM imidazole. Enfin, La protéine est éluée avec le tampon A supplémenté de 250mM d'imidazole, l'élution est suivie en utilisant une solution de Bradford (Bio rad). Le tag histidine est clivé avec la protéase TEV (1/100, ON , 4°C) (EMBL). Afin d'enlever le tag histidine, la protéine clivée préalablement dialysée dans 4 litres de tampon A est chargée sur une deuxième colonne de nickel pré-équilibrée dans le tampon A. Le non retenu contenant la protéine non taguée Alix-V est mis en dialyse dans 4 litres de tampon B (25mM Bis Tris pH6.3). Afin de s'affranchir d'une certaine quantité de monomère de la protéine Alix-V, une colonne MonoP (GEHealthcare) est réalisée. La colonne monoP est équilibrée avec le tampon B. La protéine est chargée sur la colonne et est éluée à pH=4

avec le tampon C (100ml de Pharmalyte (4-6.5 : 2ml /3 -10 : 500ul) pHer à pH4 avec de l'acide chlorhydrique glacial) (GEHealthcare). Afin d'éviter la précipitation de la protéine, le pH est réajusté en diluant la protéine dans un tampon E (50mM Tris HCl pH8.8 /100mM NaCl) jusqu'à obtenir un pH de 6-7. Un gel natif 10% acrylamide est réalisé afin de choisir les fractions contenant la forme dimérique de la protéine Alix. Chacune des fractions contenant le dimère de Alix sont concentrées dans un concentrateur Amicon Ultra -4 10K MWCO (Millipore) puis chargées séquentiellement sur une colonne de filtration sur gel Superdex S200 Increase (GE HHealthcare) pré-équilibrée dans le tampon D (50mM Tris-HCl pH7.5). Un second gel natif 10% acrylamide est réalisé afin de choisir les fractions contenant la seule forme dimérique de la protéine Alix.

#### **4. Expression en cellules de mammifères et purification de la protéine Alix entière**

Les cellules Hek 293FS sont cultivées dans du milieu freestyle 293 (Gibco, 12338) et maintenues à 37°C sous une atmosphère à 10% CO<sub>2</sub> sous agitation 150 rpm. Le jour de la transfection, une culture de 300ml de suspension cellulaire à 1.10<sup>6</sup> cellules/ml est fraîchement préparée. 300ug d'ADN plasmidique pCi Flag-mAlix wt sont dilués dans 15ml d'Opti-MEM (Gibco, 31985) puis 900ul d'une solution à 1mg/ml de PEI linéaire 25K (Polysciences, 23966) sont ajoutés goutte à goutte. Ce mélange est incubé 20min à température ambiante puis déposé dans la culture de cellule. Après 72h d'expression, les cellules sont culottées à 264g pendant 10 min, lavées avec du PBS1X et lysées dans 75ml de tampon de lyse : 20mM tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% triton X-100, complete EDTA freee (Roche). Après 15 min d'incubation sur glace. Le lysat est alors centrifugé 10 min à 16000g dans le rotor JA25.50 (Beckmann) et le surnageant est chargé sur une colonne Anti Flag préalablement équilibrée dans le tampon A (50mM Tris-HCl pH7.5 ; 100mM NaCl ; 2mM βmercaptoethanol). Enfin, La protéine est éluée avec le tampon 100mM Glycine pH 3.5. Afin de neutraliser la protéine directement à la sortie de la colonne, l'élution est réalisée dans des tubes préalablement remplis avec du tampon E (50mM Tris HCl pH8.8 /100mM NaCl). La dernière étape de purification est une colonne de filtration sur gel Superdex S200 Increase (GE HHealthcare) prééquilibrée dans du tampon HBS (25mM HEPES pH7.5 / 150mM NaCl).

## II. Clonage, expression et purification de la protéine Alg-2

### 1. Clonage d'Alg-2<sub>3des23</sub>

Brièvement, deux sites de restriction BamH1 et Not1 sont insérés aux extrémités de la séquence Alg-2 à cloner par la technique PCR. Les oligonucléotides utilisés sont les suivants

5'-GGATCCATGGCTGACCAGAGCTTCCTGTGGAACGT-3'

3'-GTCTTCAGCATTGTATAGGCGGCCGCTAAACTAT-5'

La séquence amplifiée est purifiée, puis digérée avec les enzymes de restriction BamH1 et Not1. Le plasmide pETM41 est linéarisé par digestion avec les mêmes enzymes et purifié par extraction sur gel. Plasmide et insert sont ligués par la takara DNA ligase. La construction est transformée dans des cellules *Escherichia coli* TOP10 et les colonies positives sont testées par séquençage (eurofins genomics), après digestion-contrôle préalable pour vérification de la présence de l'insert.

### 2. Expression de la protéine Alg-2<sub>3 des 23</sub>

Des cellules compétentes *Escherichia coli* BL21 gold sont transformées avec le plasmide pETM41/Alg-2<sub>3-des23</sub> et incubées une nuit à 37°C sur une plaque de LB agar (Miller) contenant 100µg/ml de kanamycine L'expression de la protéine de fusion MBP-Alg-2<sub>3-des23</sub> est induite avec 0.1mM isopropyl-β-D-galactopyranoside (IPTG) lorsque la DO<sub>600</sub>=0.8 pendant 3h à 37°C. Les cellules sont centrifugées 15 min à 6500rpm dans le rotor JLA8.1000 (Beckman). Chaque culot est resuspendu dans 25ml de tampon A (50mM Tris-HCl pH7.5 ; 100mM NaCl ; 2mM βmercaptoethanol). Les cellules sont lysées par sonication. Le lysat est centrifugé 20min à 20.000rpm dans le rotor JA25.50 (Beckman) et le surnageant est chargé sur une colonne d'amylose préalablement équilibrée dans le tampon A. Puis, La protéine est éluée avec le tampon A supplémenté de 10mM maltose, l'éluion est suivie en utilisant une solution de Bradford (Bio rad). Enfin la protéine est chargée sur une colonne de filtration sur gel Superdex 200 increase (GE HHealthcare) prééquilibrée dans le tampon HBS (20mM Hepes pH 7.5 ; 150mM NaCl).

### III. Production, expression et purification des nanocorps

#### 1. Production des nanocorps

Un dossier a été déposé à INSTRUCT pour obtenir des anticorps à domaine unique. Les anticorps à domaine unique, connus sous le nom de *nanocorps*, sont des anticorps composés d'un seul domaine d'anticorps variable. Comme un anticorps entier, ils sont capables de reconnaître un antigène spécifique. Les nanocorps ont un poids moléculaire de l'ordre de la dizaine de kilodaltons (entre 12 et 15 kDa). Ils sont beaucoup plus petits que les anticorps traditionnels (150 kDa) ou que les fragments Fab (~50 kDa) (Figure 39). Les premiers nanocorps ont été identifiés chez les camélidés, ils sont appelés VHH.

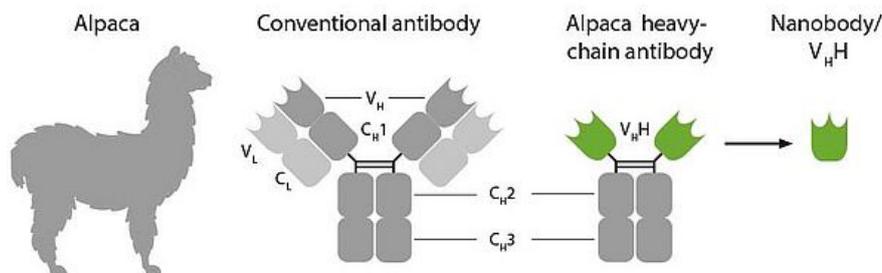
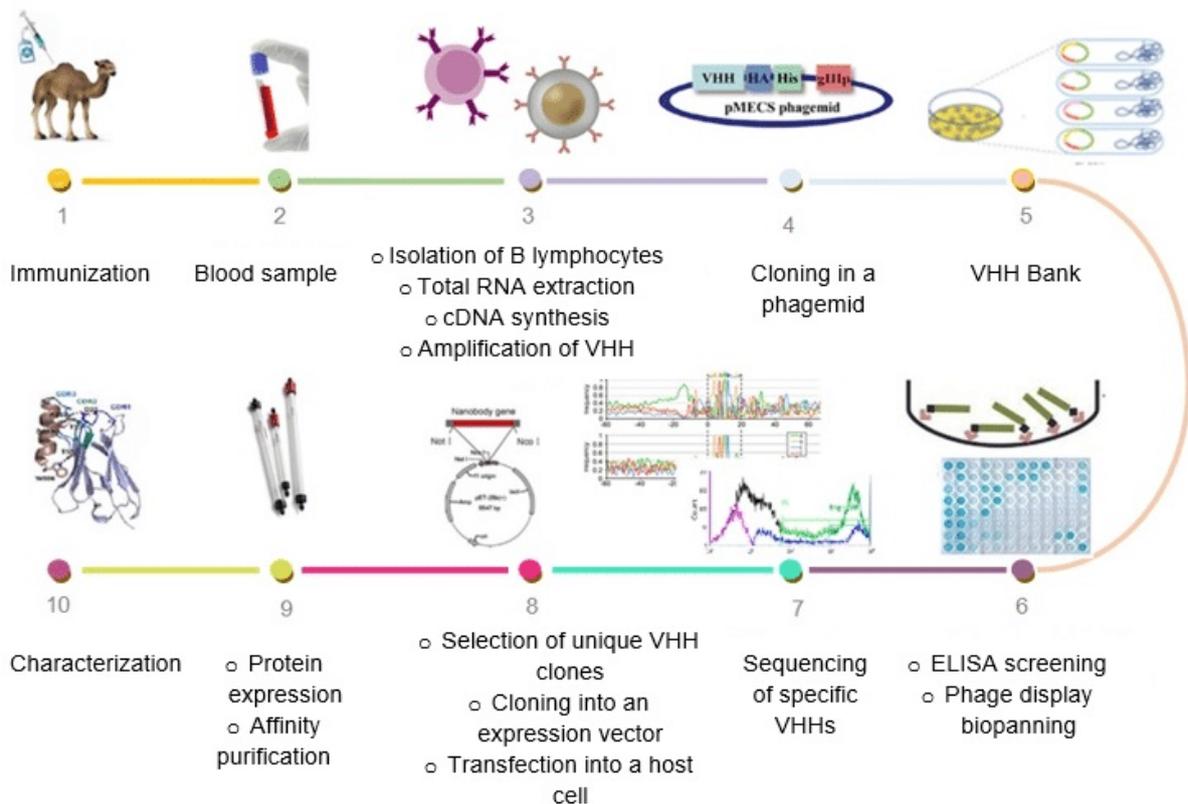


Figure 39 : Anticorps produits par les camélidés

Le centre Nanocorps4Instruct a produit et caractérisé des anticorps à domaine unique (Nanocorps) dirigés contre le domaine V dimérique de la protéine Alix (Alix-V). Ces Nanocorps ont été utilisés comme des chaperons pour aider la cristallisation de la protéine Alix pour laquelle ses états conformationnels transitoires étaient un frein à la détermination de sa structure. La production d'anticorps à domaine unique comprend les étapes suivantes. Tout d'abord, des lamas sont immunisés avec le domaine V dimérique de la protéine Alix. Après l'immunisation, un échantillon de sang est prélevé, le répertoire d'anticorps à domaine unique mûrs *in vivo* est amplifié par RT-PCR et cloné dans des bibliothèques de phages. Les anticorps à domaine unique spécifiques ciblés sont ensuite sélectionnés sur les antigènes souhaités (le domaine V dimérique de la protéine Alix). Enfin, les anticorps à domaine unique sont sélectionnés et caractérisés (Figure 40).



**Figure 40 : Processus de production d'anticorps à domaine unique**

L'ensemble du processus de découverte peut être divisé en plusieurs parties :

- la vaccination : 7 semaines (6 vaccinations)
- l'élaboration et la signature d'un accord de transfert de matériel
- création de bibliothèques : 2 à 3 semaines
- la découverte : 1 à 2 semaines
- le dépistage : 1 à 2 semaines
- analyse des séquences : 1 semaine
- la confirmation des données : 1 semaine

## 2. Expression et purification des nanocorps

Les nanocorps ont été clonés derrière un présignal (PelB signal) qui les dirige vers l'espace périplasmique. Ils portent une étiquette histidine C-terminale (His6 et EPEA). Des cellules compétentes *WK6* ( $Su^-$ ) sont transformées avec les plasmides codants pour les nanocorps et incubées une nuit à 37°C sur une plaque de LB agar (Miller)

contenant 2% de glucose et 100µg/ml d'ampicilline. La préculture des nanocorps se fait dans du LB agar (Miller) supplémenté de 2% glucose et 1mM MgCl<sub>2</sub>, incubées une nuit à 37°C. L'expression des nanocorps est réalisée dans du terrific broth supplémenté de 0.1% glucose et de 2mM MgCl<sub>2</sub> et induite avec 0.1mM isopropyl-β-D-galactopyranoside (IPTG) lorsque la DO<sub>600</sub>=1 sur la nuit à 28°C. Les cellules sont centrifugées 15 min à 6000rpm dans le rotor JLA8.1000 (Beckman). Le culot est resuspendu dans 15ml de tampon TES par litre de culture. Le culot est homogénéisé sous agitation pendant au moins 1h à 4 °C. Un choc osmotique est réalisé en ajoutant 30ml de tampon TES/4 par litre de culture. Le culot est homogénéisé une seconde fois sous agitation pendant au moins 1h à 4 °C. Le lysat est centrifugé 30min à 8.000rpm dans le rotor JA25.50 (Beckman) et le surnageant (fraction périplasmique) est chargé sur une colonne de nickel préalablement équilibrée dans le tampon phosphate pH7. Un lavage est réalisé avec du tampon phosphate pH6. Enfin, La protéine est éluée avec le tampon phosphate pH7 supplémenté de 250mM d'imidazole, l'élution est suivie en utilisant une solution de bradford (Bio rad). Enfin les nanocorps sont chargés sur une colonne de filtration sur gel Superdex 200 increase (GE HHealthcare) prééquilibrée dans le tampon HBS (20mM Hepes pH 7.5 ; 150mM NaCl).

### **3. Complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps**

Le dimère du domaine V du mutant QC8 d'Alix et les nanocorps sont purifiés séparément. Le complexe est formé en présence d'un excès de nanocorps afin de saturer tous les sites d'interaction avec la protéine Alix. Puis le complexe est passé sur une colonne de filtration sur gel Superdex 200 increase (GE HHealthcare) prééquilibrée dans le tampon 50mM Tris HCl pH7.5 afin d'enlever l'excès de nanocorps.

## 2<sup>eme</sup> partie. Méthodes de caractérisation des protéines

### I. Spectrométrie de masse

#### 1. Principe

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique permettant l'ionisation des molécules d'un échantillon puis la séparation et la détection des ions ainsi produits, en fonction de leur rapport masse sur charge noté  $m/z$  ( $m$  étant la masse et  $z$  la charge). La source d'ionisation a pour but de produire des ions en phase gazeuse à partir de l'échantillon étudié. Deux sources d'ionisation sont principalement utilisées pour identifier et/ou quantifier des peptides ou des protéines dans un milieu biologique : le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) permettant d'effectuer des analyses simples et rapides d'un échantillon simplement déposé sur une cible métallique et l'ESI (Electrospray Ionization) généralement couplé à la chromatographie liquide.

L'ionisation par la technique MALDI se déroule en deux étapes (Figure 41 A). Dans un premier temps l'échantillon à analyser est mélangé à une matrice. Cette solution est déposée sur une surface métallique, appelée cible MALDI. Dans un second temps, la cible est introduite dans la source du spectromètre de masse maintenue sous vide et l'échantillon est irradié par de brèves impulsions laser. Ce rayonnement va être absorbé par la matrice et cette irradiation va provoquer, d'une part, l'ionisation de la matrice, et d'autre part, sa sublimation.

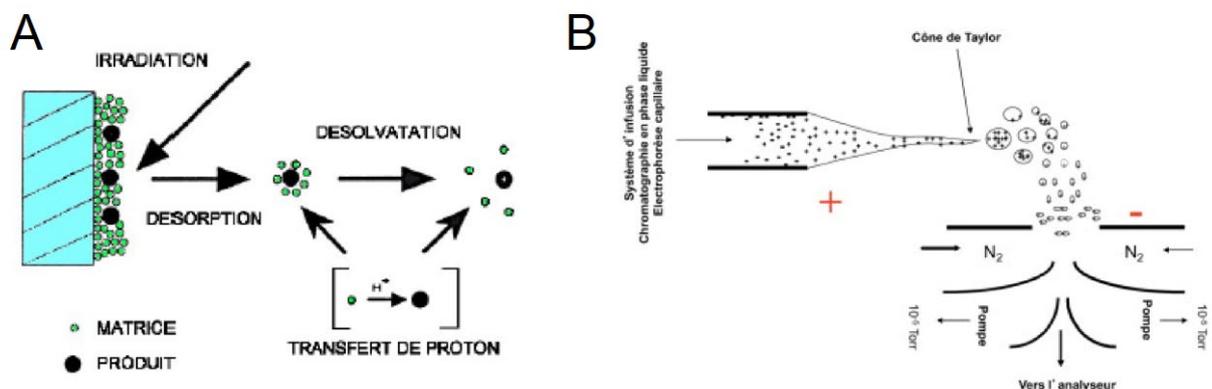


Figure 41 : Schéma du principe d'ionisation par MALDI ou ESI  
A. MALDI B. ESI

L'électro-nébulisation (« electrospray ») (Figure 41 B) consiste à pulvériser une solution, à ioniser les espèces qui y sont présentes et à en assurer l'évaporation, ceci en appliquant un champ électrique sur un liquide traversant un capillaire (nébuliseur). Le champ électrique créé entre ce capillaire et une contre électrode dans un flux d'azote chaud permet la création de gouttelettes chargées. Ces gouttelettes soumises à une atmosphère chaude vont éclater par « explosion coulombienne ». Pour des petites molécules organiques, l'ion formé est ionisé une seule fois. Pour un peptide ou une protéine, le nombre de charges positives par ion dépend du nombre d'acides aminés basiques contenus dans la molécule.

## **2. Contrôle qualité par spectroscopie de masse dénaturante ESI**

Afin de contrôler que les protéines purifiées : Alix-V QC8, Alix  $\Delta$ PRD, Alix FL, Alg-23-des23 et les deux nanocorps notés NB79 et NB76, possèdent bien le poids moléculaire attendus, les échantillons protéiques purifiés sont soumis à une caractérisation par spectroscopie de masse par ionisation electrospray (ESI : Electrospray Ionisation) réalisée par la plateforme de spectroscopie de masse de l'IBS. Un volume de 10 $\mu$ l d'échantillon à 10 $\mu$ M dans le tampon 50mM tris HCl pH7.5 est donné à la plateforme pour analyse par spectrométrie de masse par electrospray ou par MALDI.

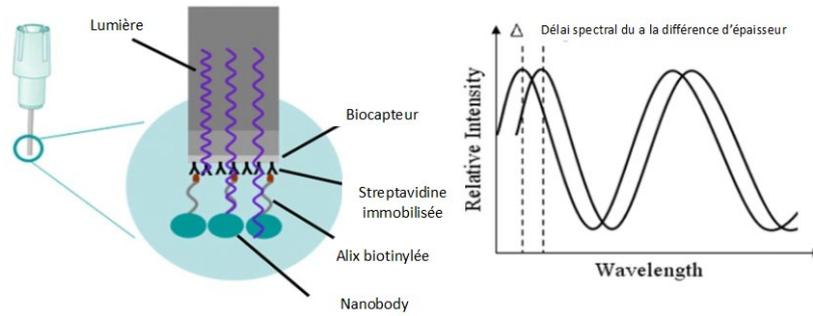
## **3. Spectrométrie de masse en conditions natives**

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe Alix QC8 dimérique/nanocorps NB79, un volume de 10 $\mu$ l de complexe à 10 $\mu$ M dans le tampon 250mM ammonium acétate pH7 est soumis à une analyse de spectroscopie de masse en conditions non dénaturantes.

## **II. BLI : bio layer interferometry**

### **1. Principe**

Le BLI est une technique optique qui mesure les variations d'épaisseur optique à la surface d'un biocapteur grâce aux interférences créées lors de la réflexion d'un faisceau lumineux à la surface du biocapteur et à la surface de la couche biomoléculaires (Figure 42).

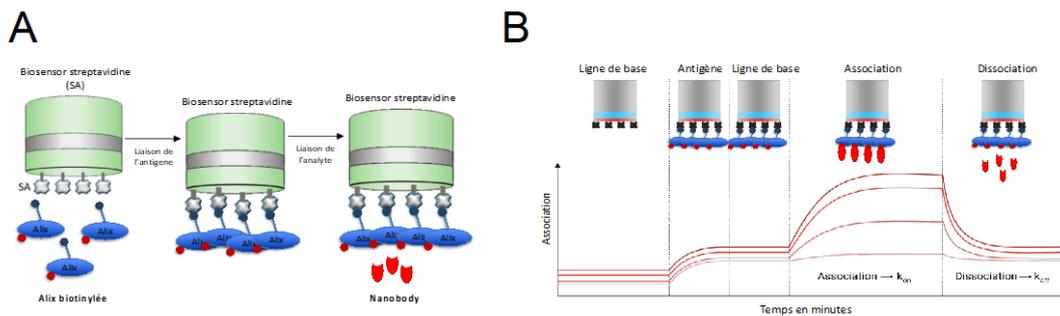


**Figure 42 : Principe du BLI**

Le BLI utilise l'interférence produite par deux réflexions lumineuses d'une source unique pour mesurer l'association/dissociation d'une molécule cible sur la surface du capteur.

## 2. Caractérisation de l'affinité des oligomères des différentes constructions d'Alix pour les nanocorps

Les différents oligomères des différentes constructions de la protéine Alix sont biotinylés suivant le protocole du kit de « biotinylation des protéines pour immobilisation sur des biosensor streptavidine » de ForteBIO. Les protéines sont ensuite passées sur une colonne de dessalage ZebaSpin Desalting de ThermoScientific afin d'enlever toute la biotine non fixée. Une analyse pilote est réalisée pour chacune des constructions afin de déterminer la concentration à utiliser des deux partenaires étudiés. Des concentrations de protéine biotinylée de 1 µg /ml, 10 µg /ml et 50 µg /ml sont testés. Pour l'analyte, c'est-à-dire les nanocorps, une concentration de 100nM est testée.



**Figure 43 : Caractérisation de l'affinité de la protéine Alix avec les nanocorps par BLI**

**A.** Représentation schématique du fonctionnement du BLI (bio-layer interferometry) utilisant des biocapteurs streptavidine (SA) pour caractériser les constantes d'affinités des différentes constructions de la protéine Alix avec les Nanocorps.

**B.** Étapes expérimentales d'un sensorgramme de BLI. : I) Ligne de base initiale : tampon A (II) Liaison de la biomolécule (Alix biotinylée) sur le biosensor streptavidine. (III) Ligne de base: tampon A (IV) Liaison/association de l'analyte (Nanocorps) sur le biosensor. (V) Dissociation de l'interaction dans le tampon A

Une fois l'analyse pilote réalisée, une cinétique est effectuée (Figure 43 B). Les sensors streptavidine sont coatés avec la protéine Alix biotinyllée à 25 µg/ µl. La dilution de la protéine pour obtenir cette concentration finale est réalisée dans le tampon A : 50mM Tris HCl pH7.5 complémenté de 0.02% Tween-20. Une gamme de nanocorps est utilisée : 0nM, 3.13nM, 6.25nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM, 200nM. La gamme est réalisée de la même manière que pour le ligand, dans le tampon A. L'étude cinétique comprend 4 grandes parties : la ligne de base, l'étape d'association, l'étape de dissociation et la régénération des biocapteurs afin de faire des triplicats (Ligne de base :120s ; chargement du ligand : 600s ; association : 300s ; dissociation : 600s ; régénération dans 10mM glycine pH3 :30s.) (Figure 43B). Les données obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel Forte Bio. Les constantes d'affinités, d'association et de dissociation peuvent ainsi être déterminées.

### **III. Ultracentrifugation analytique**

Afin de vérifier l'état oligomérique de la protéine Alg-2 une ultracentrifugation analytique a été réalisée sur trois concentrations 0.3 mg/ml, 0.9 mg/ml et 2.4 mg/ml. Les expériences de vitesse de sédimentation ont été effectuées à 42000 rpm, à 4°C, sur une ultracentrifugeuse analytique XLI avec le rotor Anti-50 (Beckman Coulter, Brea, USA), et des cellules à doubles canaux de 12 et 3 mm de trajet optique équipée de fenêtres de Saphir (Nanolytics, Potsdam, DE). La référence utilisée est le tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. L'acquisition a été faite en absorbance à 280 et en interférence.

Les données ont été traitées par le logiciel REDATE v 1.0.1.

Les analyses ont été faites avec les logiciels SEDFIT v 16.36 et GUSI 1.4.2.

Les paramètres ont été :

- Pour le tampon : calculés avec le logiciel SEDNTERP v 1.1
- Pour les molécules : calculés avec le logiciel SEDFIT v 16.36

### **IV. Cristallographie aux rayons X**

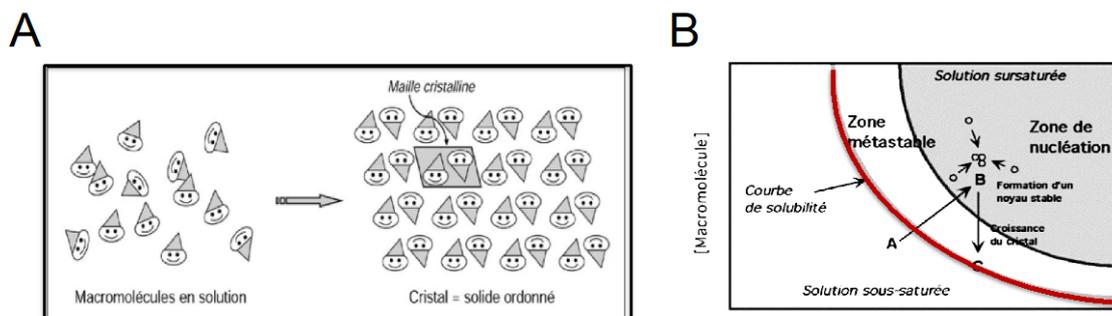
La cristallographie aux rayons X est une technique de référence pour la détermination de structures tridimensionnelles de protéines à l'échelle atomique.

Cette technique comprend trois phases :

- 1) La cristallisation de la protéine
- 2) L'enregistrement et le traitement des données de diffraction des rayons X
- 3) La résolution de la structure à partir des données de diffraction, qui nécessite à la fois une étape de phasage et un processus d'affinement de la structure.

## 1. Principe

La cristallisation consiste à faire passer la protéine d'un état libre en solution à un état solide et ordonné ; l'état cristallin. Pour cela, une solution protéique pure est placée dans des conditions particulières (sels, concentration de protéine, pH, agents précipitants) permettant de diminuer lentement sa solubilité afin de favoriser les interactions spécifiques intermoléculaires et ainsi organiser la protéine sous forme cristalline (Figure 44).



**Figure 44 : Principe de la cristallisation**

**A.** La macromolécule quitte la solution pour former une phase solide ordonnée, le cristal. Le motif moléculaire répété par translation le long du réseau cristallin est appelé maille cristalline

**B.** Diagramme du processus de cristallogénèse. (Claude Sauter et Richard Giegé 2001)

Au niveau de la courbe de solubilité (en rouge), le cristal et la solution sont en équilibre thermodynamique. Au-delà de cette courbe, la solution est dite sursaturée. Plus la macromolécule s'enfonce dans cette zone, plus la sursaturation est élevée. Elle constitue la force motrice de la nucléation en fournissant à la macromolécule l'énergie nécessaire à la production d'un noyau stable (en B), à partir duquel un cristal va croître jusqu'au retour à l'équilibre.

Le but de la cristallisation va donc être de trouver un compromis entre la concentration en protéine et la concentration en agent précipitant afin d'amener la protéine dans la zone de nucléation, sans pour autant faire précipiter la protéine.

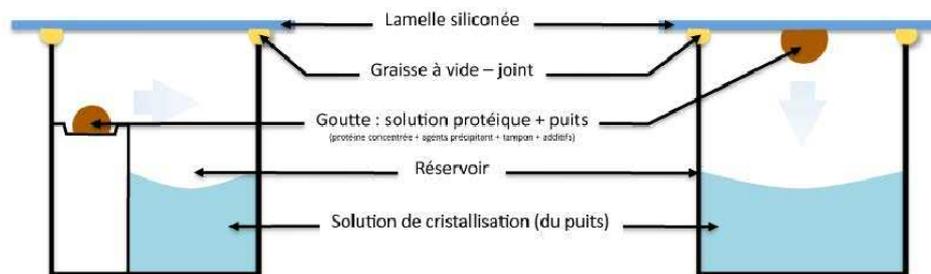
La recherche des conditions de cristallisation s'effectue sous forme de criblage à haut débit en raison de nombreux paramètres qui influencent la cristallisation :

- la pureté de la protéine
- la concentration en protéine

- la nature des agents précipitants et leur concentration
- le pH : il détermine à la fois la stabilité de la protéine mais aussi l'état de charge de la protéine.
- la présence ou non de ligands : ils peuvent induire un changement conformationnel pouvant rigidifier des parties flexibles de la protéine et donc, aider à la cristallisation.
- la présence ou non d'additifs : leur nature peut être très variée (ions, alcools, détergents, peptides, sucres, métaux, etc...). Ils peuvent favoriser la cristallisation de la protéine.
- la température : Elle affecte la stabilité et la solubilité de la protéine. Elle a une influence majeure sur la cinétique de cristallisation.

## 2. Techniques de cristallisation

Plusieurs techniques permettent de diminuer progressivement la solubilité de la protéine afin de l'amener à un état cristallin. La plus utilisée est la diffusion de vapeur, mais cela peut également se faire par dialyse, ou par batch. Dans ce travail, c'est la cristallogenèse par diffusion de vapeur qui a été utilisée. La diffusion de vapeur repose sur l'équilibration entre une goutte de solution de la protéine d'intérêt mélangée à une solution de précipitation, et d'un réservoir contenant de la solution de précipitation. Des lors, une diffusion de vapeur entre la goutte et le réservoir se produit. Dans des conditions favorables, la protéine va atteindre la zone de nucléation. Celle-ci peut être mise en place selon deux techniques : la goutte suspendue ou la goutte assise (Figure 45).



(a) Schéma de la méthode de la goutte suspendue et de la goutte assise

### Figure 45 : Principe de cristallisation par diffusion de phase vapeur en goutte suspendue ou en goutte assise.

Lors de la méthode dite «en goutte suspendue», un volume de solution protéique est déposé sur une fine lamelle auquel est ajouté un volume de solution mère. Pour ce qui est de la méthode en « goutte assise », le mélange est déposé dans un cavalier.

### **3. Criblage de conditions de cristallisation**

Les premiers tests de cristallisation sont réalisés avec 6 plaques commerciales de la plateforme de cristallisation à haut débit de l'EMBL ; JCSG-plus (Molecular Dimensions), Wizard (Emerald BioSystems), SaltRX (Hamptonresearch), PEG/Ion Screen (Hampton research), Classic. Ces premiers tests permettent un criblage de 96 conditions différentes et de connaître ainsi le comportement de la protéine dans différentes conditions de pH, de force ionique et l'agent précipitant à utiliser de préférence.

Les boîtes sont placées à 20 °C et l'évolution des gouttes est suivie à l'aide du robot de cristallisation.

### **4. Congélation et enregistrement des données de diffraction**

Les cristaux de protéines contiennent un pourcentage important de solvant (entre 30 à 70%). Il est donc primordial de protéger le cristal contre la formation de glace, qui pourrait endommager le cristal, et donc affecter son pouvoir de diffraction. D'autre part, lors de l'enregistrement des données de diffraction au synchrotron, les cristaux sont soumis à des rayons X très intenses. Ces rayonnements induisent la formation de radicaux libres ou des phénomènes d'ionisation qui entraînent la dégradation de la protéine et du cristal. Afin de protéger les cristaux de la formation de glace et éviter les dommages dus aux radiations, ils sont préalablement trempés dans une solution de cryoprotection ; solution de réservoir supplémentée avec 25% d'éthylène glycol. Les cristaux sont ensuite congelés dans de l'azote liquide.

### **5. Traitement des données**

Les ondes diffusées par le cristal sont décrites par une amplitude et une phase qui seront utilisées afin de calculer une carte de densité électronique. Dans un premier temps, l'amplitude est déduite de l'intensité des tâches de diffraction alors que la phase de l'onde est perdue au cours de l'expérience de diffraction. Celle-ci sera obtenue soit par phasage expérimental soit par remplacement moléculaire.

Tous les traitements des données ont été réalisés par Pauline Macheboeuf et Carlos Contreras-Martel. Dans un premier temps, les clichés de diffractions sont indexés par le programme XDS (Kabsch, 2010) afin d'analyser la répartition des tâches de diffraction sur le cliché et de déterminer les paramètres de maille du cristal. Ensuite, les intensités des tâches de diffraction sont intégrées puis mises à l'échelle et enfin

moyennées afin de comparer des réflexions équivalentes par symétrie. Le programme STARANISO (Tickle et al., 2018) est utilisé pour la détermination de la résolution maximale de diffraction.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu résoudre le problème de la phase par la méthode du phasage par diffusion anormale. En effet, la position des diffuseurs anormaux dans le cristal peut être déterminée grâce à l'excitation du cristal à une longueur d'onde proche du seuil d'absorption du diffuseur anormal.

Dans le but d'obtenir des phases, de nombreuses stratégies ont été testées : l'obtention de cristaux avec une protéine marquée à la selenométhionine, le trempage et la cocrystallisation de la protéine avec des métaux lourds tels que, le mercure (HgCl<sub>2</sub>), le nitrate d'argent, le chlorure de rubidium, le potassium dicyanoaurate, l'ammonium hexabromoplatinate, le potassium hexachloro osmate, le strontium chloride ou des lanthanides (XO<sub>4</sub>, HDPO<sub>3</sub>A, DO<sub>3</sub>A, DPA). Tous les cristaux ont montré un faible pouvoir de diffraction. Le trempage dans un cluster de bromure de tantale (Jena bioscience), en termes de signal anormal, a été un peu plus satisfaisant mais est restés insuffisant pour résoudre la structure de la protéine.

Nous avons également utilisé la technique du remplacement moléculaire qui nécessite une structure d'une protéine homologue ayant une identité de séquence d'environ 30%. Nous avons utilisé le programme Phaser (McCoy, 2007) et le modèle de la protéine monomérique (PDB 2OJQ). La structure a ensuite été complétée par des cycles de reconstruction par le programme COOT (Emsley & Cowtan, 2004) et d'affinement par le programme Refmac (Mrshodov, 2011) de la suite CCP4 afin d'obtenir la structure finale. La validation de la structure a été effectuée avec les programmes MOLPROBITY (Davis et al., 2007) et PROCHECK (Laskowskiet al.,1993).

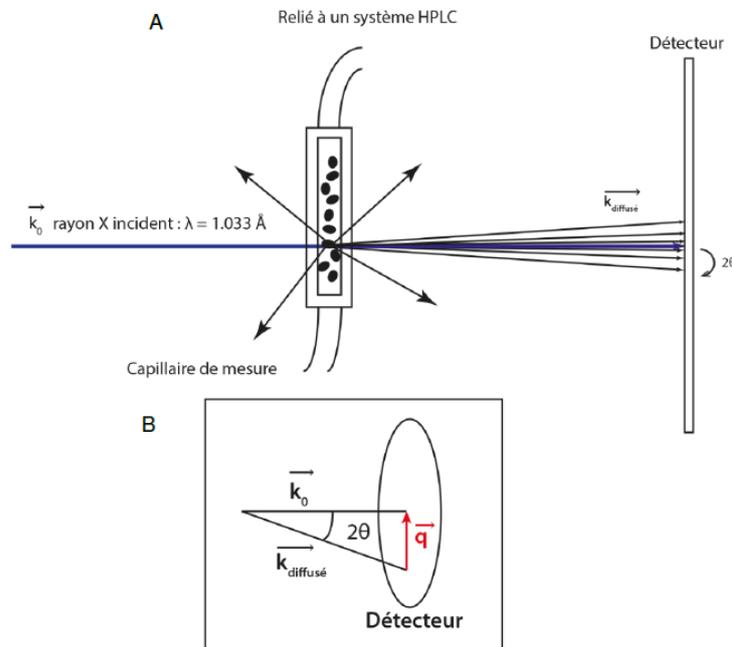
## **V. Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)**

### **A. Principe et acquisition des données**

Le SAXS permet de déterminer la masse moléculaire, les dimensions et la forme globale d'une protéine en solution. Cette technique d'étude structurale est parfaitement adaptée à l'étude d'objets qui présentent une certaine flexibilité en solution, qui rend leur cristallisation très difficile. Le SAXS constitue de cette façon une approche complémentaire à la cristallographie, mais aussi à la RMN puisqu'il n'y a pas de limitation de taille pour l'objet étudié. Les données enregistrées sont en revanche à faible résolution.

Il est difficile d'estimer une résolution en SAXS, puisque cette méthode permet de déterminer l'enveloppe globale de la protéine, mais il est admis que les données enregistrées présentent une résolution limite supérieure à la dizaine d'Angström. Le SAXS, tout comme la cristallographie, est basé sur l'interaction des rayons X avec les électrons de la protéine. Le faisceau de rayons X est diffusé au contact de la protéine, et les rayons diffusés aux petits angles vont être analysés sur un détecteur. Les données diffusées à angle nul sont en revanche non mesurables dû à la présence d'un beam stop pour protéger le détecteur du faisceau direct.

Toutes les mesures sur les mutants de la protéine Alix ont été réalisés sur la ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL avec l'aide d'Aurélien Thureau et de Thibaut Crépin. Cette ligne de lumière permet de réaliser des mesures de SEC-SAXS. Elle est couplée à une chromatographie d'exclusion stérique en HPLC. Ce système a un très gros avantage car il permet une dernière purification de l'échantillon avant la mesure, et permet ainsi d'éviter une contamination délétère par des agrégats éventuels, ou de faire des mesures sur des complexes protéiques en séparant le complexe des protéines dissociées (Figure 46).



**Figure 46 : Description du principe du SAXS.**

**A.** Sur la ligne SWING de SOLEIL, le capillaire de mesure est couplé à une colonne de type SEC couplée à un système HPLC, ce qui permet de séparer les agrégats de la protéine d'intérêt. Le faisceau X incident  $k_0$  interagit avec l'échantillon protéique. L'échantillon va alors diffuser les rayons X dans toutes les directions. Le détecteur est placé à une distance variant de 1 à 4 m de l'échantillon pour enregistrer le rayonnement diffusé aux petits angles ( $0,1^\circ$  à  $\gamma^\circ$ ). **B.** vecteur de diffusion  $q$ :  $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ ;  $\lambda$  la longueur d'onde et  $2\theta$  l'angle de diffusion;  $q$  a les dimensions de l'inverse d'une distance, et est exprimé généralement en  $\text{\AA}^{-1}$  ou  $\text{nm}^{-1}$

Les données expérimentales consistent en une courbe d'intensité ( $I$ ) en fonction du vecteur de diffusion  $q$ . Cette diffusion est enregistrée aux petits angles ( $0,1-10^\circ$ ) sous forme d'un cliché de diffusion. Après mesure du signal, les intensités obtenues pour le tampon sont soustraites à celles enregistrées pour la solution protéique afin d'obtenir des informations concernant la protéine uniquement. Les données sont ensuite traitées grâce à différents logiciels décrits par la suite. Il est alors possible de calculer le rayon de giration  $R_g$ , la fonction de distribution des distances  $P(r)$  et le diamètre maximum  $D_{max}$  de la molécule.

## B. Traitement et analyse des données

### 1. Loi et représentation de Guinier

La loi de Guinier permet d'approximer l'intensité  $I(q)$  par la relation :

$$\ln I(q) = \ln I(0) - (R_g^2 q^2 / 3)$$

L'application de cette loi, nous permet de déterminer le rayon de giration  $R_g$  de la protéine à partir de la pente de la droite ainsi que d'extrapoler l'intensité diffusée à angle nul  $I(0)$ . Cette représentation, appelée représentation de Guinier, nous permet d'autre part de déterminer la qualité des mesures et de l'échantillon, la linéarité étant un gage de la qualité des données (Figure 47).

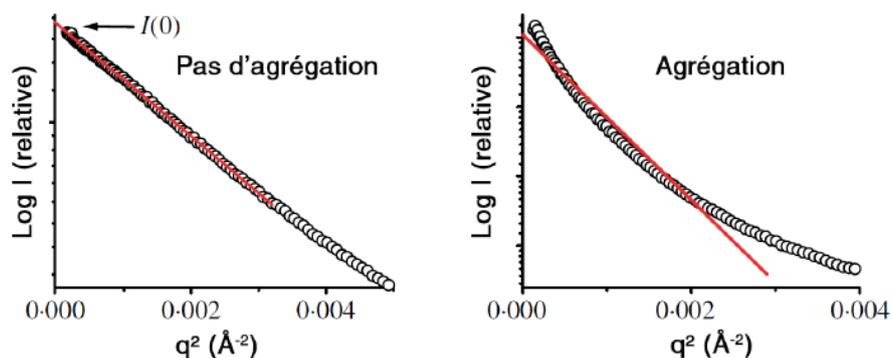
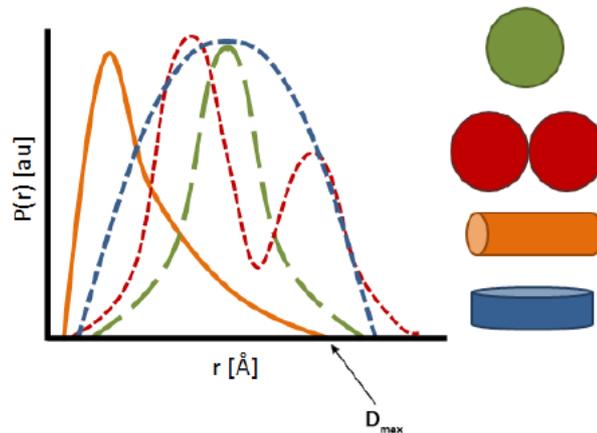


Figure 47 : Représentation de Guinier des données SAXS (adapté de Putnam, et al.,2007)

### 2. Fonction de distribution de distance

Cette fonction est calculée grâce à la transformée de Fourier inverse de la courbe de diffusion. Le calcul de la fonction de distribution de distance se fait via le programme GNOM de la suite ATSAS (Svergun, 1992). Cette fonction permet de définir la distance

maximale entre deux électrons au sein de la protéine étudiée appelée  $D_{max}$ . L'allure de la fonction de distribution de distance renseigne également sur la forme de l'objet en solution (Figure 48).



**Figure 48 : Fonction de distribution de distance (Nyman, & Fullmer, 2015)**

Plusieurs fonctions de distribution de distance sont représentées ici. Chaque courbe correspond à une des formes représentées sur la droite. La  $D_{max}$  pour la courbe en orange représentant un cylindre est indiqué à titre d'exemple.

### 3. Interprétation des données SAXS et modélisation structurale

Plusieurs programmes, majoritairement présents dans la suite ATSAS, sont ensuite utilisés pour interpréter les données SAXS. Ces programmes cherchent généralement à corrélérer les courbes de diffusion calculées pour les modèles qu'ils proposent, à la courbe de diffusion expérimentale. Pour cela, un facteur de corrélation est calculé : le chi.

### 4. Calcul d'enveloppe *ab-initio*

Le SAXS permet de déterminer l'enveloppe de la protéine à basse résolution grâce notamment à un programme appelé DAMMIN (Svergun, 1999). Ce programme crée un modèle à partir de pseudo-atomes de rayon variable. En effet, à partir d'une forme compacte de pseudo-atomes, d'un diamètre correspondant à la  $D_{max}$  de la protéine, le programme va procéder à des cycles. A chaque cycle, DAMMIN va supprimer des pseudo-atomes et/ou les réarranger dans l'espace, en gardant comme contrainte la valeur de la  $D_{max}$  (Figure 49). Une courbe de diffusion théorique est alors calculée à partir du modèle afin de la faire correspondre au mieux à la courbe de diffusion expérimentale. Pour chaque modèle, dix calculs de formes sont effectués. Les enveloppes sont ensuite superposées par

les logiciels DAMSUP et SUPCOMB. Puis le logiciel DAMAVER permet de moyennner les enveloppes obtenues. Enfin, elles sont filtrées par le logiciel DAMFILT. Ainsi, seules les portions redondantes entre plusieurs enveloppes sont conservées.

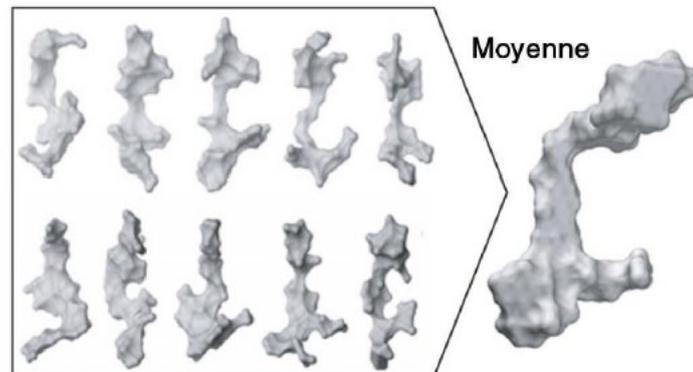


Figure 49 : Modèles générés par le logiciel DAMMIN

## 5. Comparaison de structures aux données SAXS

Un des points intéressant du SAXS est de pouvoir comparer les structures à haute résolution résolues par cristallographie aux données en solution. En effet, il arrive parfois que les structures cristallographiques de certaines protéines ne reflètent pas leur état physiologique en solution. Pour cela le programme CRY SOL (Svergun, *et al.*, 1995) calcule une courbe de diffusion théorique pour la structure à haute résolution et la superpose ensuite à la courbe de diffusion expérimentale. Si un désaccord apparaît, des programmes de dynamique moléculaire peuvent être utilisés pour générer de la diversité dans les modèles, permettant ainsi d'améliorer l'accord entre les données calculées et expérimentales.

## VI. Microscopie électronique

La microscopie électronique a été utilisé pour plusieurs projets. Le premier, afin de déterminer la structure du complexe Alix  $\Delta$ PRD /NB96, le deuxième afin de déterminer la structure du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> et le dernier afin d'imager les liposomes en présence ou non de la protéine Alix. Les différents échantillons sont analysés en coloration négative au SST 2% pour l'étude des complexes ou l'acétate d'uranyle pour les

liposomes par Guidenn Sulbaran. De la cryo-microscopie électronique a été réalisée sur un échantillon de complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> par Gregory Effantin. En bref, 3.5 µL d'échantillon ont été appliqués sur des grilles Quantifoil en cuivre (Q 1.2/1.3) puis congelés dans l'éthane liquide avec un Vitrobot Mark IV (ThermoFischer Scientific). Les grilles ont été observées avec un cryo microscope électronique de type Glacios (ThermoFischer Scientific) à 200 kV. Les images ont été acquises avec une caméra de type K2 Summit (Gatan/Ametek) à un grandissement de 36,000 avec le logiciel SerialEM

### ***3<sup>eme</sup> partie : Interaction avec la membrane***

#### **I. Reconstitution en Liposomes**

##### **1. Préparation des liposomes**

Les liposomes ont été préparés en utilisant des lipides synthétiques fournis par Avanti Polar Lipids (DOPE:DOPS:DOPC :PI ; 2:3:4 :1 ) à une concentration de 1mg/ml. Le chloroforme dans lequel sont solubilisés les lipides est évaporé sous un léger flux d'azote gazeux. Puis les lipides sont placés dans un dessiccateur sous vide pendant une nuit afin d'éliminer les dernières traces résiduelles de chloroforme. Le film lipidique ainsi formé est alors repris dans 1 ml de tampon HBS (50mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl). Afin d'obtenir une suspension lipidique homogène, les lipides sont extrudés 20 fois au travers d'une membrane de polycarbonate (Whatman® Nuclepore™ Track- Etched Membranes, Sigma-Aldrich) ayant des pores de 0,1 µm. La polydispersité et la qualité de la suspension extrudée ont été analysées respectivement par Nanosight et par microscopie électronique à coloration négative.

##### **2. Tests de flottaison des liposomes avec la protéine Alix ΔPRD**

50µl de liposomes à 1mg/ml sont incubés avec 10µl d'Alix ΔPRD à 45 µM pendant 2hr à température ambiante dans 50µl de tampon HBS à pH4.5. Après incubation, l'incorporation de la protéine Alix ΔPRD dans les liposomes est vérifiée sur gradient de saccharose. Le gradient de saccharose, constitué de 4 couches contenant de bas en haut 40, 20, 10 et 0 % de saccharose, est généré dans un tube Ultra-Clear (Beckman Coulter). La première couche au fond du tube contenant une concentration finale de 40%

saccharose a été formée à partir d'un volume équivalent de protéoliposomes et de 80 % de saccharose / HBS pH4.5. Les gradients sont ensuite ultracentrifugés à 50 000rpm pendant 2hr à 4 °C (ultracentrifugeuse Optima XPN-80 et rotor SW 55 Ti – Beckman Coulter). Chaque couche de gradient est ensuite analysée sur gel d'acrylamide 12% SDS-PAGE. Les bandes sont détectées avec un marquage au bleu de Coomassie.

### **3. Test de Fluorescence DiD/DiI**

Les liposomes marqués sont formés comme mentionnés auparavant auxquels, on ajoute 2% (mol/mol) de DiD/DiI. Pour ce test de fluorescence, un mélange de liposomes DiD/DiI et de liposomes non marqués est préparé pour atteindre un ratio final de 1:10 particules fluorescentes par rapport aux liposomes non marqués. L'intensité de la fluorescence du donneur (DiI) est enregistrée. La longueur d'onde d'excitation du DiI est de 540 nm et sa longueur d'onde d'émission est de 570 nm. Au départ, l'émission de fluorescence du DiI est transférée et absorbée par le DiD. Le DiD est appelé « dye quencheur ». Les liposomes marqués sont ensuite incubés avec les liposomes non marqués et la protéine Alix ΔPRD (45uM).

### **4. NTA nanosight**

L'analyse de la distribution de la taille des liposomes a été réalisée en utilisant l'analyse de suivi des nanoparticules (Malvern Instruments Ltd., NanoSight NS300) à 25°C. Les distributions de taille des échantillons ont été obtenues dans une suspension liquide dans du HBS en analysant le mouvement brownien par diffusion de la lumière. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel NTA 2-1 (NanoSight) 260 et tracées à l'aide du logiciel OriginPro.

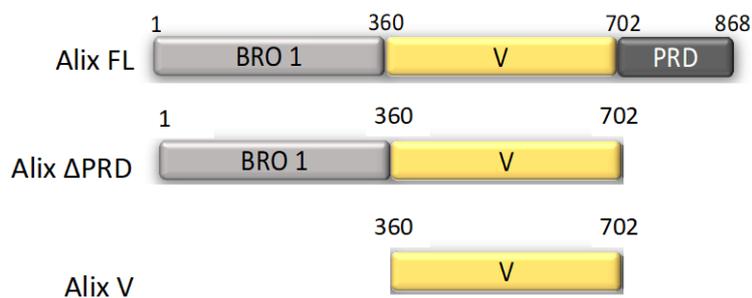


# Résultats



## **1<sup>ère</sup> partie : Étude du dimère du domaine V de la protéine Alix par cristallographie aux rayons X**

Comme, je l'ai dit auparavant, Alix est une protéine cytosolique de 868 acides aminés. Elle est organisée en 3 domaines distincts : Le domaine Bro-1 N-terminal, le domaine V central et enfin le domaine riche en proline C-terminal. Pour plus de clarté, dans la suite de ce manuscrit, voici les différentes constructions de la protéine Alix utilisées au cours de ce travail (Figure 50)



**Figure 50 : Représentation schématique des trois constructions de la protéine Alix utilisées dans ce manuscrit**

La construction entière de la protéine sera notée Alix FL, la construction délétée de sa partie C-terminale riche en proline sera notée Alix  $\Delta$ PRD et la construction contenant seulement le domaine central V sera notée Alix-V.

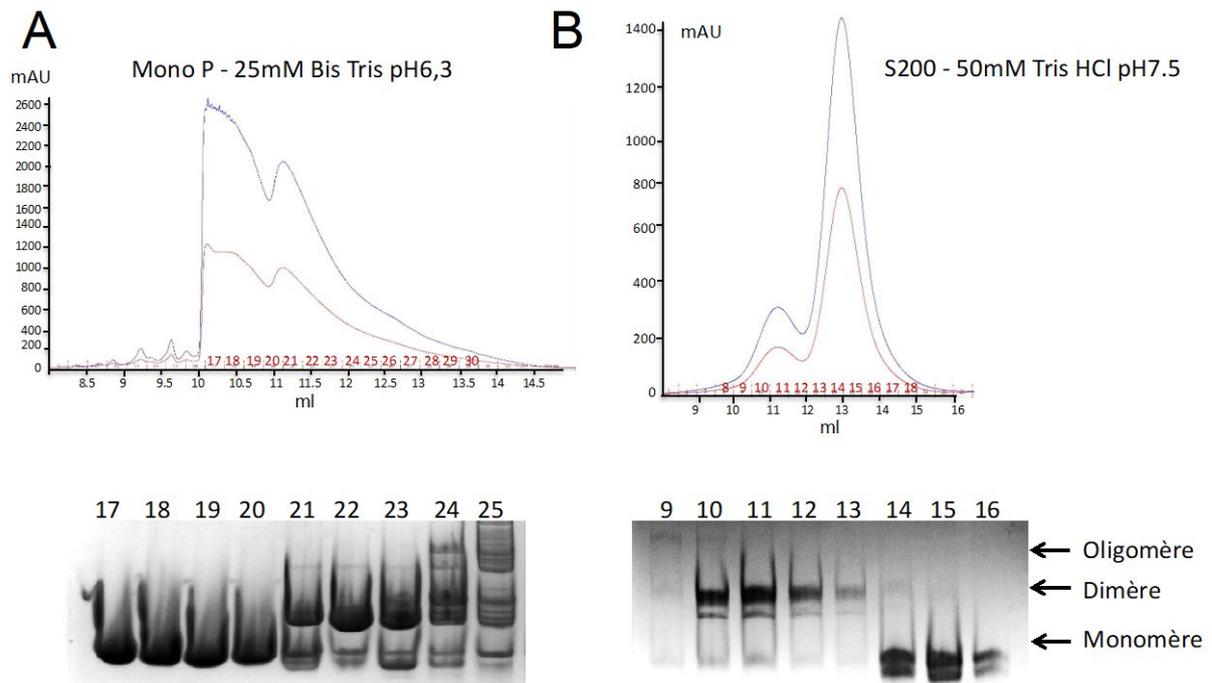
Notre laboratoire et d'autres équipes ont montré que la protéine Alix est capable de dimériser via son domaine V central (Pires et al., 2009). Bien que des structures monomériques cristallographiques des domaines V et Bro-1 aient été résolues (Fisher et al., 2007), aucune information structurale à haute résolution n'est disponible à ce jour, pour la forme dimérique de la protéine Alix. En 2008, le travail de Ricardo Pires, étudiant en thèse dans notre laboratoire a montré que les différents états oligomériques (monomères et dimères) du domaine V de la protéine Alix sont des entités stables lorsqu'elles sont exprimées en bactéries. Ces deux entités ne sont pas en équilibre. D'autre part, il a établi que le phénomène de dimérisation de la protéine est nécessaire au relargage des particules virales montrant ainsi que la forme dimérique serait la forme active de la protéine (Pires et al., 2009). Dès lors, obtenir une information structurale de cette forme dimérique apparaît incontournable dans la compréhension des détails moléculaires de l'activité d'Alix. Des cristaux de la forme dimérique du domaine V de la protéine Alix ont été obtenus par Ricardo Pires. Seulement, ces cristaux ont toujours

montré un faible pouvoir de diffraction. Dès lors mon premier objectif de thèse a été d'optimiser la purification et la cristallisation de la protéine afin d'obtenir des jeux de diffraction à une meilleure résolution que ceux obtenus antérieurement.

## **I. Cristallisation initiale du dimère du domaine V de la protéine Alix**

### **1. Production et purification de la protéine Alix-V dimérique**

Pour améliorer la qualité et l'homogénéité de la solution protéique du domaine V de la protéine Alix, une optimisation du protocole de purification, qui comporte deux étapes de purification supplémentaires, a été réalisée. En effet, après la purification sur colonne d'affinité de nickel, une colonne MonoP (GEHealthcare) a été ajoutée. La colonne monoP permet une élution des protéines en fonction de leur point isoélectrique, cette colonne a permis de s'affranchir d'une certaine quantité de monomère (~80%) de la protéine Alix-V (Figure 51 A - fractions 17 à 20). Les fractions 21 à 24 contiennent le dimère de la protéine (Figure 51 A). Elles sont concentrées et déposées sur filtration sur gel. D'autre part, des colonnes de filtration sur gel Superdex S200 Increase (GE Healthcare) permettant une meilleure résolution ont été commercialisées. Nous avons donc utilisé ce type de colonne pour la dernière étape de purification du dimère (Figure 51 B.). Le profil de chromatographie sur gel présente deux pics, un à 11ml et un à 13ml correspondant respectivement au dimère et au monomère de la protéine Alix-V (Figure 51 B). Les fractions sont déposées sur gel natif et les fractions 10 à 12 correspondants au dimère sont rassemblées et concentrées jusqu'à 18mg/ml pour initier les tests de cristallisation.

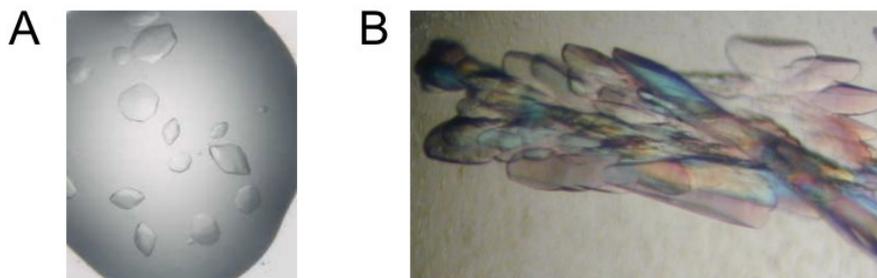


**Figure 51 : Optimisation du protocole de purification du domaine V central de la protéine Alix**

**A.** Profil de la colonne MonoP. Le gel natif 10% montre qu'une grande quantité de monomère a pu être séparé (~80% - fractions 17 à 20) du dimère (fractions 20 à 24)

**B.** Profil de la filtration sur gel S200 Increase. Le volume d'élution du dimère est de 11ml (1<sup>er</sup> pic : fractions 10 à 13), tandis que le volume d'élution du monomère est de 13ml (2<sup>ème</sup> pic : fractions 14 à 16).

Les premiers tests de cristallisation ont été réalisés sur la plateforme HTX (EMBL) avec une protéine concentrée à 18mg/ml sur les 6 plaques commerciales qui offrent l'avantage d'explorer une grande variété d'agents précipitants (sels, polymères, solvants organiques), de pH, et d'additifs. Les premiers cristaux du dimère d'Alix-V ont été obtenus dans la condition : 0.05M potassium dihydrogen phosphate, 15% PEG8000 en présence de l'additif 7% 1-butanol (Figure 52 A). Les cristaux ont montré une faible diffraction à 13Å sur la ligne de lumière ID 30 de l'ESRF.



**Figure 52 : Cristaux du dimère du domaine V central de la protéine Alix : Alix-V**

**A.** Cristaux obtenus avec une protéine à 18mg/ml dans 0.05M potassium dihydrogen phosphate, 15% PEG8000 en présence de l'additif 7% 1-butanol.

**B.** Cristaux obtenus avec une protéine à 9mg/ml supplémentée de broyats cristallins dans 0.1M Na-HEPES pH7.5, 10% isopropanol, 20% PEG 4000.

Afin d'améliorer leurs pouvoir de diffraction, la technique d'ensemencement a été utilisée. Celle-ci consiste à prélever les cristaux obtenus, de les broyer à l'aide du kit Seed bead<sup>TM</sup> (Hampton Research) et de prendre les broyats pour ensemer des gouttes en sous-saturation, on parle de *microseeding*. Tous les screens commerciaux ont été retesté en présence de ces broyats. Des cristaux ont été obtenus dans la nouvelle condition 0.1M Na-HEPES pH7.5, 10% isopropanol, 20% PEG 4000 (Figure 52 B). Ces cristaux ont montré une meilleure diffraction anisotrope à 3.3Å - 4Å le 17 juillet 2013 sur la ligne de lumière ID30 de l'ESRF. Une tentative de remplacement moléculaire grâce à la structure monomérique résolue par Lee en 2007 (PDB 2OJQ) a été initiée par Pauline Macheboeuf sur ces données. Malheureusement, cette tentative a échoué. Il nous fallait donc obtenir des phases afin de résoudre la structure par la méthode de MAD (multiple wavelength anomal diffusion). Dans le but d'obtenir des phases, de nombreuses stratégies ont été testées :

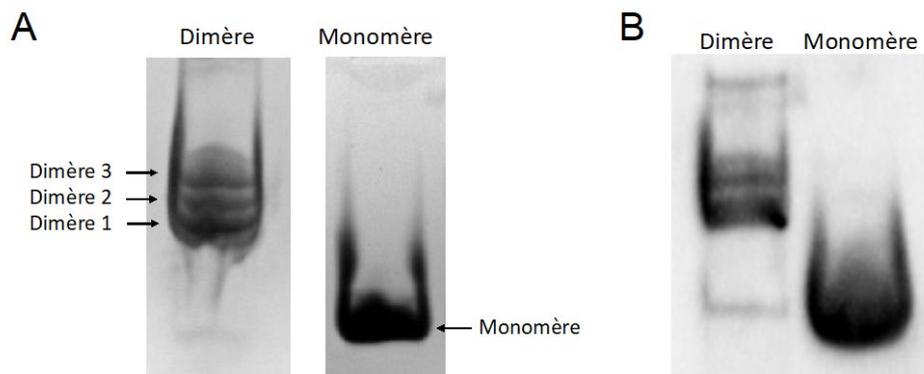
- Obtention de cristaux avec une protéine marquée à la sélénométhionine. Les cristaux n'ont montré qu'une pauvre diffraction à 10Å.
- Trempage ou cocrystallisation de la protéine avec des métaux lourds ou des lanthanides. Les cristaux ont montré un pauvre pouvoir de diffraction.
- Trempage dans un cluster de bromure de tantale (Jena bioscience) : Les résultats, en termes de signal anomal, ont été un peu plus satisfaisants mais sont restés insuffisants pour résoudre la structure du dimère.

Dès lors, il nous a fallu réfléchir à comment limiter la flexibilité de la molécule à l'origine de l'anisotropie des cristaux et de leur faible pouvoir de diffraction.

## **2. Étude de la phosphorylation du dimère du domaine V de la protéine Alix**

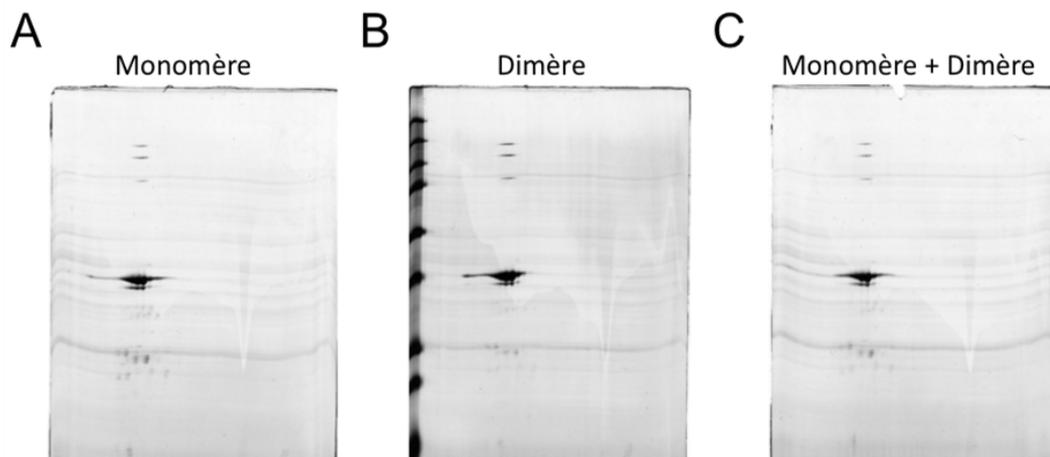
De nombreux travaux ont mis en évidence qu'un processus de phosphorylation serait impliqué dans la dynamique de la molécule. Entre autres, Sun *et al* ont décrit en 2016 que les phosphorylations des serines S<sub>718</sub> et S<sub>721</sub> du domaine PRD de la protéine induisent un changement conformationnel de la protéine Alix, nécessaire à sa fonction lors de la cytokinèse et lors du bourgeonnement du virus de l'anémie infectieuse équine (Equine Infectious Anemia Virus)(Sun et al., 2016). En 2005, Schmidt *et al* mettent en évidence que la protéine Src se lie à la protéine Alix permettant ainsi sa phosphorylation

(Schmidt et al., 2005). La phosphorylation de la tyrosine Y<sub>319</sub> du domaine Bro-1 régule alors, négativement sa capacité à interagir avec ses partenaires. En effet, l'hyperphosphorylation d'Alix par Src provoque un changement dans la localisation cellulaire d'Alix, de la fraction membranaire vers le cytoplasme et réduit son interaction avec le complexe SET/CIN85 et inhibe l'internalisation le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Chen et al, 2000 ; Schmidt et al, 2004). La phosphorylation des domaines Bro-1 et PRD d'Alix est donc solidement établie. La phosphorylation du domaine V, même si elle a été démontrée grâce à une étude de phosphoprotéomique basée sur de la spectrométrie de masse (Zhou et al, 2013) reste pour le moment très peu caractérisée. Au cours de mon travail, j'ai mis en évidence que Alix-V présente plusieurs bandes en gel natif (Figure 53 A ; panneau de gauche D1, D2, D3). En 2018, je suis donc partie du postulat que les trois bandes observables en gel natif pourrait être l'effet d'une phosphorylation différentielle. Un western blot sur gel natif révélé par un anticorps dirigé contre les résidus sérines phosphorylés a donc été réalisé (Figure 53 B).



**Figure 53 : Mise en évidence de la phosphorylation du domaine V central de la protéine Alix**  
**A.** Le dimère ou le monomère du domaine V central de la protéine Alix est déposé sur un gel natif 10%  
**B.** Western blot antiphosphoserine (P3430 Sigma Aldrich)

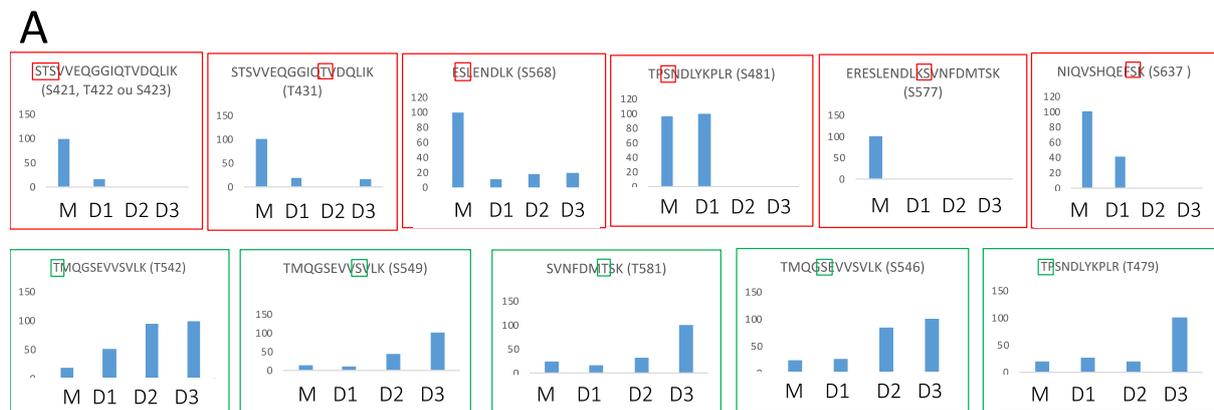
Le western blot anti phosphoserine sur le dimère et le monomère montre que la protéine produite en cellule bactérienne est phosphorylée (Figure 53 B). Par la suite, une étude protéomique en gel 2D des monomère et dimère de Alix-V a été réalisé. De façon très inattendue, une identité totale des profils entre monomère et dimère a été obtenue (Figure 54 C). Le monomère et le dimère présentent donc le même nombre de modifications post-traductionnelles, pas forcément de la même nature ni au même endroit.



**Figure 54 : Étude protéomique en gel 2D des monomères et dimères du domaine V central de la protéine Alix**

A. Monomère B. Dimère C. Superposition des deux gel 2D : monomère + dimère

Afin de mettre en évidence les résidus phosphorylés dans les deux oligomères, une étude plus poussée de spectrométrie de masse sur résidus phosphorylés (Plateforme EDYP –CEA) a été mise en place et a révélé que les deux entités présentent des phosphorylations, mais sur des acides aminés distincts (Figure 55 Légende de la figure sur la page suivante). Les quatre espèces : monomère, dimère 1(D1), dimère 2(D2), et dimère 3 (D3) ont été analysées.



**B**

Résidus phosphorylés	S421 T422 S423	T431	S481	S568	S577	S637	T542	S549	T581	S546	T479
Monomère	X	X	X	X	X	X					
Dimère			X				X	X	X	X	X

**Figure 55 : Spectrométrie de masse sur résidus phosphorylés sur les oligomères du domaine V de la protéine Alix**

M. Monomère ; D1. Dimère 1 ; D2. Dimère 2 ; D3. Dimère 3

**A.** La spectrométrie de masse a identifié une dizaine de résidus phosphorylés dans le domaine V de la protéine. Certains spécifiques du monomère, en rouge, et d'autres spécifiques du dimère, en vert.

**B.** Les résidus phosphorylés ont été répertoriés dans un tableau en fonction de leurs spécificités pour le monomère ou le dimère

Des mutants de phosphorylation ont été générés en rapport avec les résultats de spectrométrie de masse obtenus. Tous les résidus phosphorylés dans le monomère ont été mutés en Alanine afin d'abroger toute phosphorylation. A l'inverse, tous les résidus phosphorylés dans le dimère ont été mutés en glutamate afin de mimer la phosphorylation. Le but étant de pouvoir balancer l'équilibre vers une quantité plus importante de dimère.

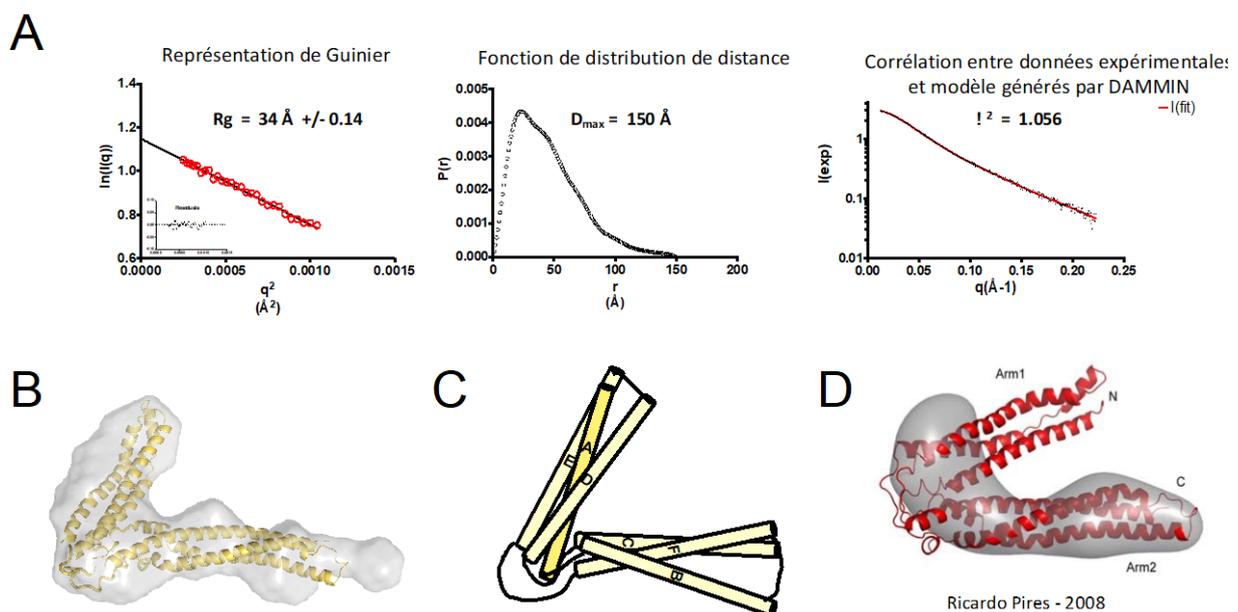
### **3. Études biophysiques des mutants par SAXS**

Tous les mutants ainsi générés ont été purifiés. Malheureusement, de tous les mutants testés aucun ne semblait plus apte à dimériser. Par contre, certains mutants montrent une diminution de la quantité de dimères.

Afin de déterminer, les enveloppes globales (modèles *ab initio*) de tous les mutants générés (structure à basse résolution), nous avons utilisé la technique de diffusion des rayons X aux petits angles. Toutes les mesures ont été réalisées sur la ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL avec l'aide de Aurélien Thureau et de Thibaut Crépin. Cette ligne de lumière couplée à une chromatographie d'exclusion stérique en HPLC permet de réaliser des mesures de SEC-SAXS. Ce système a un très gros avantage car il permet une dernière purification de l'échantillon avant la mesure, et permet ainsi d'éviter une contamination délétère par des agrégats éventuels. Ainsi, nous obtenons une courbe de diffusion représentative de notre protéine en solution. Grâce à cette courbe et à l'approximation de Guinier, nous avons pu calculer la fonction de distribution des distances  $P(r)$ , le rayon de giration  $R_g$  et le diamètre maximum  $D_{max}$ . Ces données, indiquées dans la Figure 56 A, ont été utilisées par la suite pour construire un modèle *ab initio* grâce au logiciel DAMMIN.

En 2008, Ricardo Pires avait obtenu des données SAXS pour la forme monomérique du domaine V (Figure 56 D). Il avait à l'époque montré que la structure du monomère Alix-V WT en solution différait de la structure cristalline. Alors que la structure

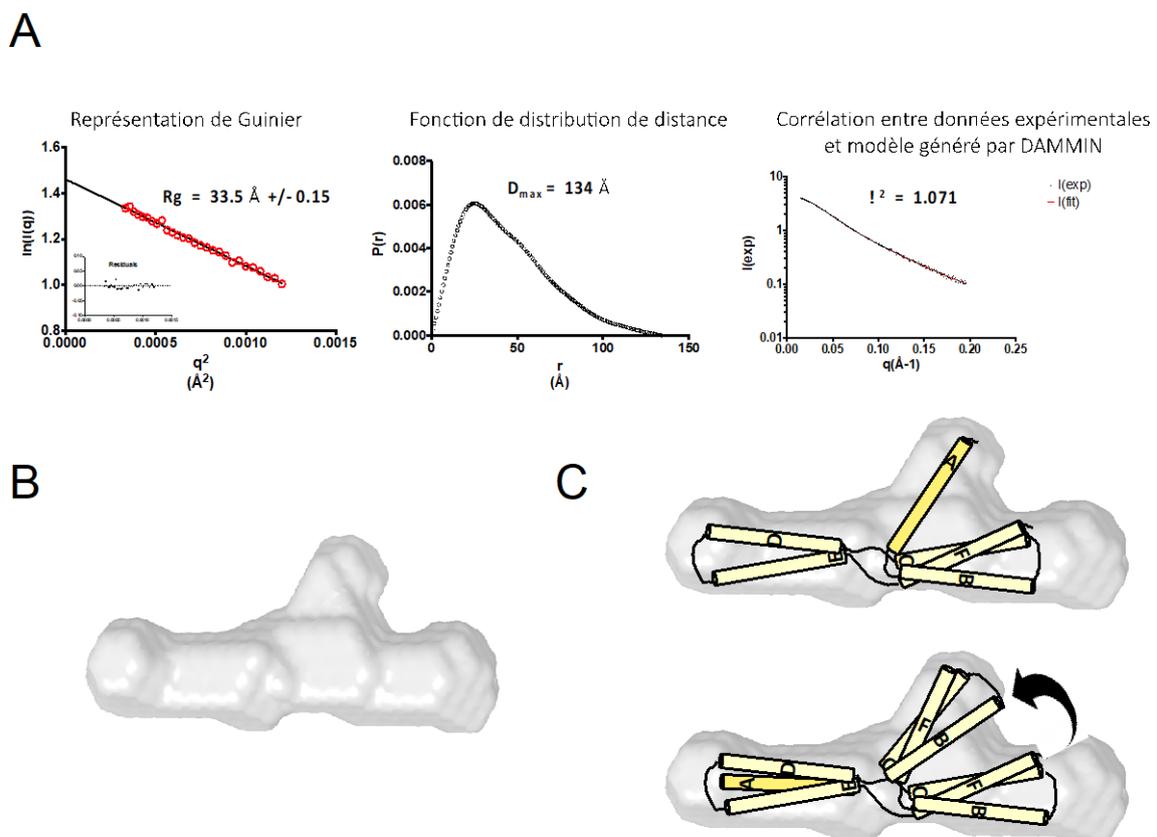
crystalline présente une forme de V, celle du modèle *ab initio* de DAMMIN présente une structure en L. En effet, il n'y avait pas de possibilité d'ajuster correctement la structure cristalline Alix-V de l'orthologue humain (code PDB 2OJQ – Lee et al., 2007) dans le modèle *ab initio* de la molécule d'Alix en solution. D'autre part lorsque la courbe de diffusion théorique calculée à partir de la structure cristalline était ajustée à la courbe de diffusion expérimentale obtenue, un écart élevé ( $\chi^2 > 5$ ) était obtenu, ce qui suggérait que la structure cristalline fixe la molécule dans une conformation spécifique différente de la structure en solution. D'autre part, il avait mis en évidence que le monomère du mutant de dimérisation *mut1* montrait une forme très allongée de 170Å, ce qui suggérait la possibilité qu'Alix pouvait être en conformation ouverte (données non montrées). La première étape dans cette étude a été de confirmer les résultats obtenus par Ricardo Pires en 2008, à savoir l'analyse de Alix-V (WT) monomérique. Il montre une structure relativement allongée avec une Dmax de 150 Å en solution et un rayon giratoire de  $34 \pm 0.14$  Å. Le modèle *ab initio* en forme de L obtenu (Figure 56 B) est en parfaite adéquation avec les résultats de Ricardo Pires (Figure 56 D).



**Figure 56 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle *ab initio* du monomère du domaine V de la protéine Alix (Alix-V WT)**

**A.** Profils de SAXS obtenus pour le monomère Alix-V permettant d'obtenir le rayon giratoire  $R_g$ , la distance maximale de la molécule  $D_{max}$  et d'obtenir un profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) et la courbe théorique (ligne rouge) du modèle généré par le logiciel DAMMIN présenté en **B**. **B.** Le modèle *ab initio* du monomère Alix-V révèle une forme en L. **C.** Schématisation du modèle *ab initio*. **D.** Ajustement manuel de la structure cristalline de d'Alix V humaine (PDB 2ojq ; Lee, Joshi et al. 2007) dans le modèle *ab initio* obtenu en 2008 par Ricardo Pires.

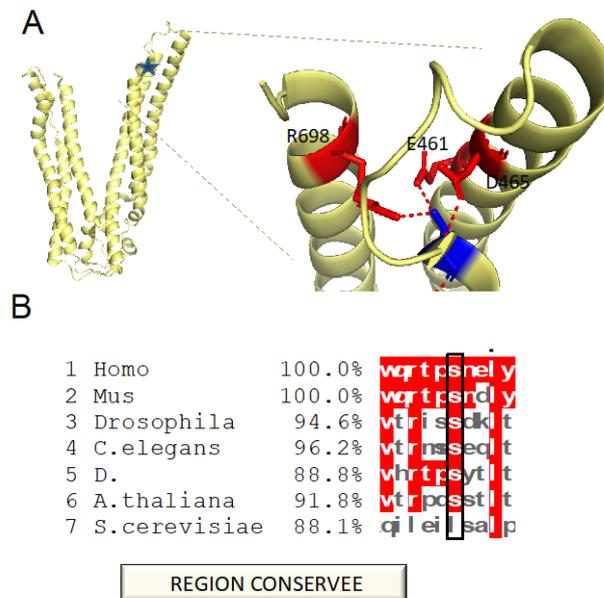
Dans cette partie, je choisirai de ne montrer les résultats que de 3 mutants (QC1 ; QC8 ; QC10). Le mutant Alix-V QC1 (S481A) monomérique montre une structure relativement allongée avec une  $D_{max}$  de 134 Å en solution et un rayon giratoire de  $33.5 \pm 0.15$  Å ce qui est similaire aux résultats obtenus avec le monomère Alix-V WT où la  $D_{max}$  est de 150 Å et le rayon giratoire est de  $34 \pm 0.14$  Å (Figure 57 A). La forme en Y du modèle *ab initio* du mutant Alix-V QC1 monomérique obtenu pourrait correspondre soit au détachement d'une hélice (Figure 57 C : schéma du haut), soit à différentes positions d'un bras de la molécule dû à une forte flexibilité en solution (Figure 57 C : schéma du bas).



**Figure 57 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC1**

**A.** Profils de SAXS obtenus pour le monomère du mutant Alix-V QC1 permettant d'obtenir le rayon giratoire  $R_g$ , la distance maximale de la molécule  $D_{max}$  et d'obtenir un profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) et la courbe théorique (ligne rouge) du modèle généré par le logiciel DAMMIN présenté en **B**. Le modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC1 révèle une forme en Y. **C.** Schématisation hypothétique du mouvement des bras de la molécule pouvant expliquer le modèle *ab initio* généré par DAMMIN.

Lorsque l'on regarde la localisation de la mutation (S<sub>481</sub>A : noté en bleu sur la Figure 58 A), on observe d'une part que cet acide aminé est un résidu conservé à travers les espèces et d'autre part qu'il est impliqué dans l'interaction avec des acides aminés de deux autres hélices alpha. J'ai muté cet acide aminé en glutamate, la propension du mutant S<sub>481</sub>E à générer du dimère est très largement réduite. Ce qui nous pousse à penser que cette région est importante lors du processus de dimérisation.



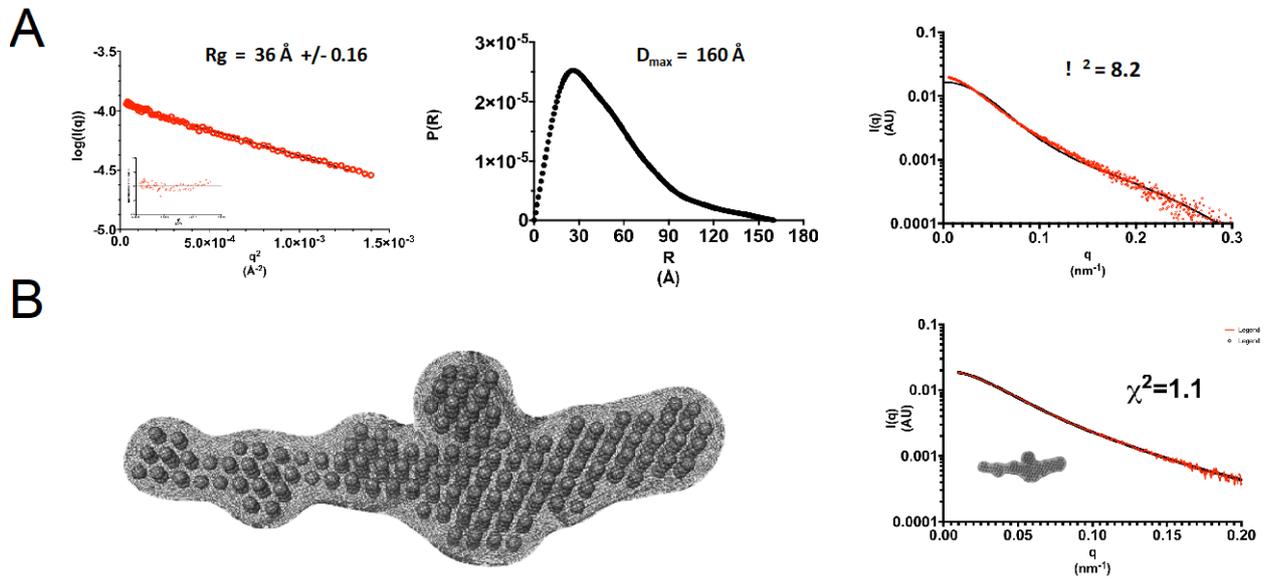
**Figure 58 : Localisation de la mutation du mutant Alix-V QC1**

**A.** Localisation de la mutation S<sub>481</sub>A (noté par une étoile bleue) et interaction de la serine 481 (A. panneau de droite noté en bleu) dans la structure cristalline monomérique (PDB 20JQ)

**B.** Alignement montrant la conservation de ce résidu à travers les espèces.

Le deuxième mutant Alix-V QC8 (S<sub>568</sub>A-S<sub>577</sub>A) monomérique montre un arrangement similaire aux résultats obtenus avec le monomère de Alix-V WT avec une D<sub>max</sub> de 160 Å et un rayon giratoire de 36± 0.16 Å (Figure 59 A). Un écart élevé ( $\chi^2 > 8$ ) est obtenu lorsque la courbe de diffusion théorique calculée à partir de la structure cristalline monomère du domaine V (PDB 20JQ) est ajustée à la courbe de diffusion expérimentale obtenue pour le mutant QC8 ce qui suggère que le mutant adopte une forme différente lorsqu'il est en solution (Figure 59 A panneau de droite). Le modèle *ab initio* obtenu par DAMMIN semble très similaire à celui obtenu avec le mutant Alix-V QC1 (Figure 59 B panneau de gauche). Il semblerait que le mutant Alix-V QC8 en solution, pourrait adopter des formes distinctes : une forme relativement fermée comme le WT et une forme ouverte et allongée. Le coefficient de corrélation  $\alpha$  obtenu entre les données

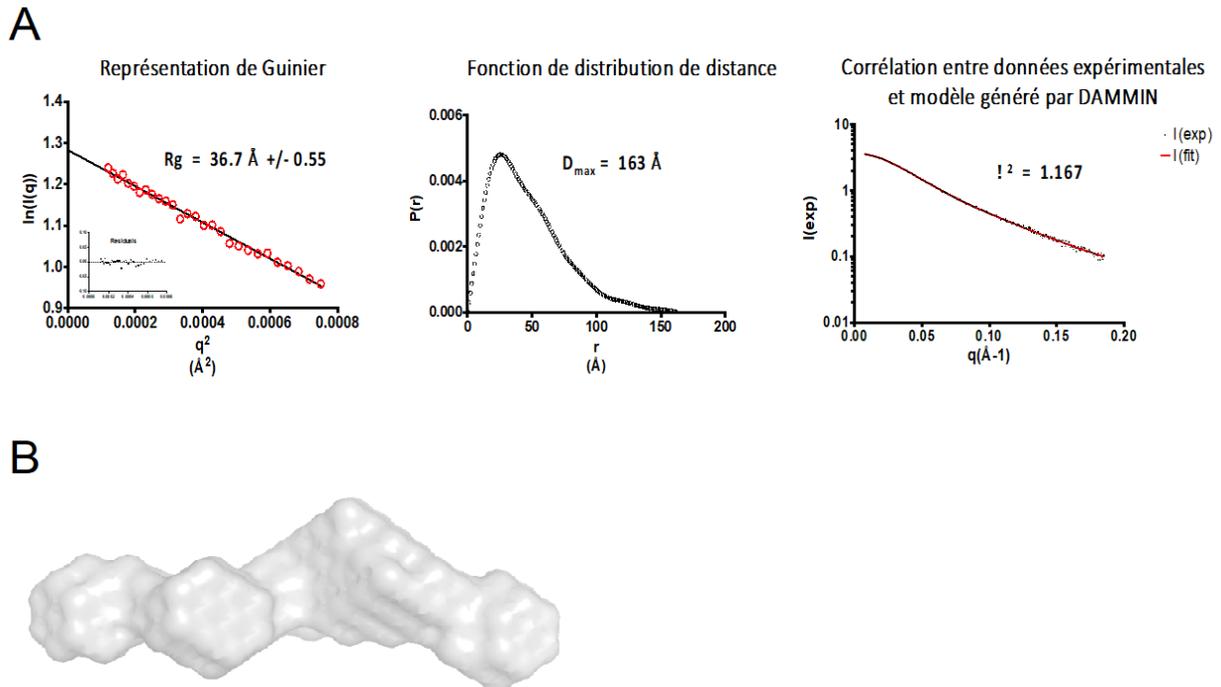
expérimentales et la courbe théorique du modèle généré par le logiciel DAMMIN est très proche de 1 ce qui confirme la validation du modèle généré par DAMMIN (Figure 59 B panneau de droite), confirmant l'ultra flexibilité de la molécule.



**Figure 59 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC8**

**A.** Profils de SAXS obtenus pour le monomère du mutant Alix-V QC8 permettant d'obtenir le rayon giratoire  $R_g$ , la distance maximale de la molécule  $D_{\text{max}}$  et d'obtenir un profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) et la courbe théorique (ligne rouge) de la structure monomérique du WT (PDB 20JQ). **B.** Panneau de gauche : Le modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC8 révèle une forme très similaire à celle du mutant Alix-V QC1. Panneau de droite : Profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) et la courbe théorique (ligne rouge) du modèle généré par le logiciel DAMMIN. Le coefficient de corrélation est très bon.

Le mutant Alix-V QC10 (T422A-T431A) monomérique montre une structure un peu plus allongée complètement linéaire avec une  $D_{\text{max}}$  163  $\text{\AA}$  en solution et un rayon giratoire de  $36.7 \pm 0.55 \text{ \AA}$  (Figure 60 A). La corrélation entre les données expérimentales et le modèle *ab initio* généré par DAMMIN présente un facteur  $\chi^2=1.16$  ce qui est signe de bonne corrélation (Figure 60 A panneau de droite). A partir de ce modèle *ab initio* complètement ouvert, j'ai souhaité savoir si je pouvais obtenir un modèle ouvert avec la structure cristalline. Pour cela, j'ai utilisé le logiciel CORAL.

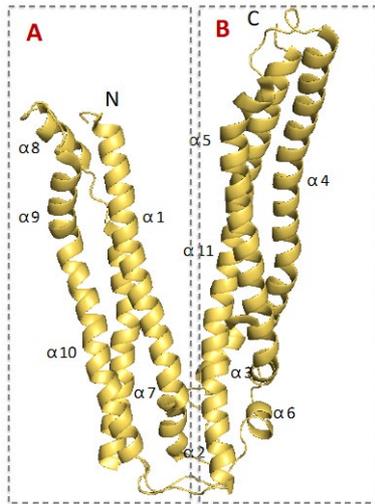


**Figure 60 : Profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC10**

**A.** Profils de SAXS obtenus pour le monomère du mutant Alix-V QC10 permettant d'obtenir le rayon giratoire  $R_g$ , la distance maximale de la molécule  $D_{max}$  et d'obtenir un profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) et la courbe théorique (ligne rouge) du modèle généré par le logiciel DAMMIN présenté en **B**.

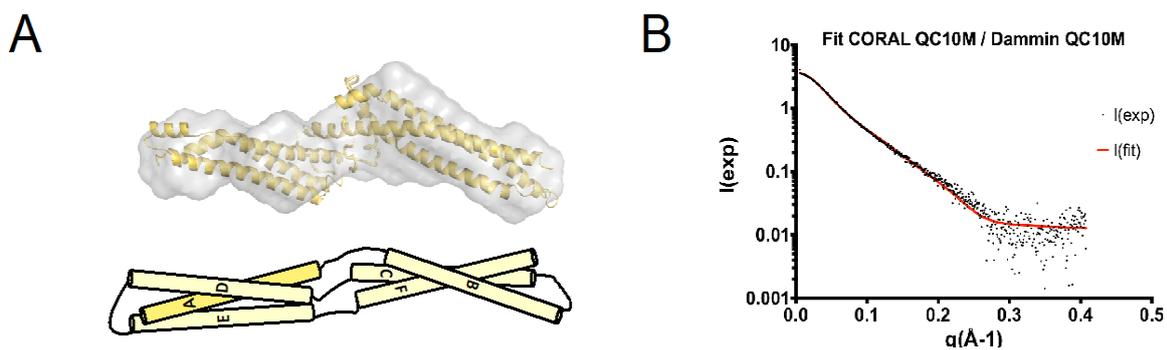
**B.** Le modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC10 révèle une forme complètement allongée en conformation ouverte avec une  $D_{max}$  de 163 Å.

Le logiciel CORAL génère des modèles en bougeant les domaines qu'on lui définit et recréant des domaines de liaison entre ces domaines tout en les faisant corrélés aux données expérimentales. A partir de la structure cristallographique du monomère du domaine V (PDB 2OJQ), j'ai créé deux domaines distincts A et B en enlevant les trois boucles flexibles de la molécule qui lient les deux bras (Figure 61) : le premier domaine correspondant aux trois hélices du premier bras ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$ ) et le deuxième domaine aux trois hélices du deuxième bras ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_{11}$ ).



**Figure 61 : Structure cristallographique du domaine V de la protéine Alix (Lee et al., 2007)**  
 Les deux domaines A et B créés dans le logiciel CORAL sont schématisés par les carrés discontinus gris

Le modèle obtenu par le logiciel CORAL montrant une structure complètement ouverte et linéaire bien que très compacte au niveau de la région charnière, a pu être superposé au modèle *ab initio* de DAMMIN (Figure 58A). Le profil de corrélation entre les données DAMMIN obtenues pour le monomère du mutant Alix-V QC10 et la courbe théorique du modèle généré par le logiciel CORAL montre une très bonne concordance avec un facteur de corrélation de  $\chi^2=1.11$  ce qui conforte dans l'idée que ce mutant a une conformation monomérique ouverte en solution (Figure 62 B).



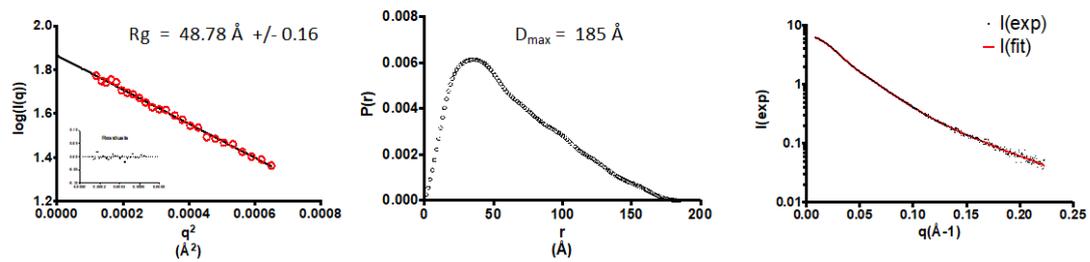
**Figure 62 : Modèle *ab initio* du monomère du mutant Alix-V QC10**

**A.** Modèle proposé par le logiciel CORAL

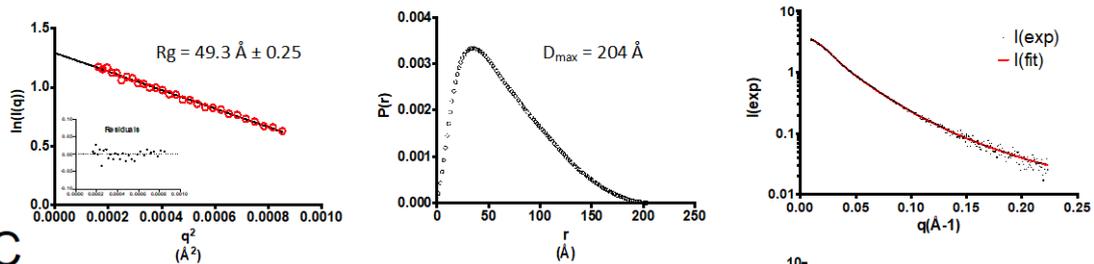
**B.** Profil de corrélation entre les données expérimentales (points noirs) obtenus pour le monomère du mutant Alix-V QC10 et la courbe théorique (ligne rouge) du modèle généré par le logiciel CORAL (hélices alpha jaune en A.)

En parallèle, les dimères de chacun des mutants ont été analysés.

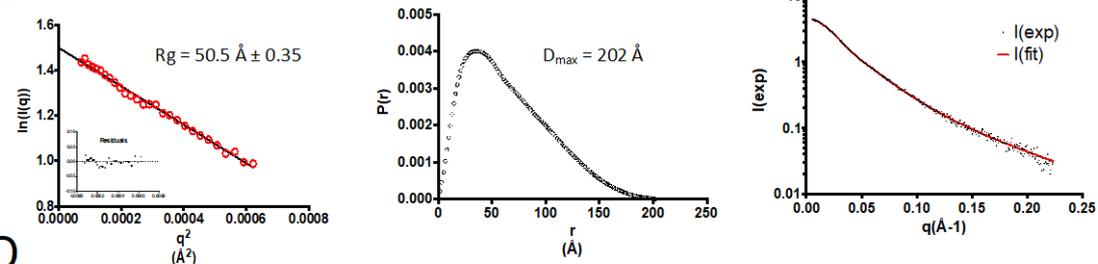
A



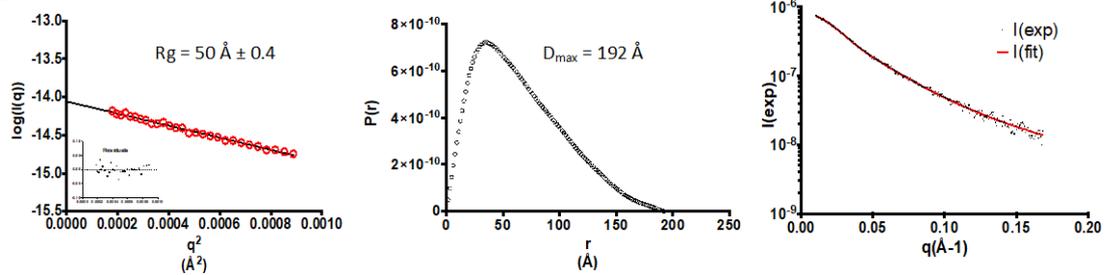
B

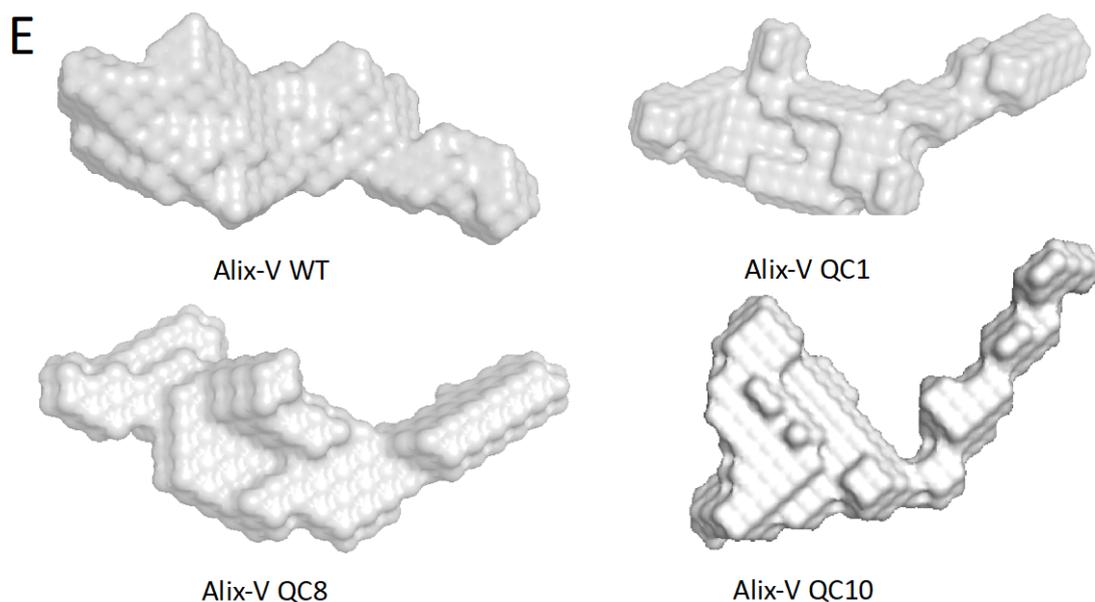


C



D

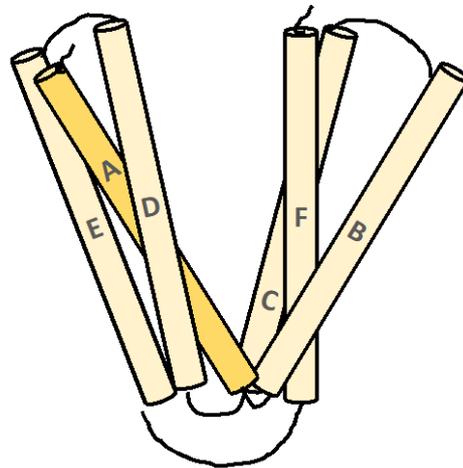




**Figure 63 : Analyse SAXS des dimères Alix-V WT et des mutants Alix-V QC1, Alix-V QC10 et Alix-V QC8**  
**Panneau de droite :** Représentation de Guinier pour **A.** WT **B.**QC1 **C.** QC10 **D.** QC8.  
**Panneau central :** Fonction de distribution de distance pour **A.** WT **B.**QC1 **C.** QC10 **D.** QC8.  
**Panneau de gauche :** Intensités de diffusion expérimentales mesurées pour **A.** WT **B.**QC1 **C.** QC10 **D.** QC8.  
 La ligne rouge indique la courbe de diffusion théorique calculée pour les modèles SAXS *ab initio*.  
**E.** Modèles *ab initio* obtenus pour les différents dimères Alix-V WT et des mutants Alix-V QC1, Alix-V QC10 et Alix-V QC8

Les quatre dimères adoptent une forme très allongée avec une Dmax de 185 Å, 204 Å, 202 Å et 192 Å respectivement (Figure 63). La représentation de Guinier nous a permis de déterminer les rayons giratoires des 4 dimères, 48.7 Å, 49.3 Å, 50.5 Å, et 50 Å (Figure 63 Panneaux de gauche). Lorsque dans cette représentation, l'intensité diffusée est linéaire, ceci est la preuve de l'absence d'interactions intermoléculaires et un gage de la qualité de nos données. Cela confirme que nos échantillons ne comportent pas d'agrégats. Cette représentation de Guinier nous a aussi permis de déterminer la masse moléculaire de la protéine en solution qui est en accord avec la masse moléculaires des dimères, à savoir 80kDa. Les formes *ab initio* qui ont été générées par DAMMIN témoignent d'une grande flexibilité du dimère (Figure 63 E). Or, les générations de modèles *ab initio* par DAMMIN et DAMMIF ne sont pas adaptées pour décrire des complexes flexibles. Pour avoir une description plus complète, il faut utiliser des logiciels qui permettent de décrire les données expérimentales par des ensembles de plusieurs conformations de la protéine (EOM, flexible meccano).

J'ai donc entrepris d'évaluer si la diffusion observée représente un mélange de conformations en solution. Pour explorer cette possibilité, j'ai souhaité mettre en place une analyse par la méthode d'optimisation d'ensemble (EOM) qui permet de déterminer la distribution des conformations en solution. Pour ce type d'analyse, la première étape est de déterminer les domaines que l'on souhaite voir se réarranger. Dans notre cas, nous avons une molécule comprenant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, 6 hélices notées A B C D E F (Figure 64). Ces 6 hélices sont regroupées en deux domaines différents de trois hélices, comme suit 1<sup>er</sup> faisceau d'hélices A-D-E et un 2<sup>eme</sup> faisceau d'hélices B-C-F (non linéaire). Ce sont ces deux domaines que nous souhaitons réarranger l'un avec l'autre. Seulement, cette analyse n'a pas pu être mise en place car le logiciel EOM ne sait pas gérer les domaines non linéaires.

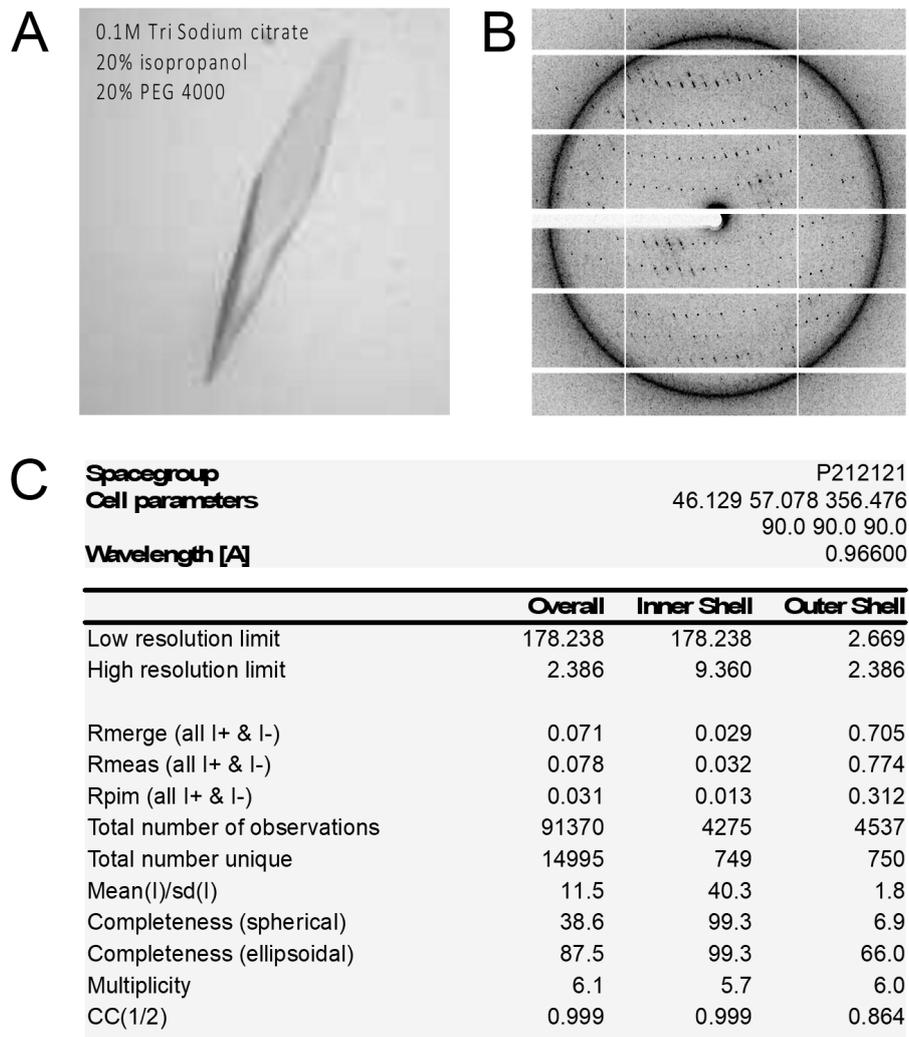


**Figure 64 : Schématisation de la structure de Alix-V**

Le premier domaine comprend les hélices ADE et le deuxième domaine comprend les hélices BCF.

#### **4. Études cristallographiques du mutant de phosphorylation Alix-V S<sub>568</sub>A-S<sub>577</sub>A**

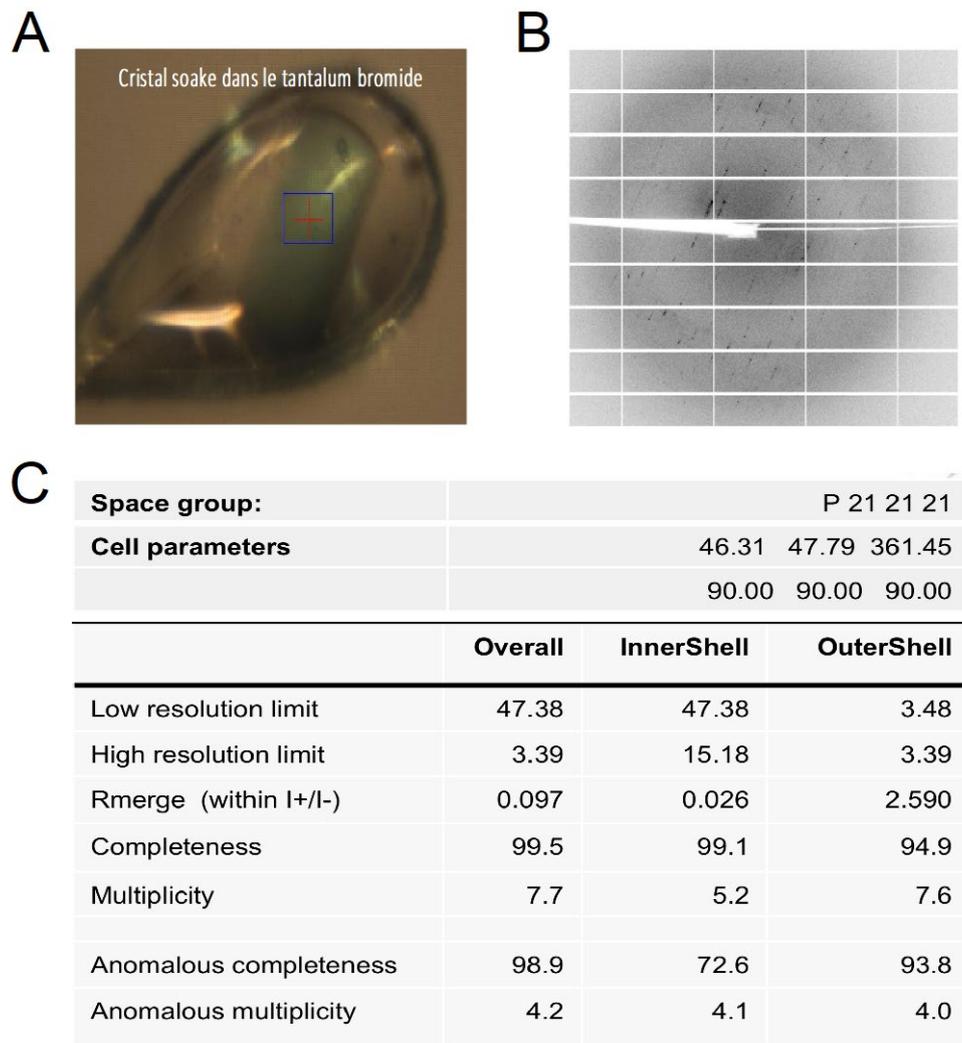
En parallèle des études de SAXS, tous les mutants générés ont été purifiés et testés sur la plateforme de cristallographie de HTX (EMBL, Grenoble). En juillet 2018, des cristaux sont obtenus avec le mutant Alix-V S<sub>568</sub>A-S<sub>577</sub>A (noté QC8) dans les conditions 0.1M tri-sodium citrate, 20% isopropanol, 20% PEG 4000 (Figure 65 A). Des données de diffraction ont été obtenues jusqu'à 2.7 Å sur la ligne de lumière ID30 de l'ESRF (Figure 65 B).



**Figure 65 : Données Cristallographiques du dimère du mutant Alix-V S<sub>568</sub>A-S<sub>577</sub>A (QC8)**

**A.** cristal obtenu avec 9mg/ml et broyats cristallins dans 0.1M tri sodium citrate, 20% isopropanol, 20% PEG 4000 **B.** Cliche de diffraction **C.** Données cristallographiques

En aout 2018, ces mêmes cristaux ont été trempés dans un cluster de bromure de tantale (Jena bioscience). Des données de diffraction incomplètes ont été obtenues jusqu'à 3.5 Å sur la ligne de lumière Proxima 2 du synchrotron SOLEIL (Figure 66).

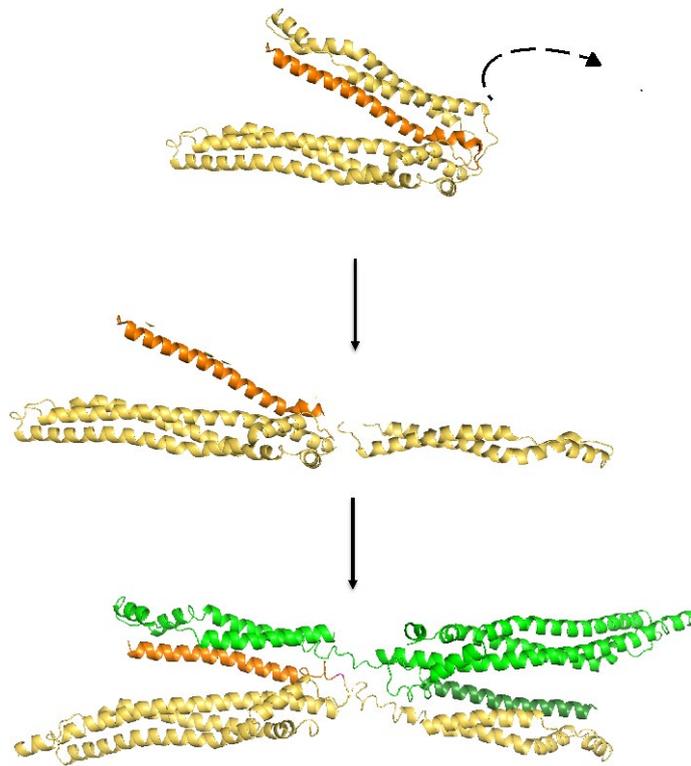


**Figure 66 : Données Cristallographiques du cristal du dimère du mutant Alix-V S<sub>568</sub>A-S<sub>577</sub>A (QC8) trempé dans cluster de bromure de tantale**

**A.** Cristal obtenu avec 9mg/ml et broyats cristallins dans 0.1M tri sodium citrate, 20% isopropanol, 20% PEG 4000 et trempés dans le cluster de bromure de tantale (Jena bioscience) **B.** Cliché de Diffraction **C.** Données cristallographiques

Les données incomplètes (Figure 66), due à une forte anisotropie des cristaux et à la flexibilité de la molécule dimérique, n'ont pas permis de résoudre avec certitude la structure du dimère (Rfree 40%) mais ont permis de donner une première hypothèse de dimérisation (Figure 67).

## 5. Modèle de dimérisation



**Figure 67 : Modèle de dimérisation du domaine V de la protéine Alix**

Le premier panneau montre la structure du monomère du domaine V d'Alix (PDB 20JQ). L'hélice alpha N-terminale est notée en orange. L'hélice alpha N-terminale du deuxième protomère est notée en vert foncé. Suite à l'ouverture du domaine V, l'hélice alpha N-terminale se détache des deux autres hélices pour interagir avec les deux hélices alpha du deuxième protomère (noté en vert).

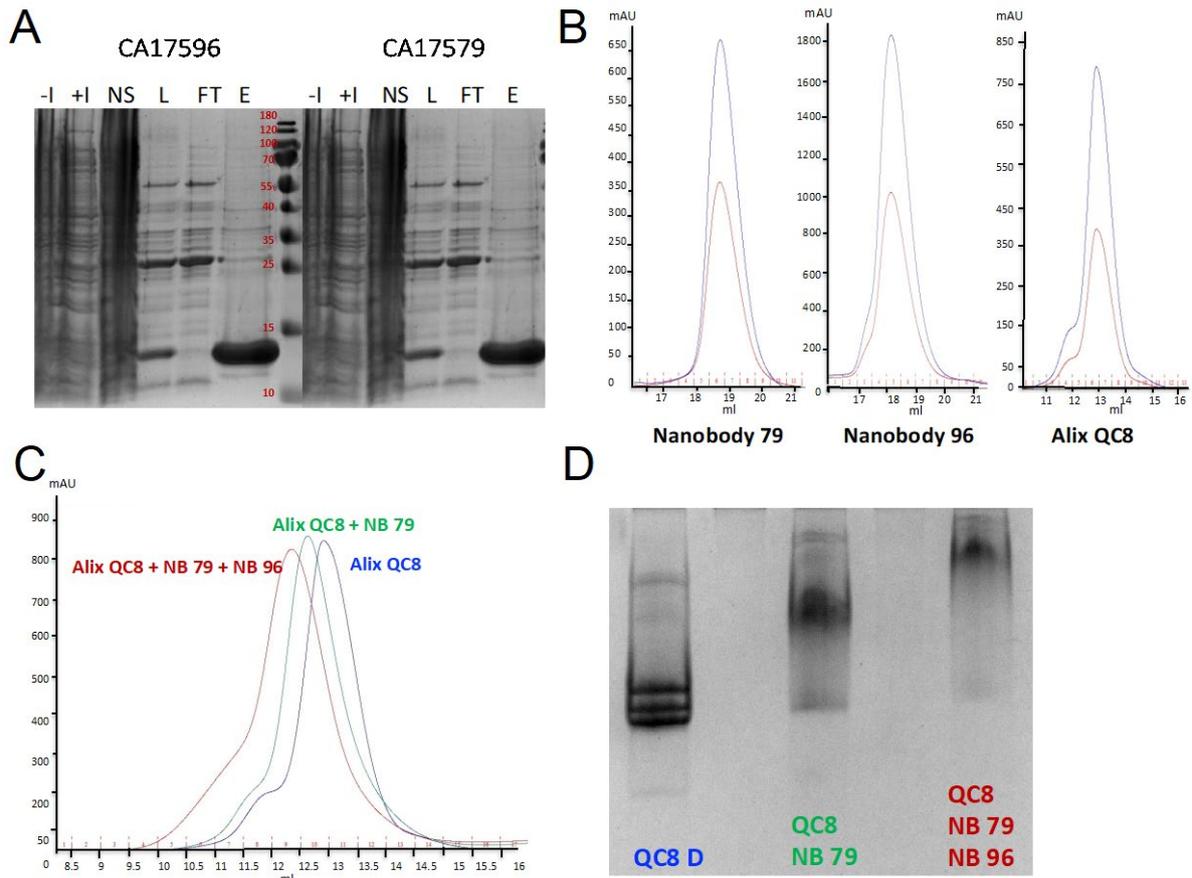
La dimérisation impliquerait des changements conformationnels importants, conduisant à un échange de domaines au sein des deux protomères du dimère. La structure hypothétique montre que dans un premier temps, la conformation du domaine V fermé doit s'ouvrir. Dans un second temps, le bloc contenant la première hélice N-terminale du bras du V (en orange) se dissocie. Ainsi, l'hélice N-terminale du bras du V du premier protomère (en orange) restée seule, interagit avec les deux hélices du bras du second protomère et l'hélice N-terminale du bras du V du second protomère (en vert) interagit avec les deux hélices du bras du premier protomère, générant ainsi un assemblage plat très flexible : SWAPP dimère (Figure 67). Malgré de nombreux efforts de Pauline Macheboeuf (CRCN-IBS) et de Pierre Legrand (synchrotron SOLEIL), cette structure reste un modèle puisqu'elle n'a pas atteint le degré de confiance nécessaire (Rfree=40%). Dès lors, une demande de nanocorps de lama a été envisagée afin de rigidifier la structure, obtenir sa structure et valider le modèle obtenu.

## **II. Étude structurale du dimère du domaine V de la protéine Alix en présence de nanocorps de lama**

### **1. Production et purification des nanocorps anti Alix-V**

Afin d'obtenir des nanocorps dirigés contre le domaine V dimérique de la protéine Alix, un dossier de recherche a été réalisé et envoyé au centre INSTRUCT de Belgique. Les centres INSTRUCT sont des centres européens de recherche en biologie structurale qui mettent à la disposition des chercheurs européens des technologies de pointe tels que la cryo-microscopie, la résonance magnétique nucléaire, la cristallographie, la spectrométrie de masse et la production de Nanocorps. Notre demande a été soumise et acceptée en novembre 2019 (Annexe). Du fait de la période de restriction COVID, les nanocorps ont été reçus en juin 2021. L'objectif de la production de nanocorps était multiple. Dans un premier temps, ces nanocorps ont été produits dans le but de stabiliser, rigidifier une conformation dimérique de la protéine afin de fournir une meilleure qualité cristalline, obtenir de meilleures données cristallographiques et de valider le modèle obtenu en 2018. Dans un deuxième temps, ils pourront être utilisés dans des études cellulaires fonctionnelles pour localiser la protéine au niveau des différents processus de remodelage de la membrane cellulaire qui sont contrôlés par la protéine Alix.

Deux des nanocorps ont été produits dans des cellules *WK6* (Su<sup>-</sup>), purifiés sur une colonne de nickel (Figure 68 A). Les nanocorps élués présentent une taille d'environ 15kDa sur gel d'acrylamide ce qui est en adéquation avec leur taille respective, à savoir 13.5kDa pour le NB79 et 14.8kDa pour le NB96. Les profils de filtration sur gel des deux nanocorps NB79 et NB96 montre un seul pic homogène à un volume d'élution de 19ml et 18.5ml respectivement (Figure 68 B panneau de gauche et du milieu).



**Figure 68 : Production et purification des nanocorps et du complexe Alix-V QC8 dimérique/nanocorps**

**A.** Purification sur colonne de nickel des deux nanocorps CA17596 et CA 17579 respectivement appelés NB96 et NB79. -I : avant induction ; +I : après induction ; NS : Non soluble ; L : Échantillon chargé ; FT : Non retenu ; E : Éluion **B.** Profil de filtration sur gel S200 increase des nanocorps et de la protéine Alix V QC8 dimérique seule et des Nanocorps 79 et 96 seuls. Le volume d'éluion de la protéine Alix V est de 13ml. Le volume d'éluion des nanocorps est compris entre 18 et 20ml **C.** Superposition des profils de filtration sur gel S200 increase de la protéine Alix V QC8 dimérique seule ou en complexe avec les nanocorps 79 et 96. **D.** Gel natif 10% de la protéine Alix V QC8 dimérique, seule ou en complexe avec les nanocorps 79 et 96.

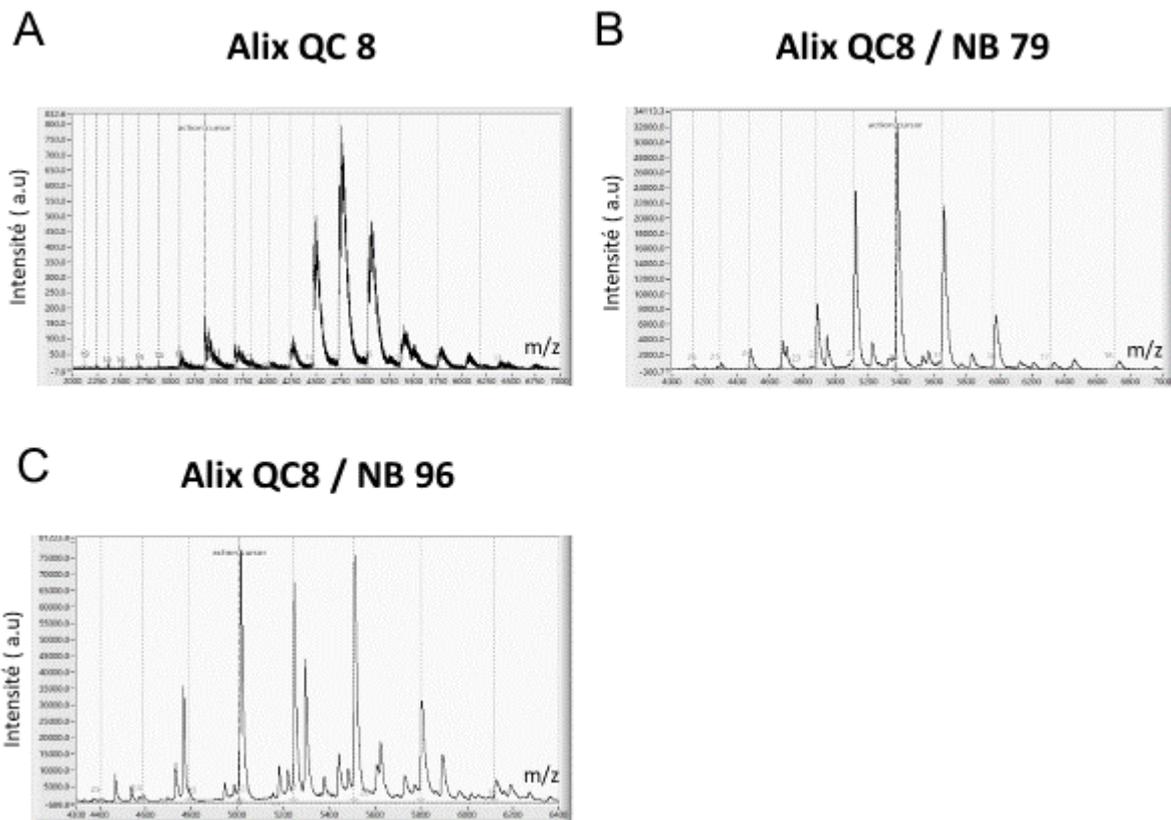
Dans un premier temps, afin de confirmer si les nanocorps interagissent correctement avec le dimère de la protéine Alix, des filtrations sur gels et un gel natif de la protéine seule et en complexe avec le nanocorps 79 ou les deux nanocorps ont été réalisés. L'analyse sur filtration sur gel réalisée révèle de nouveaux profils d'éluion pour les complexes avec les nanocorps. En effet, alors que la protéine Alix-V QC8 dimérique seule élue à un volume de 13ml (Figure 68 B panneau de droite), le complexe avec le nanocorps 79 ou avec les deux nanocorps élue à des volumes respectifs de 12.5ml et 12.2ml (Figure 68 C). Il y a donc un décalage du volume d'éluion indiquant qu'il y a bien interaction entre la protéine dimérique et les nanocorps. Cette interaction est confirmée

en gel natif. La protéine Alix-V QC8 dimérique seule est déposée sur un gel natif (Figure 68 D ligne de gauche), la migration présente le profil habituel pour le dimère du domaine V à savoir, trois bandes. Le complexe avec le nanocorps 79 présente une bande plus haute et plus homogène (Figure 68 D ligne du milieu) indiquant qu'il y a bien formation d'un complexe. Le complexe avec les deux nanocorps montre un décalage supplémentaire indiquant l'interaction des deux nanocorps et la protéine Alix-V (Figure 68 D ligne de droite).

## **2. Spectrométrie de masse native du complexe Alix-V QC8 dimérique en présence de nanocorps**

Afin de déterminer la stœchiométrie des deux complexes Alix-V/NB79 et Alix-V/NB96, trois échantillons ont été analysés par la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBS en spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes dans le tampon 250mM Ammonium acétate : la protéine Alix-V QC8 dimérique seule, le complexe Alix-V QC8/NB79 et le complexe Alix-V QC8/NB96. La spectrométrie de masse native est une technique par laquelle des assemblages protéiques peuvent être transférés d'une phase liquide à la phase gazeuse par ionisation électrospray (ESI-MS) tout en préservant dans la phase gazeuse les interactions non covalentes entre les sous-unités protéiques. Après différentes étapes d'analyse, des cartes d'interactions 2D de complexes protéiques peuvent être établies. Elle a été utilisée afin de déterminer la stœchiométrie des complexes.

La masse moléculaire obtenue pour la protéine Alix-V QC8 seule correspond bien à la masse du dimère, à savoir 80kDa (Figure 69 A). En ce qui concerne le complexe avec le nanocorps 79, une masse moléculaire de 106544 Da a été obtenue, ce qui correspond à la masse molaire du dimère d'Alix en présence de deux nanocorps 79 (Figure 69 B). Pour le complexe avec le nanocorps 96, le principal signal indique une masse moléculaire de 110158 Da, ce qui correspond à la masse molaire du dimère d'Alix-V avec deux nanocorps 96, mais un second signal de 95281 Da est présent correspondant à la masse molaire du dimère d'Alix-V avec un seul nanocorps 96 (Figure 69 C). Dès lors, le complexe Alix-V/NB79 étant le plus homogène, il a été choisi pour faire de la cristallisation.



**Figure 69 : Profil de spectrométrie de masse native du complexe Alix-V QC8 dimérique / Nanocorps 79 ou 96**

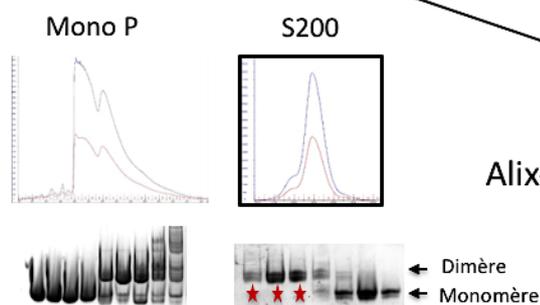
A. Profil obtenu avec Alix-V QC8 dimérique seule B. Profil obtenu avec du complexe Alix-V QC8 / NB79  
C. Profils obtenus avec le complexe Alix-V QC8 /NB96

### 3. Purification du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79

Le dimère du domaine V du mutant QC8 d'Alix et le nanocorps 79 ont été purifiés séparément. Le complexe est formé en présence d'un excès de nanocorps afin de saturer tous les sites d'interaction avec la protéine Alix. Puis, le complexe est passé sur une colonne de filtration sur gel Superdex 200 increase pré-équilibrée dans le tampon 50mM Tris HCl pH7.5 afin d'enlever l'excès de nanocorps. Finalement, le complexe est concentré et envoyé à la plateforme de cristallisation HTX (Figure 70).

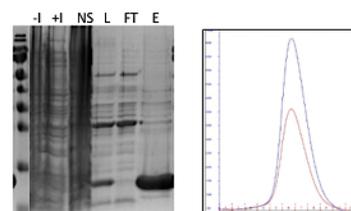
## Purification d'Alix-V QC8 dimérique

- Production en cellules bactériennes
- Colonne nickel
- Clivage du TAG
- 2<sup>ème</sup> colonne de nickel
- Mono P dans 25mM Bis Tris pH6,3
- S200 dans 50mM Tris HCl pH7.5

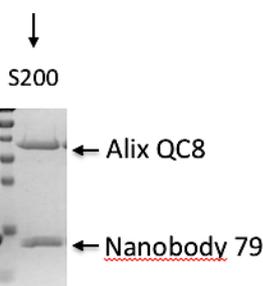


## Purification du Nanocorps 79

- Production en cellules bactériennes
- Colonne de Nickel
- S200 dans 50mM Tris HCl pH7.5



Complexe  
Alix-V QC8 : Nanobody 79  
en excès



Plateforme de cristallisation HTX

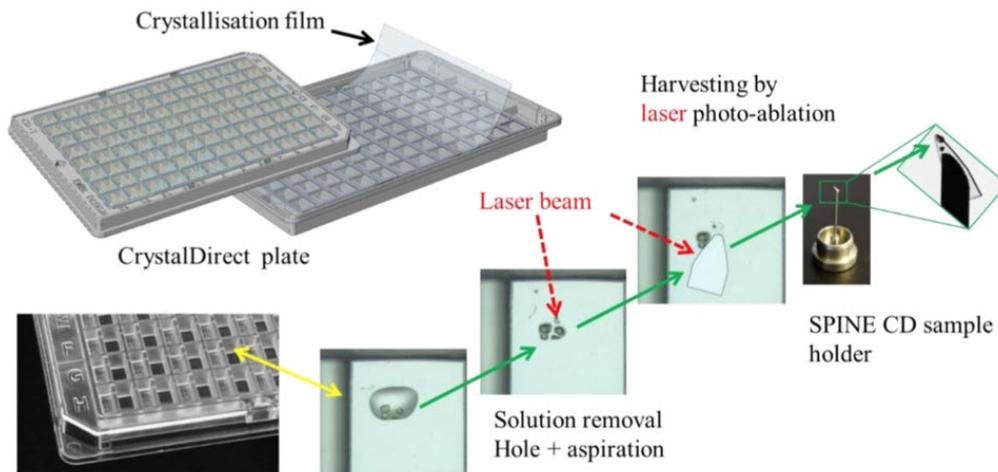
### Figure 70 : Production et purification du complexe Alix-V QC8 dimérique / Nanocorps 79

Les fractions de la filtration sur gel S200 increase d'Alix-V QC8 marquées d'une étoile rouge ont été choisies pour former le complexe avec le nanocorps 79.

## 4. Criblage des conditions de cristallisation du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79

Afin d'identifier les conditions permettant d'induire la cristallisation du complexe, celui-ci a été concentré à 6mg/ml, puis un grand nombre de conditions de cristallisation ont été criblées à l'aide des plaques commerciales (96 puits) : Classics qiagen, Wizard, JCSG MD, PACT MD, PEG qiagen et Salt Grid hampton de la plateforme HTX (EMBL). Les tous premiers cristaux du complexe ont été obtenus au bout de 15 jours dans la condition 0.1M HEPES pH7.5 / 8% PEG 8000 / 8% éthylène glycol. Le Laboratoire de cristallisation à haut débit de l'EMBL (HTX) propose une technologie de pêche et de congélation des cristaux entièrement automatisée : le système CrystalDirect (Figure 71). Ce système est basé sur une plaque de cristallisation qui permet de faire croître les

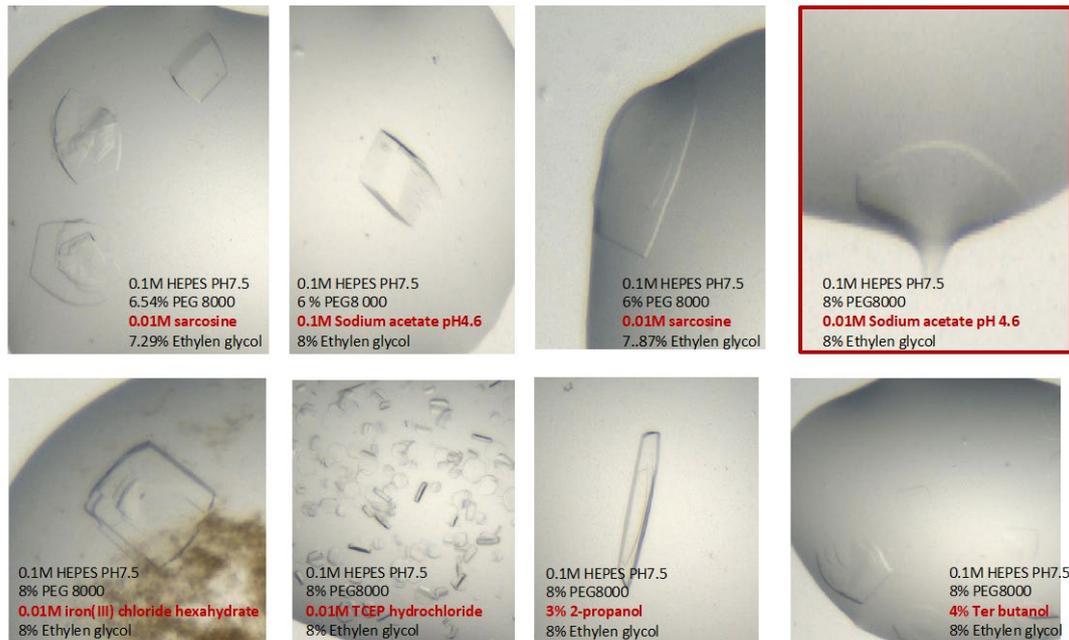
cristaux sur des films très fins qui peuvent ensuite être excisés avec un faisceau LASER pour récupérer le cristal. Les cristaux pêchés sont fixés à une boucle de cristallisation appelée « SPINE » et stockés dans l'azote liquide. Pour la collecte de données synchrotron, les cristaux sont envoyés sur la ligne de lumière automatisée MASSIF-1 de l'ESRF.



**Figure 71 : Le système CrystalDirect (HTX-EMBL)**

Le robot du système CrystalDirect permet de pêcher des cristaux, à partir d'une goutte de cristallisation d'une plaque 96 puits. Dans un premier temps, la solution entourant les cristaux est retirée pour assurer une vitrification rapide des cristaux sans avoir besoin d'ajouter des cryoprotectants, puis les cristaux sont pêchés et fixés aux boucles de cristallisation SPINE. Les cristaux sont ensuite congelés dans l'azote liquide et envoyés sur la ligne automatique MASSIF-1 de l'ESRF

Les cristaux pêchés automatiquement par le système CrystalDirect n'ont montré qu'une pauvre diffraction à 26 Å. Afin d'améliorer les cristaux, un nouvel échantillon du complexe a été envoyé à la plateforme HTX, dans cette même condition, afin de tester des screens d'additifs mais cette fois ci à une concentration plus élevée de 12mg/ml (Figure 72).



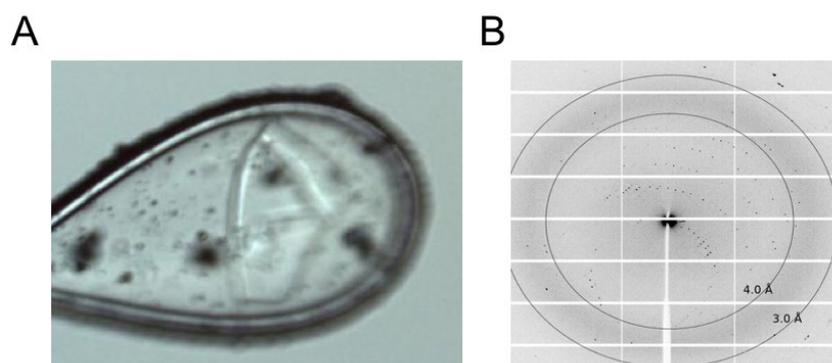
**Figure 72 : Cristaux du dimère du domaine V central de la protéine Alix en présence du nanocorps NB79**

Cristaux obtenus avec une protéine à 12mg/ml dans la condition 0.1M HEPES pH7.5 / 8% PEG 8000 / 8% ethylen glycol en présence de différents additifs.

Tous les cristaux obtenus ont été péchés à la main et congelés dans l'azote liquide en présence de 25 % éthylène glycol (cryo-protectant) puis envoyé à ligne automatique ID30.1A MASSIF de l'ESRF. Des données de diffractions ont été enregistrées jusque 2.7 Å dans la condition en présence de 0.01M Sodium acétate pH4.6.

## 5. Analyse de la structure cristallographique du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79

La structure a été entièrement résolue par Carlos Contreras Martel. Les données ont été indexées par XDS puis analysées en utilisant le programme staranis. Les paramètres de maille ont été déterminé 84 Å ,71 Å, 131 Å, 90°, 109°, 90°, ainsi que le groupe d'espace ; il s'agit du P2<sub>1</sub> (Figure 73).



**Figure 73 : Cliché de diffraction du cristal du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79**  
**A.** Cristal obtenu dans la condition 0.1M HEPES pH7.5 / 8% PEG 8000 / 8% éthylène glycol / 0.01M sodium acétate pH4.6 **B.** cliché de diffraction

### Collecte de jeu de données

Source X-ray (Beamline)	ESRF(ID30A-1)
Détecteur	Pilatus 2M
Longueur d'onde (Å)	0.96546
Gamme de balayage (°)	168
Oscillation (°)	0.05
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	84.267
<i>b</i> (Å)	70.876
<i>c</i> (Å)	130.619
<i>a</i> (°)	90
<i>b</i> (°)	108.814
<i>g</i> (°)	90
Mosaïcité (°)	0.162
Résolution (Å)	45.32-2.66
No. réflexions observée/unique	128088/41543
Résolution haute (Å)	2.82-2.66
Complétude(%)	98.3(95.5)
<i>R</i> <sub>sym</sub>	8.4(692.0)
<i>I</i> / <i>σ</i> ( <i>I</i> )	5.32 (0.19)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub>	99.6 (12.1)
Wilson plot B-facteur (Å <sup>2</sup> )	118.416

### Remplacement Moléculaire

Phaser LLG	1006.968
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	37.28/44.87

### Refinement

Initial <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	37.28/44.87
Final <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	25.56/31.40

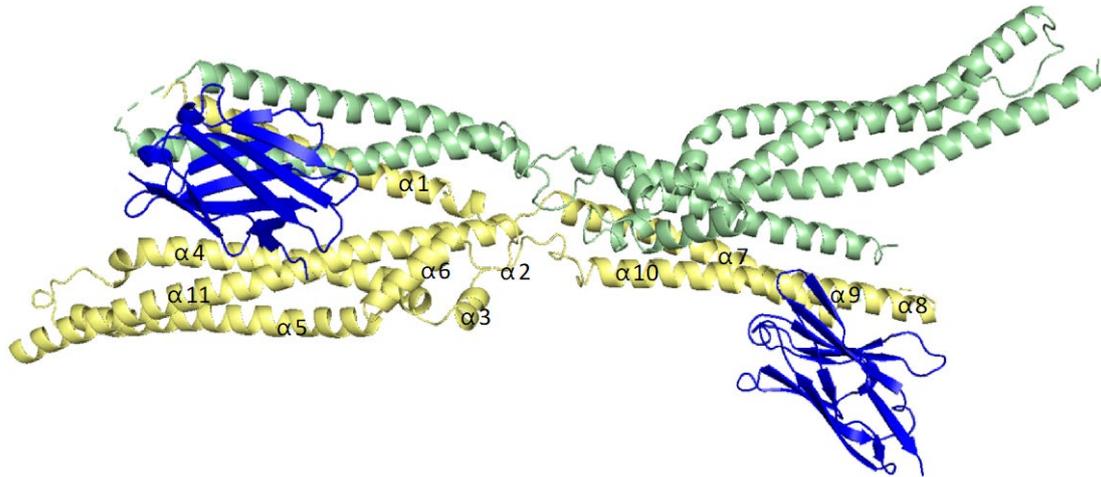
### Qualité stéréochimique

RMS deviation, longueur (Å)	0.003
RMS deviation, angles (°)	1.007
Facteur B moyen (Å <sup>2</sup> )	144.895
No. d'atomes	7114
Ramachandran plot (%)	100

**Tableau 3 : Statistiques des données de diffraction et d'affinement de la structure du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79**

Les chiffres entre parenthèse correspondent aux données dans la dernière tranche de résolution.

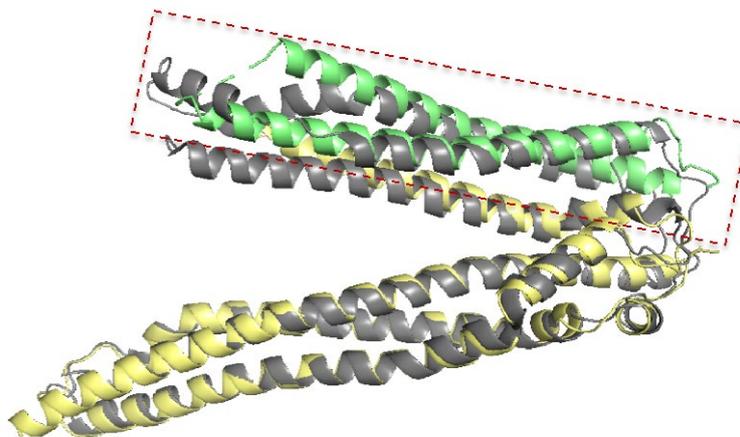
Le premier point que j'aborderai dans l'analyse de cette structure est la confirmation d'un swapp dimère. La structure est en accord avec le modèle obtenu en 2018. Les deux bras comprenant les hélices alpha 7 à 10 se détachent et viennent reformer le monomère initial avec l'hélice alpha N-terminale du second protomère (Figure 74).



**Figure 74 : Structure Xray du complexe Alix-V QC8 dimérique / nanocorps 79**

Le premier protomère de la protéine Alix est identifié en jaune, le second protomère de la protéine Alix est identifié en vert. Les deux nanocorps NB79 sont matérialisés en bleu.

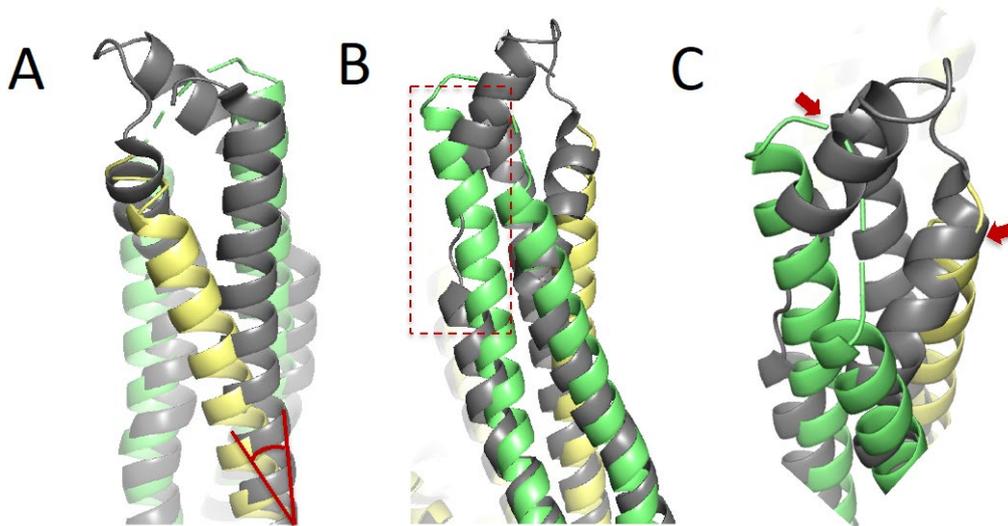
En effet, lorsque la structure du monomère du domaine V (Lee et all., 2007 ; PDB 20QJ) est superposée à la structure du monomère reformée dans le dimère, on peut voir que les deux structures sont très proches (Figure 75). Cette similarité de structure est confirmée par la valeur du facteur RMSD qui est de 1.96 Å. Ce qui veut dire que sur 192 atomes, les molécules diffèrent de 1.96 Å. Le facteur RMSD est une valeur d'adéquation entre deux structures, plus ce facteur est proche de 1 plus les structure sont similaires.



**Figure 75 : Comparaisons de structures cristallographiques du monomère et du monomère reformé dans le dimère d'Alix**

Le monomère est noté en gris. Le dimère est noté en vert et jaune. La région swappée correspond à la région encadrée en rouge. Les deux hélices vertes correspondent au second protomère du dimère.

Si l'on regarde de plus près la structure, on peut voir qu'il y a de légers changements au niveau de la région swappée, c'est à dire entre l'hélice alpha N-terminale (hélice jaune) et les deux autres hélices du second protomère (hélices vertes) (Figure 76).



**Figure 76 : Comparaisons de Structure cristallographiques du monomère et du monomère reformé dans le dimère d'Alix**

Le monomère est noté en gris (PDB 2OJQ). Le dimère est noté en vert et jaune.

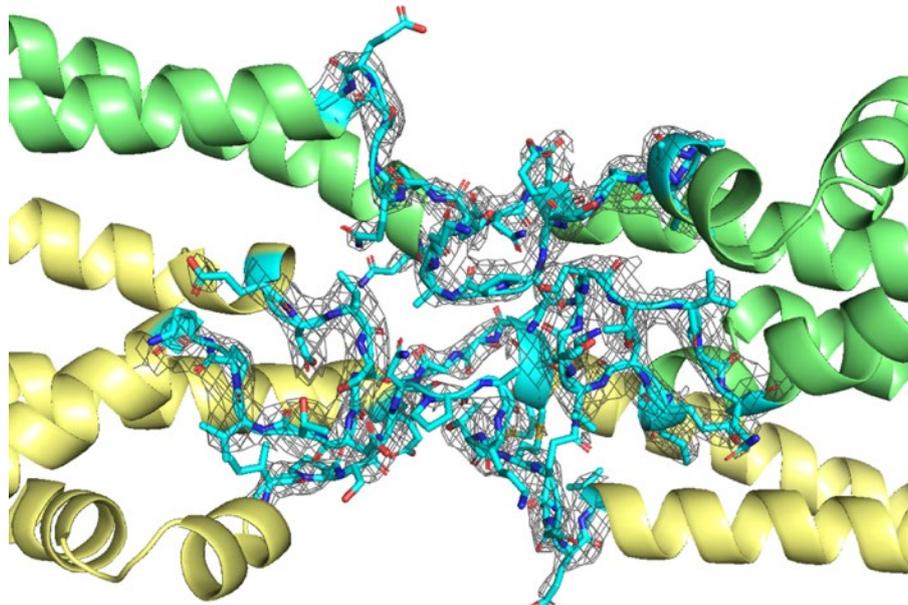
**A.** l'hélice alpha N-terminale du dimère montre un changement de position de 12.8 degrés

**B.** Il y a une structuration en hélices alpha supplémentaire dans le dimère noté en vert (carré rouge)

**C.** il y a deux kicks présents dans le monomère qui ne sont pas visibles dans le dimère, indiqués par les flèches rouges

L'hélice alpha N-terminale du dimère montre un changement de position de 12.8 degrés par rapport à la structure du monomère (Figure 76 A). D'autre part, on peut voir une structuration en hélices alpha supplémentaire dans le dimère sur l'une des hélices swappées (Figure 76 B. carré rouge). En effet, le monomère présente une région flexible suivie d'un kick, le dimère lui, présente une région linéaire structurée en hélice alpha (Figure 76 C. flèche rouge de gauche). Enfin, la région présente entre les deux hélices vertes n'est pas convenablement résolue dans la structure dimérique mais l'orientation de l'hélice alpha est clairement différente dans le monomère (Figure 76 C. flèche rouge de droite).

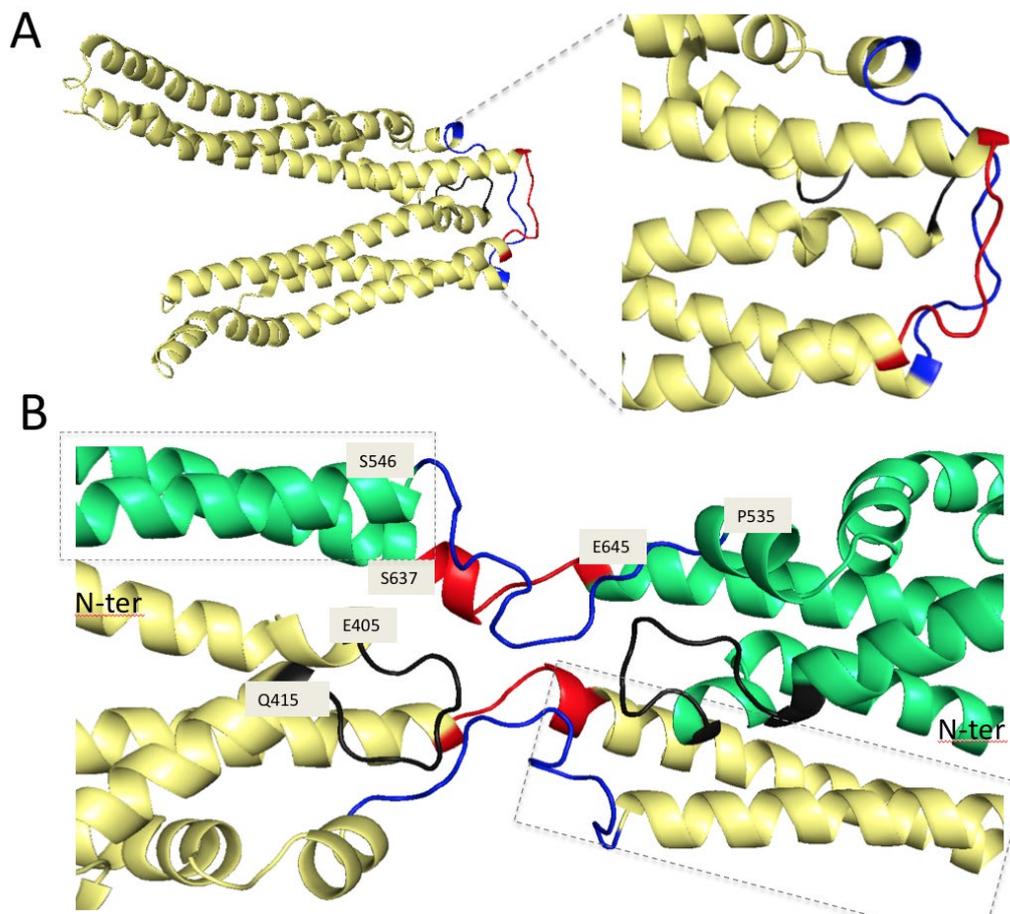
Les données de diffraction étant très anisotropiques, la résolution moyenne atteint seulement 2.7 Å. De plus, la structure est à 90% hélicoïdale. Ces deux facteurs n'ont pas facilité la reconstruction la région charnière. Cependant, la carte de densité électronique semble être en adéquation avec le modèle proposé (Figure 77).



**Figure 77 : Structure cristallographique de la région charnière du dimère du domaine V d’Alix**

La carte de densité (grille grise) a une forte correspondance avec les acides aminés de la région charnière reconstruits (symbolisés en bleu)

Lorsque l’on observe les boucles flexibles qui constituent la région charnière, nous pouvons voir que deux boucles changent de position entre la forme monomérique (Figure 78 A) et la forme dimérique (Figure 78 B) : boucle bleue 1 : AA<sub>535-546</sub>, boucle rouge 2 : AA<sub>637-645</sub>. Ces dernières correspondent aux boucles auxquelles sont rattachées les deux hélices alpha « swappées » (Figure 78 B. carrés gris) qui doivent s’ouvrir. La troisième boucle : boucle noire 3 : AA<sub>405-415</sub> connectée à l’hélice alpha N-terminale du domaine V (notée N-ter) ne montre pas beaucoup de changements de position entre la forme monomérique et la forme dimérique (Figures 78).

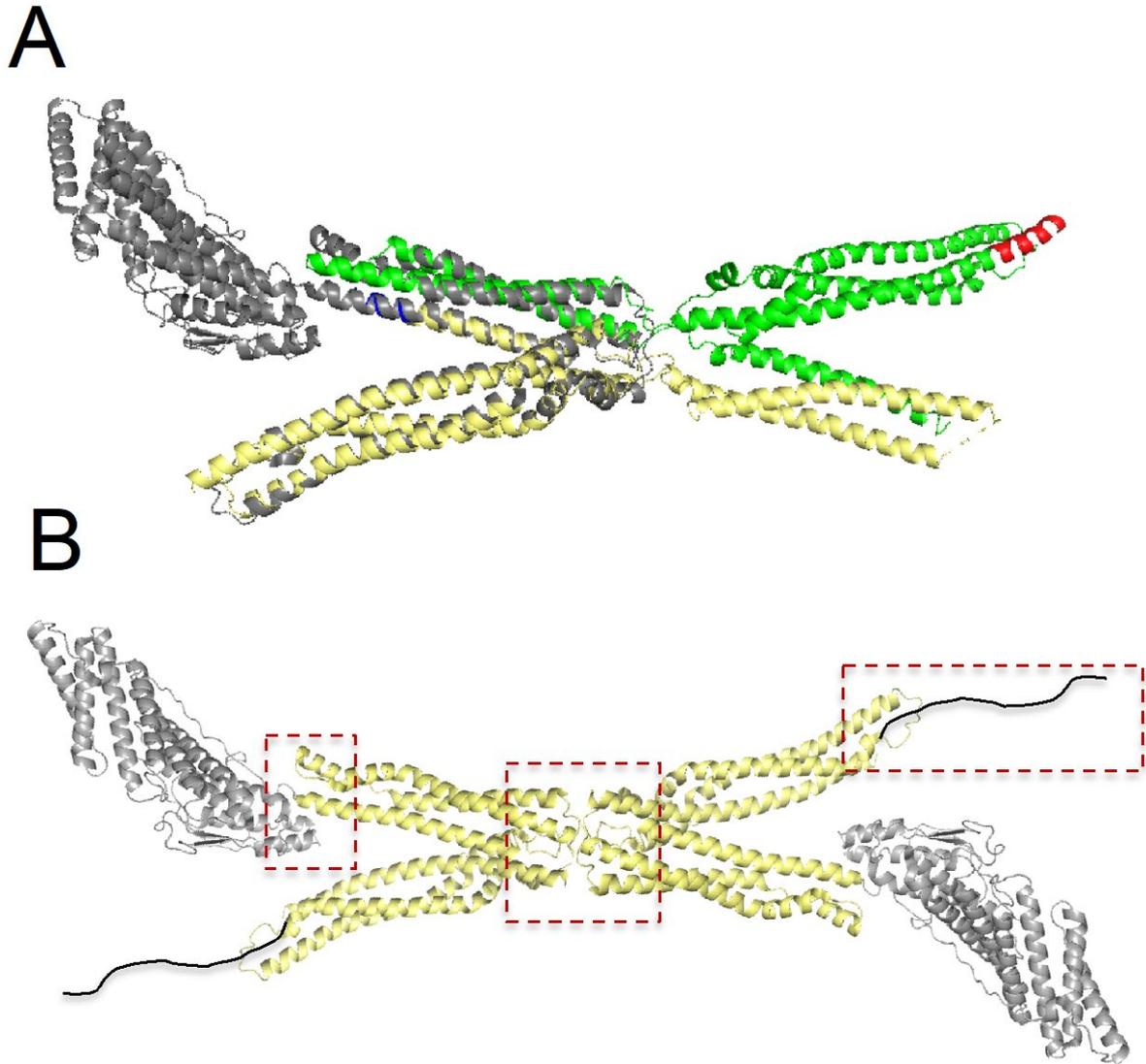


**Figure 78 : Comparaisons des structures cristallographiques de la région charnière du monomère ou du dimère du domaine V d'Alix**

**A.** Structure cristallographique du monomère Alix-V et zoom sur les trois boucles flexibles (PDB 20JQ) **B.** Zoom sur les boucles flexibles du dimère du domaine V d'Alix. L'hélice N-terminale est notée N-ter.

Boucle bleue 1 : AA<sub>535-546</sub> ; boucle rouge 2 : AA<sub>637-645</sub> ; boucle noire 3 : AA<sub>405-415</sub>

Enfin, lorsque l'on superpose la structure du dimère du domaine V avec la structure de la forme monomérique des domaines Bro-V obtenue par Fisher en 2007 (PDB 20EV) cela nous permet d'extrapoler la structure de la protéine entière dimérique, c'est à dire comprenant son domaine Bro-1 et son domaine PRD C-terminal (Figure 79 A). On obtient alors une structure très allongée où les deux domaines Bro-1 sont disponibles de part et d'autre du domaine V dimérique (Figure 79 B).



**Figure 79 : Extrapolation de la structure cristallographiques de la protéine entière dimérique Alix**  
**A.** Superposition de la structure cristallographique de la construction Bro-1-V monomérique (PDB20EV) notée en gris avec la structure du dimère du domaine V ; Le premier protomère du dimère est identifié en jaune, le second protomère est identifié en vert. La partie N-terminale du domaine V de la protéine Alix dimérique est notée en bleu auquel est rattaché le domaine Bro-1 et la partie C-terminale est notée en rouge auquel se rattache le domaine PRD C-terminal.  
**B.** Extrapolation de la structure de la protéine entière dimérique Bro-V-PRD. Le domaine PRD est représenté par une ligne continue noire placée de façon complètement aléatoire puisqu'aucune structure n'est disponible à ce jour. Les carrés rouges indiquent les zones de flexibilité de la protéine.

Rappelons que le domaine Bro-1 est d'une part, le site d'interaction de la protéine CHMP4 dont la liaison est indispensable au relargage du VIH et d'autre part le site d'interaction du lipide endosomal LBPA. En 2009, l'interaction de la protéine Alix  $\Delta$ PRD avec des polymères de la protéine CHMP4 a été mise en évidence en microscopie

électronique par Ricardo Pires (Pires et al., 2009). Dans les structures observées, la protéine Alix  $\Delta$ PRD dimérique « pont » deux filaments de CHMP4 et génère des structures en échelles avec des échelons d'une largeur de 300Å. Nos données SAXS obtenues sur le dimère du domaine V (QC8) révèle une  $D_{max}$  d'environ 200Å. La distance du domaine Bro-1 obtenue à partir de la structure cristallographique PDB 20EV est d'environ 100Å. Dès lors, la configuration dimérique présentée (Figure 79 B) est en adéquation avec les structures en « échelle » obtenues avec la protéine CHMP4 par Ricardo Pires. Enfin, la localisation des deux domaines Bro-1, de part et d'autre de la molécule, pourrait permettre à cette structure dimérique de lier, via son interaction avec le lipide endosomale LBPA, deux membranes distinctes. La structure coiled coil en hélice alpha du domaine V dimérique n'est pas sans rappeler la structure des complexes trans-SNARE qui, de par leur agencement hélicoïdal, force deux membranes à se rapprocher en provoquant une force mécanique sur la membrane et permettant la médiation de la fusion membranaire (Cf. introduction).

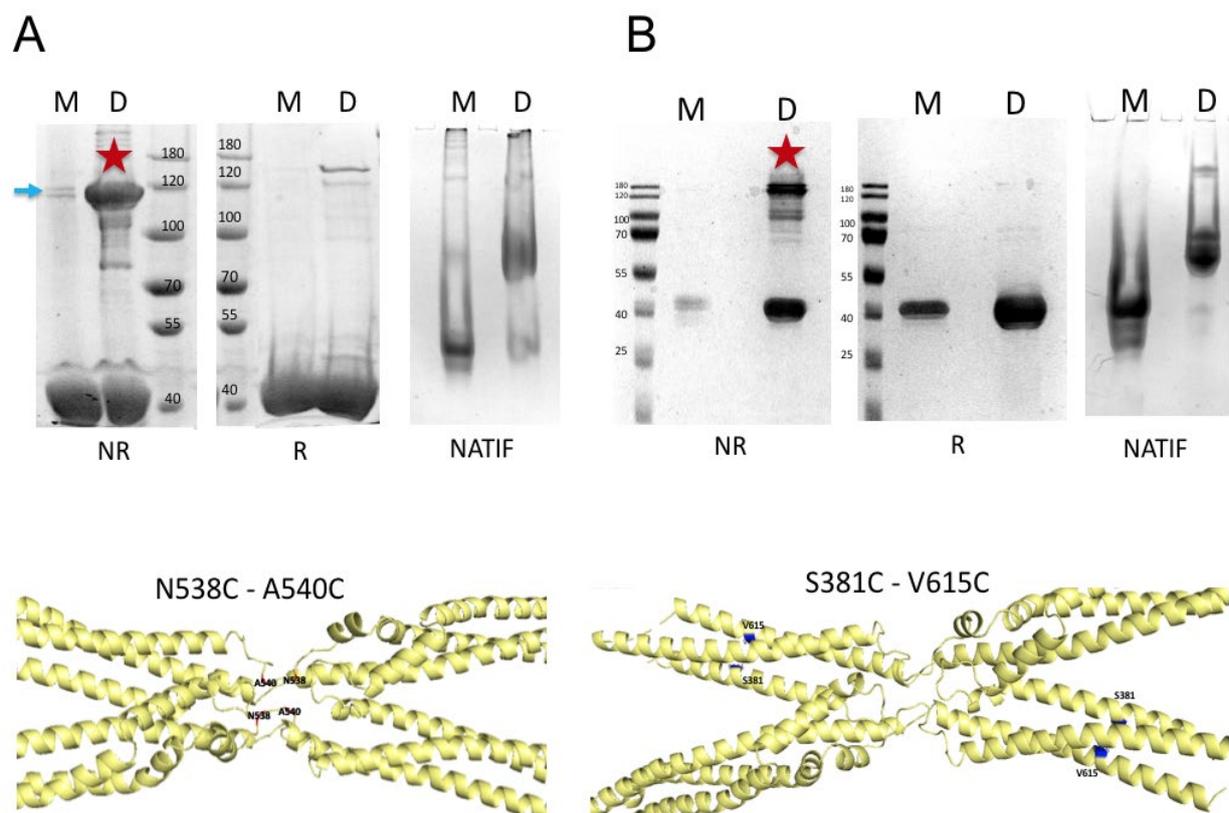
## 6. Validation du modèle dimérique obtenu

Afin de valider la structure dimérique obtenue, nous avons décidé de mettre en place une stratégie basée sur le verrouillage contrôlé de la protéine. Ce verrouillage est opéré en remplaçant des résidus se faisant face dans la structure du dimère par des cystéines. De cette manière, il est possible de créer un pont disulfure entre deux hélices alpha choisies pour verrouiller la structure en absence d'agent réducteur. Ainsi, lorsque la forme dimérique sera mise sur un gel dénaturant dans des conditions non réductrices, nous devrions être capable, si la structure est correcte et que les ponts disulfures se créent, de voir une bande correspondant au dimère (80kDa).

Deux types de mutants cystéine ont été testés : mutant 1 : N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C et mutant 2 : S<sub>381</sub>C-V<sub>615</sub>C. Le mutant 1 correspond à des mutations des acide aminés N<sub>358</sub> et A<sub>540</sub> situés dans la région charnière (Figure 80 A panneau du bas). Le mutant 2 correspond à des mutations des acides aminés S<sub>381</sub> et V<sub>615</sub> localisés sur chacune des deux hélices alpha swapées (Figure 80 B panneau du bas). Les deux mutants ont été produits et purifiés en suivant le même protocole que la protéine Alix WT (Matériels et méthodes 1ere partie I.3). Le monomère et le dimère de chacun des mutants est déposé à la fois sur gel

d'acrylamide dénaturant en présence ou non d'agent réducteur et à la fois sur un gel d'acrylamide natif (Figure 80).

En conditions réductrices (Figure 80 gels R) sur un gel dénaturant, les monomères et les dimères migrent à une taille attendue de 40 kDa (Figure 80 gels R – ligne M et D). Si la structure est correcte, en l'absence d'agent réducteur (Figure 80 ; gels NR) sur un gel d'acrylamide dénaturant, les formes dimériques des deux mutants devraient être capables de créer des ponts disulfures (verrouillage de la structure), et ainsi d'apparaître sous forme d'une bande correspondant au dimère (80 kDa).

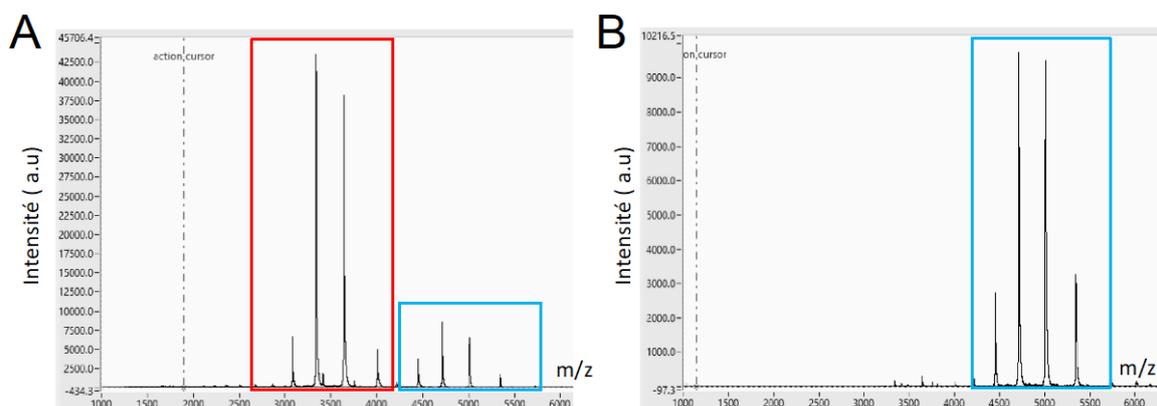


**Figure 80 : Validation de la structure dimérique d'Alix : Étude biochimique des mutants N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C et S<sub>381</sub>C-V<sub>615</sub>C**

**A. Mutant N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C. Panneau du haut :** gel acrylamide 8 %/SDS M : monomère ; D : dimère ; NR : condition non réductrice ; R : condition en présence d'agent réducteur ; NATIF : gel acrylamide 10% natif  
**Panneau du bas :** localisation des acides aminés mutés dans la structure cristallographique

**A. Mutant S<sub>381</sub>C-V<sub>615</sub>C. Panneau du haut :** gel acrylamide 8 %/SDS M : monomère ; D : dimère ; NR : condition non réductrice ; R : condition en présence d'agent réducteur ; NATIF : gel acrylamide 10% natif  
**Panneau du bas :** localisation des acides aminés mutés dans la structure cristallographique

Pour chacun des deux mutants, une bande aux alentours de 120 kDa est observée dans les puits de dimère (Figure 80 échantillons marqués d'une étoile rouge). Cette taille étant plus grande que celle attendue (80 kDa), il a été nécessaire de vérifier que l'espèce produite par le pont disulfure était un dimère et non un multimère. Cependant, il est à noter qu'il n'est pas rare qu'en conditions non réduites, la migration des échantillons soit aberrante. D'autre part, le mutant N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C monomérique montre une faible bande à 120kDa en absence d'agent réducteur, ce qui indiquerait qu'il soit contaminé par la présence de dimère (Figure 80 échantillon M – NR marqués d'une flèche bleue). Pour confirmer l'état d'oligomérisation des échantillons dimériques, deux techniques ont été mises en place en parallèle : un gel natif et une spectrométrie de masse en condition native. Le gel natif a confirmé la présence d'un dimère pour les deux mutants ayant une migration semblable au dimère de la protéine WT (cf 1<sup>ère</sup> partie I.2.Figure 53). Enfin, une spectroscopie de masse native a été réalisée sur le mutant N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C afin de confirmer cet état d'oligomérisation. Le spectre de masse native du mutant N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C monomérique montre une faible proportion de dimère (carrée bleu Figure 81 A) ce qui expliquerait la faible bande obtenue à 120 kDa dans l'échantillon monomérique (Figure 80 A - gel NR -ligne M flèche bleue). Le spectre de masse native confirme que l'espèce ayant un profil à 120 kDa en conditions non réduites correspond bien à un dimère de 80kDa (carrée bleu Figure 81 B).



**Figure 81 : Profil de spectrométrie de masse native du mutant Alix QC8 N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C monomérique ou dimérique**

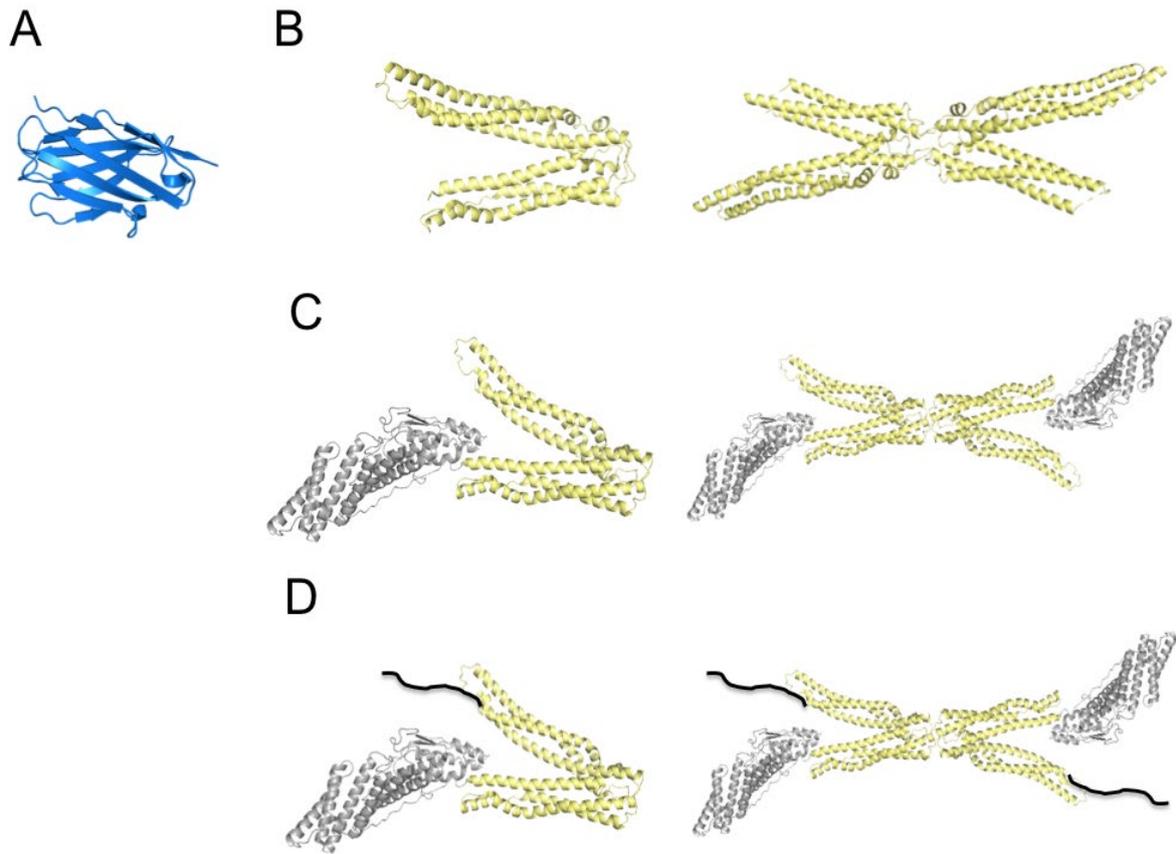
**A.** Profil du mutant Alix-V QC8 N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C monomérique **B.** Profil du mutant Alix-V QC8 N<sub>538</sub>C-A<sub>540</sub>C dimérique

En conclusion, nous avons réussi à valider la structure dimérique obtenue du domaine V de la protéine Alix. Cependant, la résolution de cette structure ne nous a pas

permis de répondre à notre question initiale, à savoir comment le processus de dimérisation est initié. Les faibles différences entre les structures monomérique et dimérique ne nous permettent pas d'envisager des hypothèses sur le processus d'initiation de dimérisation. En outre, la structure ne nous donne aucune informations pour comprendre le mutant de dimérisation mut-1 obtenu par Ricardo Pires (étudiant en thèse en 2008) montrant un rôle défectueux dans le bourgeonnement du VIH (Pires et al., 2009). La stratégie de mutation a été difficile à mettre en place à cause de la forte similarité des structures monomérique et dimérique. Et aucunes données structurales ne nous permettent d'envisager une stratégie pour obtenir du dimère à partir de monomère *in vitro*.

### **III. Caractérisation de l'affinité des Nanocorps pour les différentes constructions d'Alix**

Les nanocorps ont été créé afin de stabiliser la structure du dimère du domaine V de la protéine Alix (construction notée Alix-V QC8). Il s'avère que, de tous les nanocorps qui ont été générés, aucun n'est spécifique de la forme dimérique. En effet, ils reconnaissent tous, les deux entités du domaine V. Dans le but d'utiliser ces nanocorps afin d'étudier la localisation de la forme dimérique dans les cellules pendant différents processus cellulaires tels que la cytokinèse, le bourgeonnement du HIV ou la formation des exosomes, j'ai voulu savoir si ces nanocorps reconnaissent de la même manière les deux autres constructions de la protéine Alix, c'est-à-dire la protéine Alix  $\Delta$ PRD (Bro-V) et la protéine entière notée FL (full length) (Figure 82).



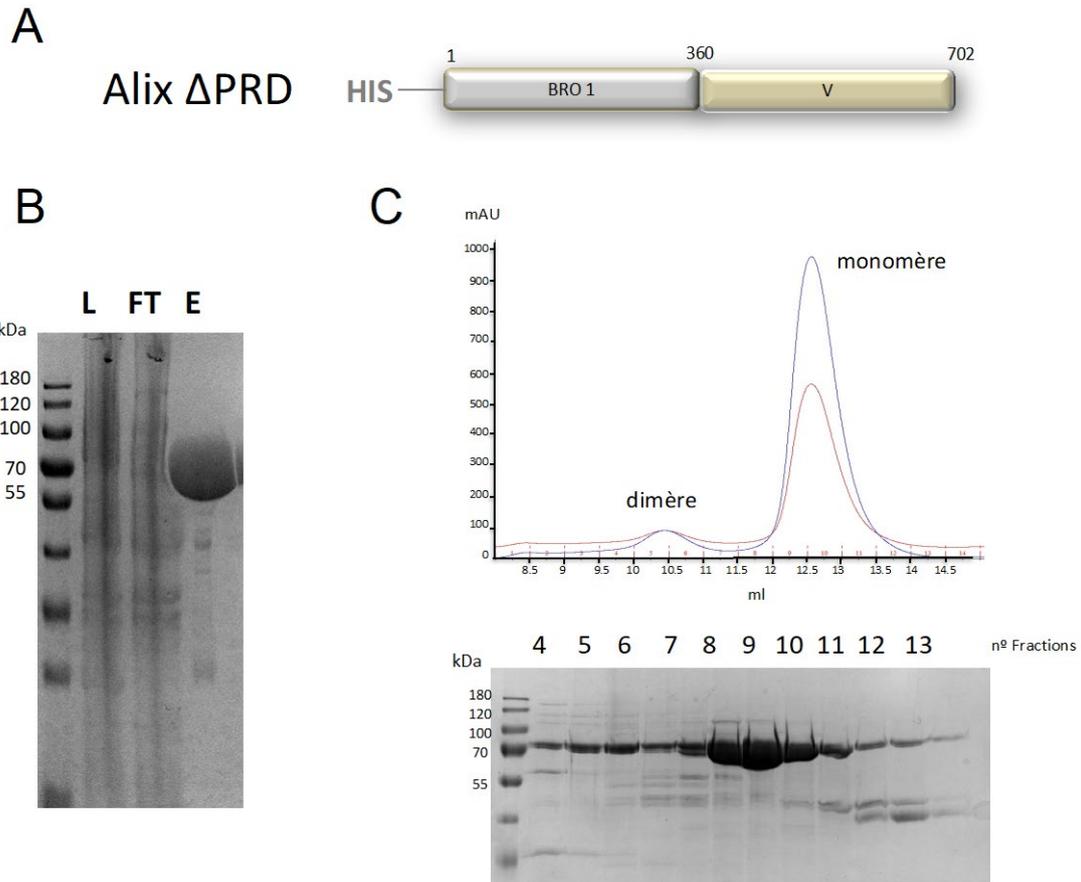
**Figure 82 : Ligand et Analyte utilisés pour la caractérisation des affinités des différentes constructions de la protéine Alix en fonction des nanocorps**

**A.** Nanocorps utilisé comme analyte.

**B.C.D** Les Ligands : Les panneaux de gauche représentent les formes monomériques et les panneaux de droite représentent les formes dimériques

**B.** Alix-V QC8 (domaine V) **C.** Alix  $\Delta$ PRD (Bro-V) **D.** Alix FL (Bro-V-PRD). Le domaine PRD est représenté par une ligne continue noire placée de façon complètement aléatoire puisqu'aucune structure n'est disponible à ce jour. En jaune : domaine V ; en gris : domine Bro-1

Afin de caractériser l'affinité des nanocorps pour les différents oligomères et les différentes constructions d'Alix, j'ai d'abord purifié séparément toutes les protéines et les nanocorps. Tous les nanocorps ont été purifiés comme décrit dans la partie II. A.2. La construction Alix-V QC8 a été purifiée comme décrit dans la partie I.1. La purification de la construction Alix  $\Delta$ PRD (Bro-1-V) est très similaire à la purification du domaine V QC8 (Figure 83).



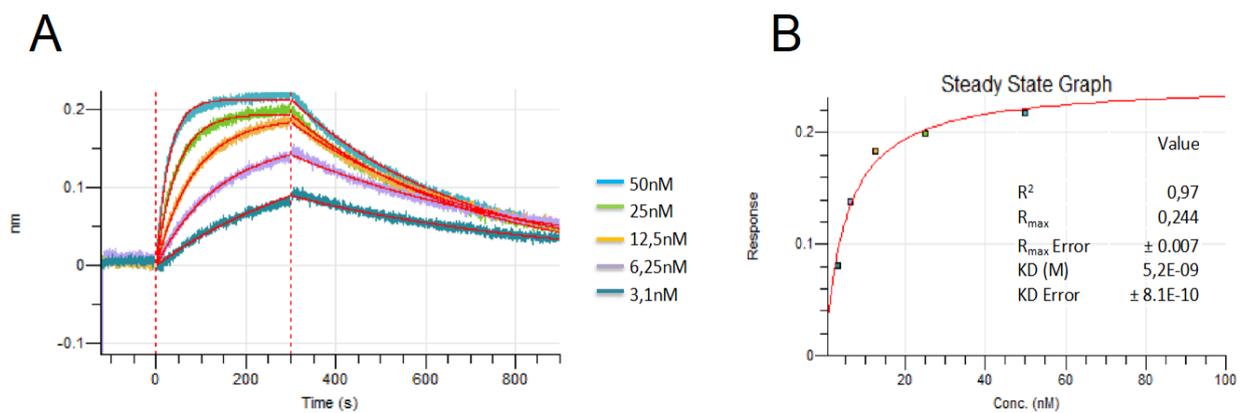
**Figure 83 : Purification de la protéine Alix  $\Delta$ PRD**

**A.** Représentation schématique des deux domaines de la protéine Alix  $\Delta$ PRD **B.** Purification de la protéine Alix  $\Delta$ PRD sur colonne de nickel L : Échantillon chargé ; FT : Non retenu ; E : Élué **C.** Profils de filtration sur gel S200 increase de la protéine Alix  $\Delta$ PRD et analyse des fractions sur gel d'acrylamide SDS 15% coloré au bleu de Coomassie. Les fractions 4-5-6 correspondent au dimère et les fractions 8-9-10-11 au monomère.

L'expression de la protéine de fusion His-Alix  $\Delta$ PRD est réalisée dans des bactéries *E.Coli* Rosetta. La protéine éluée de la colonne de nickel montre une seule bande correspondant à la taille de la protéine 79kDa (Figure 83 B). Pour le reste, elle est purifiée dans les mêmes tampons et de la même manière que la construction Alix QC8 (partie I.1). Les deux seules différences résident dans le fait que, d'une part, je ne clive pas l'étiquette 6 histidines. En effet, au cours des différentes purifications de la protéine, je me suis aperçue que la protéine étiquetée présente plus de dimère que celle non étiquetée, j'ai donc choisi de garder l'étiquette pour cette construction. D'autre part, l'étape sur la colonne de monoP n'est pas utile. En effet, cette construction produit très peu de dimère et les tailles du dimère et du monomère de cette construction sont suffisamment différentes pour être séparées en filtration sur gel aux volumes d'élué de 10.5ml et 12.5ml respectivement (Figure 83 C).



Afin de déterminer l'affinité des différents oligomères des différentes constructions d'Alix, j'ai mis en place des mesures d'interférométrie biocouche (BioLayer Interferometry- BLI) pour lesquelles les nanocorps étaient les analytes et les différentes constructions d'Alix, les ligands. Les différentes constructions de la protéine Alix sont biotinylées puis sont fixées aux biocapteurs à streptavidine. Une cinétique est effectuée pour chacun des couples ligand / analyte en utilisant une gamme de concentration 0nM, 3.13nM, 6.25nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM, 200nM pour les nanocorps et une concentration de 25µg/ml pour tous les analytes. Pour chacun des couples, l'analyse a été faite en duplicat en régénérant les biocapteurs dans 10mM glycine pH3. J'ai ensuite analysé les mesures grâce au logiciel ForteBio et j'ai déterminé la constante d'affinité de chacun des couples étudiés. La figure 85 présente un exemple de courbes obtenues et les valeurs obtenues à l'équilibre pour l'association du nanocorps NB79 avec Alix-V QC8.



**Figure 85 : Mesure d'affinité du domaine V dimérique de la protéine Alix avec le nanocorps 79**

**A.** Association et dissociation du nanocorps 79 au dimère du domaine V de la protéine Alix. Cinq sensorgrammes sont présentés correspondant à 5 concentrations de nanocorps différentes. Le BLI a été réalisé à 25°C dans le tampon BLI-100 (50mM Tris-Cl pH 7,5, 0,05% Tween-20). Dans le graphique présenté, l'association a eu lieu pendant 300 secondes, puis les échantillons ont été transférés dans un puits contenant du tampon pour mesurer la dissociation. Les lignes pleines représentent les lignes d'ajustement du logiciel ForteBio. **B.** Données cinétiques obtenues à l'équilibre dérivées de l'expérience présentée en A.

La caractérisation des affinités des oligomères des différentes constructions de la protéine Alix avec les nanocorps n'a pas été simple car pour certains couples, la dissociation des nanocorps était trop rapide pour nous permettre d'aligner les courbes générées avec les courbes théoriques sur un modèle 1 :1. Dès lors, nous n'avons pas pu déterminer les constantes d'association ou de dissociation mais seulement la constante

d'affinité de ces couples à l'équilibre (steady state graph Figure 85 B). D'autres part, certains  $K_d$  n'ont pas pu être déterminés (Figure 85 noté X). En effet, pour certains couples, les analyses obtenues à l'équilibre ne montrent que le tout début de la gamme lorsqu'elle est encore linéaire (3 premiers points de la courbe sur le graphique de la Figure 85 B). Ce qui indique que nous ne sommes donc pas dans les bonnes gammes de concentrations d'analyte pour obtenir une courbe-réponse complète et donc un signal interprétable. Malgré cela, ces résultats nous donnent une indication sur le fait que l'interaction du couple protéine/nanocorps est de très faible affinité.

Ligand	Analyte	KD (M)	$K_{on}$ (1/Ms)	$K_{off}$ (1/s)
<b>Nanobody 79</b>	Alix QC8 Monomère	$5,7 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-2}$
	Alix QC8 Dimère	$5,2 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-3}$
	Alix ΔPRD Monomère	$7,7 \cdot 10^{-8}$	X	X
	Alix ΔPRD Dimère	X	X	X
	Alix FL Monomère	X	X	X
	Alix FL Dimère	X	X	X
<b>Nanobody 96</b>	Alix QC8 Monomère	$2,8 \cdot 10^{-8}$	$8 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
	Alix QC8 Dimère	$2,7 \cdot 10^{-8}$	X	X
	Alix ΔPRD Monomère	$1,6 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-2}$
	Alix ΔPRD Dimère	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$8,2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-2}$
	Alix FL Monomère	$3,4 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^{-2}$
	Alix FL Dimère	$4 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^{-2}$
<b>Nanobody 603</b>	Alix QC8 Monomère	$5,7 \cdot 10^{-8}$	X	X
	Alix QC8 Dimère	$3,6 \cdot 10^{-8}$	X	X
	Alix ΔPRD Monomère	X	X	X
	Alix ΔPRD Dimère	X	X	X
	Alix FL Monomère	X	X	X
	Alix FL Dimère	X	X	X

**Figure 86 : Mesure d'affinité des oligomères des différentes constructions de la protéine Alix avec les nanocorps**

$K_d$  : constante d'affinité ;  $K_{on}$  : constante d'association ;  $K_{off}$  : constante de dissociation

Pour plus de clarté, j'ai rassemblé les résultats d'interaction obtenus pour tous les couples protéine/nanocorps dans un tableau (Figure 86). Grâce à la superposition du modèle théorique 1:1 aux résultats expérimentaux et grâce aux calculs du logiciel ForteBio, ces mesures d'interférométrie biocouche m'ont permis de déterminer un  $K_d$  de 5.7 nM pour les deux oligomères (monomère ou dimère) de la protéine Alix-V QC8 avec le nanocorps NB79. Un  $K_d$  de 28 nM est obtenu pour les deux oligomères de la protéine Alix-V QC8 avec le nanocorps NB96 et un  $K_d$  de l'ordre de 40 nM est obtenu pour les deux oligomères de la protéine Alix-V QC8 avec le nanocorps NB603. Par contre pour ce nanocorps NB603, aucune constante de dissociation n'a pu être déterminée car la dissociation observée était quasiment immédiate lorsque les biocapteurs étaient retirés de la solution de nanocorps. Bien que l'immunisation des lamas ait été faite avec la protéine Alix-V dimérique, on observe que les nanocorps sont aussi capables de reconnaître la protéine monomérique avec des affinités similaires. Par contre, ces nanocorps présentent des affinités et des comportements d'interaction différents pour la protéine Alix-V.

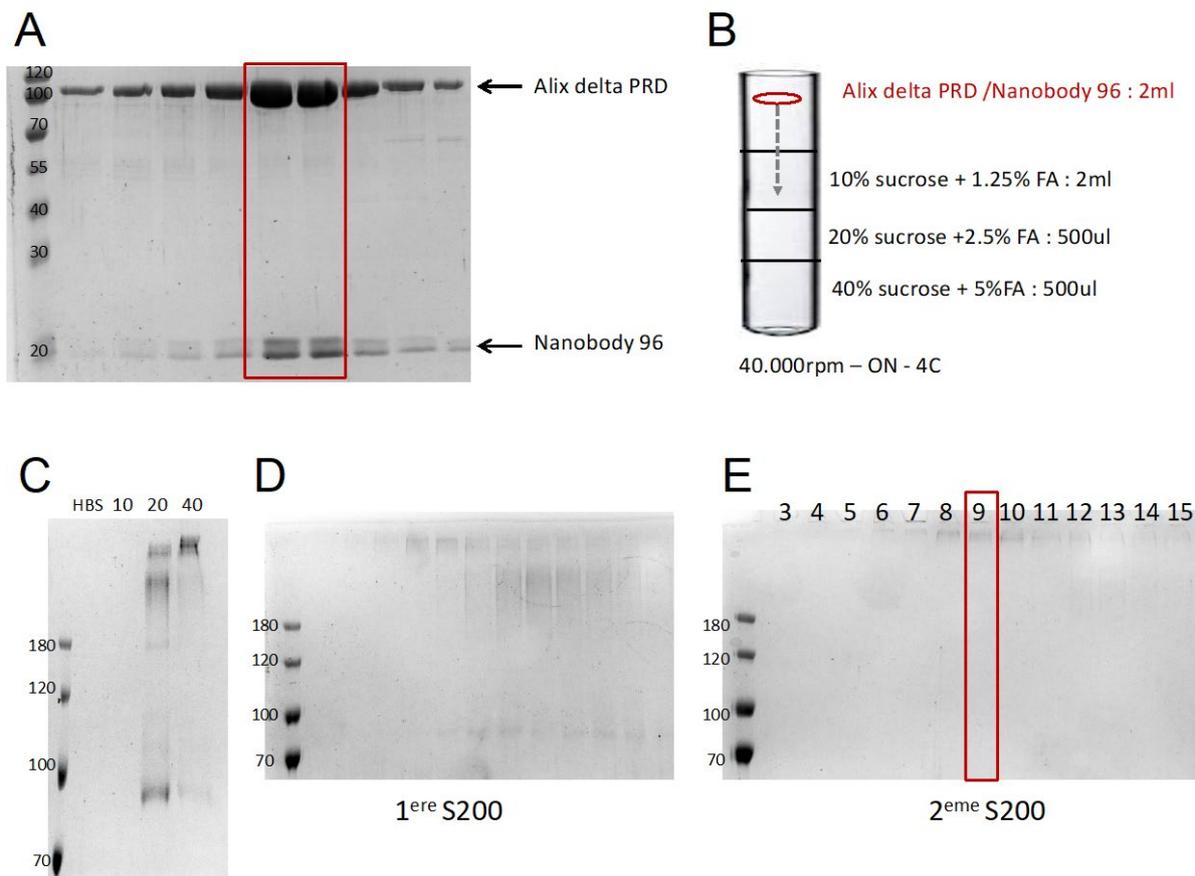
Pour la construction Alix  $\Delta$ PRD, un  $K_d$  de 77 nM a été déterminé avec le nanocorps NB79. Mais, de la même manière que pour le couple Alix-V QC8/NB603, aucune constante de dissociation n'a été déterminée du fait d'une dissociation immédiate et rapide. Un  $K_d$  de 1.6 nM a été obtenu pour les deux oligomères (monomère ou dimère) de cette construction avec le nanocorps NB96. Tandis que l'affinité avec nanocorps 603 n'a pas pu être déterminée. Les résultats d'interaction de la protéine entière Alix FL avec les nanobody n'a permis de déterminer qu'une seule constante d'affinité avec le nanobody NB96 avec un  $K_d$  de l'ordre de 40 nM pour les deux oligomères.

En conclusion, aucun nanocorps testé n'a révélé une liaison différente entre les oligomères de chacune des constructions. Comme nous pouvons le remarquer, le nanocorps NB96 est le seul nanocorps capable de lier la protéine entière avec une constante d'affinité de l'ordre de 30-40 nanomolaire ce qui représente une affinité assez forte. Cela peut nous permettre d'envisager d'utiliser ultérieurement ce nanocorps pour des études cellulaires. Cependant, il ne nous permettra pas de distinguer la forme monomérique de la forme dimérique.

## **IV. Caractérisation structurale du dimère de la protéine Alix $\Delta$ PRD (Bro-V) en interaction avec le nanocorps NB96 par microscopie électronique**

### **1. Préparation des échantillons**

A la suite de la caractérisation des affinités des nanocorps avec les différentes constructions d'Alix, j'ai initié le travail de résolution de la structure du dimère de la protéine Alix  $\Delta$ PRD par microscopie électronique en complexe avec le Nanocorps NB96. Le nanocorps NB96 et la protéine Alix  $\Delta$ PRD dimérique ont été purifiés séparément. Le complexe est formé en présence d'un excès de nanocorps afin de saturer tous les sites d'interaction avec la protéine Alix. Puis, le complexe est passé sur une colonne de filtration sur gel Superdex 200 increase prééquilibrée dans le tampon 20mM Hepes pH7.5 /150mM NaCl afin d'enlever l'excès de nanocorps (Figure 87 A). Le complexe est ensuite soumis à un gradient de saccharose en présence de formaldéhyde (Figure 87 B et C). Les fractions 20% et 40% sucrose sont redéposées sur deux filtrations sur gel successives afin d'obtenir des fractions homogènes (Figure 87 D et E). Finalement, la fraction F9 est concentrée et visualisée en coloration négative en microscopie électronique par Guidenn Sulbaran (Figure 87 E ligne 9).

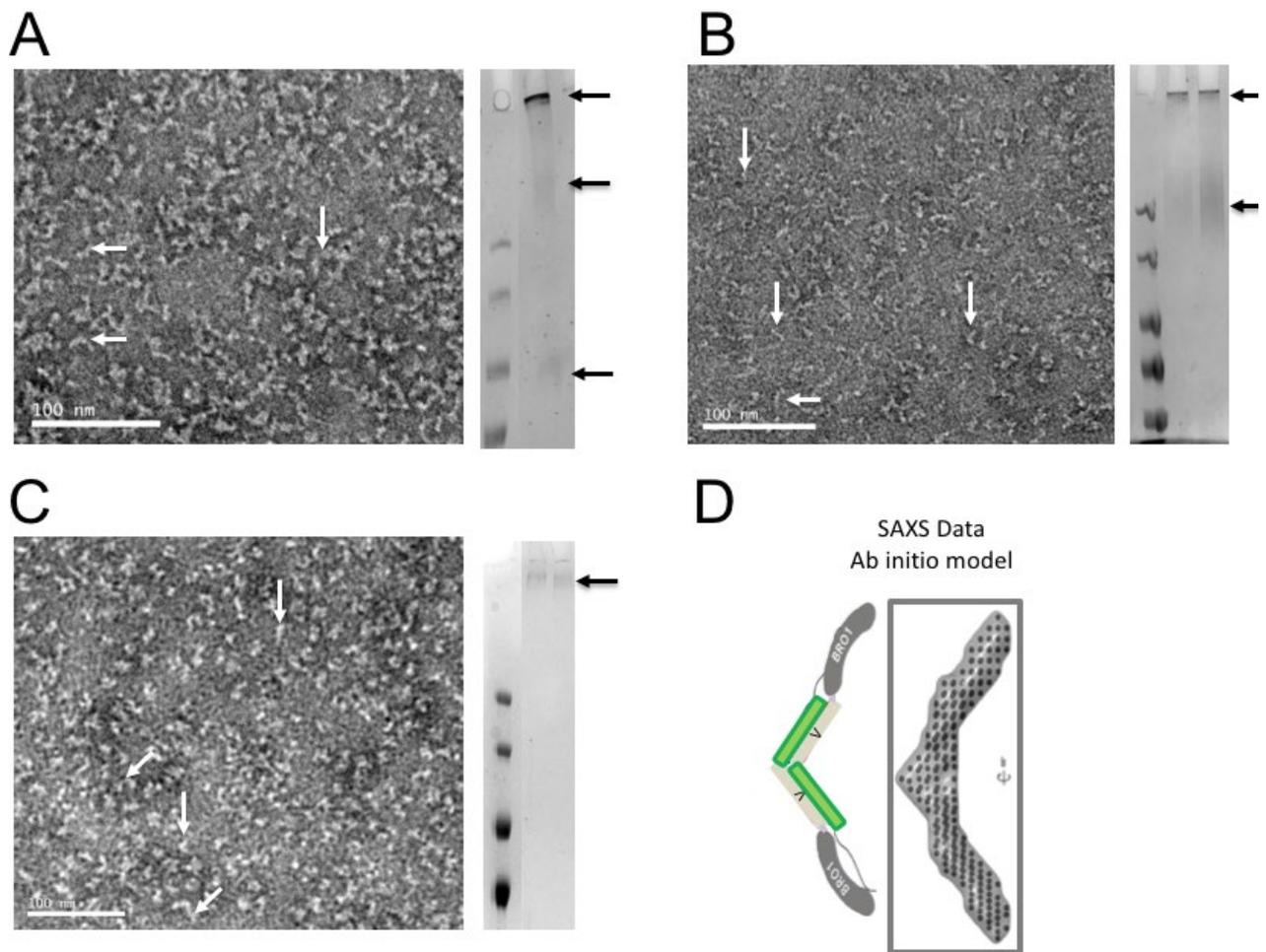


**Figure 87 : Purification du complexe Alix  $\Delta$ PRD dimérique / Nanocorps 96**

**A.** Analyse des fractions de la filtration sur gel du complexe de la protéine Alix  $\Delta$ PRD dimérique et du Nanocorps 96 sur gel d'acrylamide SDS 15% coloré au bleu de Coomassie. **B.** gradient de sucrose en présence de formaldéhyde **C.** analyse des fractions du gradient de sucrose sur gel d'acrylamide SDS 8% coloré au bleu de Coomassie. **D.** Analyse des fractions la première filtration sur gel de la fraction 40% sucrose sur gel d'acrylamide SDS 15% coloré au bleu de Coomassie. **E.** Analyse des fractions de la deuxième filtration sur gel de la fraction 40% sucrose sur gel d'acrylamide SDS 15% coloré au bleu de Coomassie.

## 2. Microscopie électronique du complexe Alix $\Delta$ PRD dimérique/NB96

Plusieurs analyses en microscopie électronique ont été réalisées pour le complexe Alix  $\Delta$ PRD dimérique/ NB96. Les images obtenues en coloration négative sont présentées Figure 88. Les différentes images présentent les différentes étapes de purification du complexe. En A, l'image obtenue représente l'échantillon juste après le gradient de sucrose sans aucune autre purification. L'échantillon sur gel de Coomassie est hétérogène, il y a trois bandes signifiées par les flèches. Sur l'image de microscopie, on peut observer des structures en croissant qui pourraient correspondre au dimère de la protéine Alix  $\Delta$ PRD et des agrégats. Ces structures en croissant ressemblent à la forme obtenue en SAXS par Ricardo Pires (Figure 88 D).



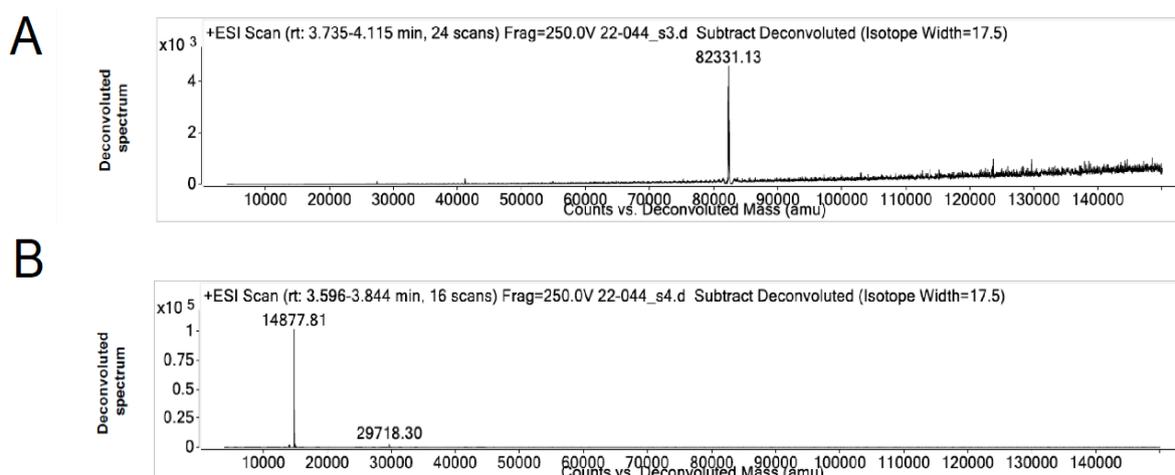
**Figure 88 : Image de microscopie électronique en coloration négative : Étapes de purification du complexe Alix  $\Delta$ PRD dimérique/ NB96**

**A.** échantillon correspondant à la fraction 20% de sucrose **B.** Échantillon après une S200 **C.** Échantillon après 2 S200 **D.** Représentation schématique et modèle *ab initio* obtenu par SAXS par Ricardo Pires de la protéine Alix  $\Delta$ PRD dimérique.

Ce premier échantillon nécessitait une étape de purification supplémentaire. Une filtration sur gel a donc été rajoutée à la suite du gradient de sucrose. En B, on observe sur gel de Coomassie que l'échantillon est beaucoup plus homogène. Malgré cela, Guidenn Sulbaran estime que l'échantillon était encore trop hétérogène pour pouvoir réaliser des grilles de cryomicroscopie. Dès lors, j'ai rajouté une deuxième filtration sur gel après le gradient de sucrose. En C, on observe sur le gel de Coomassie que l'échantillon semble plutôt homogène. Les images de microscopie seront à montrer à Gregory Effantin du groupe Groupe Microscopie Electronique et Méthodes (MEM) de l'IBS, afin de savoir si cet échantillon est prometteur pour une analyse plus poussée en cryomicroscopie.

### 3. Caractérisation du complexe Alix ΔPRD dimérique /NB96 en spectrométrie de masse

Avant d'aller plus loin dans cette étude structurale par microscopie électronique, il m'a paru évident de caractériser le complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96. En effet, une question a émergé aux vues des images de microscopie, l'hétérogénéité de l'échantillon vient-elle uniquement de la flexibilité de la molécule ou aussi du fait de l'hétérogénéité du complexe. Dès lors, une spectrométrie de masse sur le complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross linké a été envisagé afin de déterminer la stœchiométrie du complexe. Dans un premier temps, la protéine Alix ΔPRD dimérique et le nanocorps 96 ont été analysés séparément en spectrométrie de masse dénaturante par ionisation par électronébulisateur (electrospray) afin de vérifier leurs masses respectives.



**Figure 89 : Spectres de masse déconvolué de la protéine Alix Δ PRD et du Nanocorps 96 seuls**  
A. Spectre de masse déconvolué de la protéine Alix Δ PRD C=10.6uM ; dilution1 :2 ; 4ul injectés B. Spectre de masse déconvolué du Nanocorps 96 C=22μM ; dilution 1:4 ; 4μl injectés

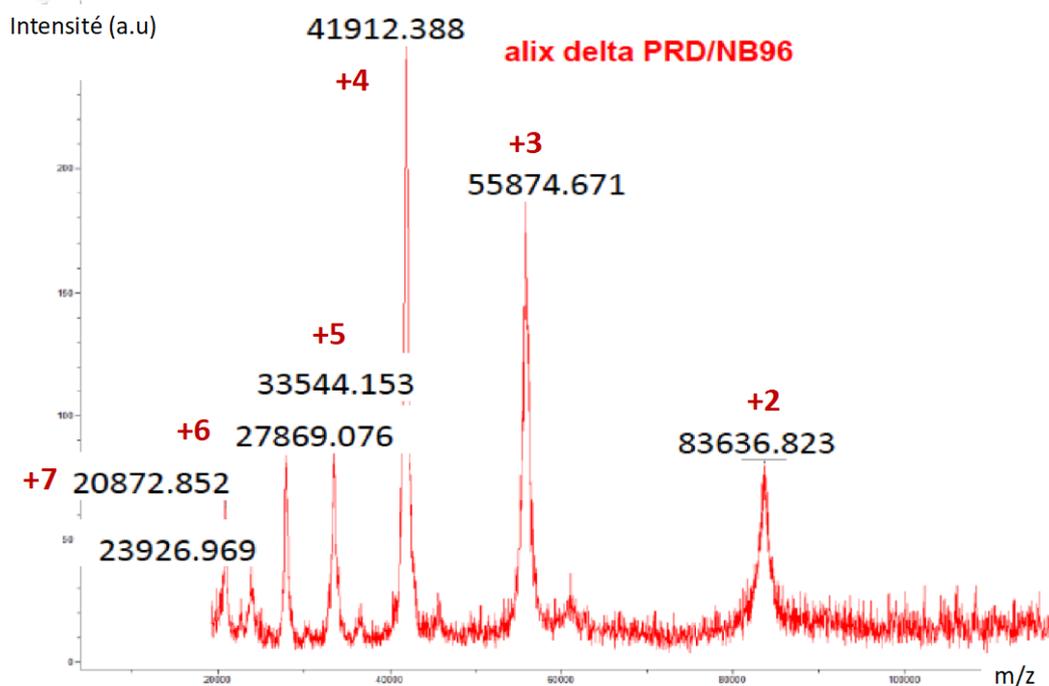
Les masses obtenues correspondent aux masses attendues, du nanocorps 96 : His-NB96 et du monomère de la protéine His -TEV Alix ΔPRD, à savoir des masses respectives de 14.8 kDa et 82.9 kDa (Figure 89). Puis une analyse par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) a été réalisée pour analyser la stœchiométrie du complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross-linké. Il faut savoir que l'interprétation des spectres sur des échantillons cross-linkés est très

compliquée car il est impossible de savoir combien de masses supplémentaires l'agent pontant, ici le formaldéhyde, va rajouter dans l'analyse. L'ionisation conduit à la production d'ions multichargés,  $[M+zH]^{z+}$ . Ceci se traduit sur le spectre de masse par une enveloppe comportant plusieurs pics correspondant à une distribution statistique de charges qui dépend de la stabilité des ions multiprotonés en phase gazeuse.

Afin d'interpréter au mieux le spectre obtenu pour le complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross-linké et pour plus de clarté dans la compréhension, j'ai créé un tableau comprenant les différents poids moléculaires des différents composants (Figure 90 et tableau 4).

	MW (Da)	m/z=2	m/z=3	m/z=4
Alix ΔPRD	82331	41166	27444	20583
Alix ΔPRD dimérique	<b>164662</b>	<b>82331</b>	<b>54887</b>	<b>41166</b>
NB96	14877	7439	4959	3719
Alix ΔPRD dimérique + 1 NB96	179539	89770	59846	44885
Alix ΔPRD dimérique + 2 NB96	194416	97208	64805	48604

**Tableau 4 : Comparaison des masses moléculaires théoriques des protéines Alix ΔPRD, du nanocorps 96 et du complexe Alix ΔPRD/NB96 avec les masses obtenues en spectrométrie de masse**



**Figure 90 : Spectre de masse du complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross linké**

Si l'on considère  $m/z$  83636 comme une espèce doublement chargée, le  $m/z = 55874$  comme une espèce triplement chargée, le spectre obtenu correspondrait à un dimère d'Alix sans nanocorps. Il semblerait donc que le nanocorps pourtant présent après la filtration sur gel (Figure 87 A) se soit dissocié du dimère d'Alix. Pourtant la constante d'association mesurée en BLI avec ce nanocorps est de 15 nanomolaire. Ce qui expliquerait pourquoi malgré les étapes de purifications supplémentaires, l'échantillon montre une hétérogénéité. Cela vient de la flexibilité de la molécule que l'on pensait pouvoir diminuer par la fixation du Nanocorps.

## ***2<sup>eme</sup> partie : Étude de l'interaction entre la protéine Alix et son partenaire Alg-2***

La protéine Alix a été initialement découverte en tant que partenaire de la protéine proapoptotique Alg-2. Trioulier et ses collaborateurs ont montré que Alg-2 se lie au domaine PRD de la protéine Alix, sur la région  $_{802}PGY_{813}$  composé de 12 acides aminés riche en tyrosine (Trioulier et al., 2003 ; Shibata et al., 2004). Alg-2 forme un homodimère. En présence de calcium, la protéine change de conformation, devient active et chaque molécule de monomère peut accepter un peptide d'Alix. Dans cette partie, la question est de savoir si la protéine Alg-2 était capable d'induire à elle seule la dimérisation de la protéine Alix puisque la résolution de la structure du domaine V dimérique n'a pas permis de répondre, à elle seule, à cette interrogation.

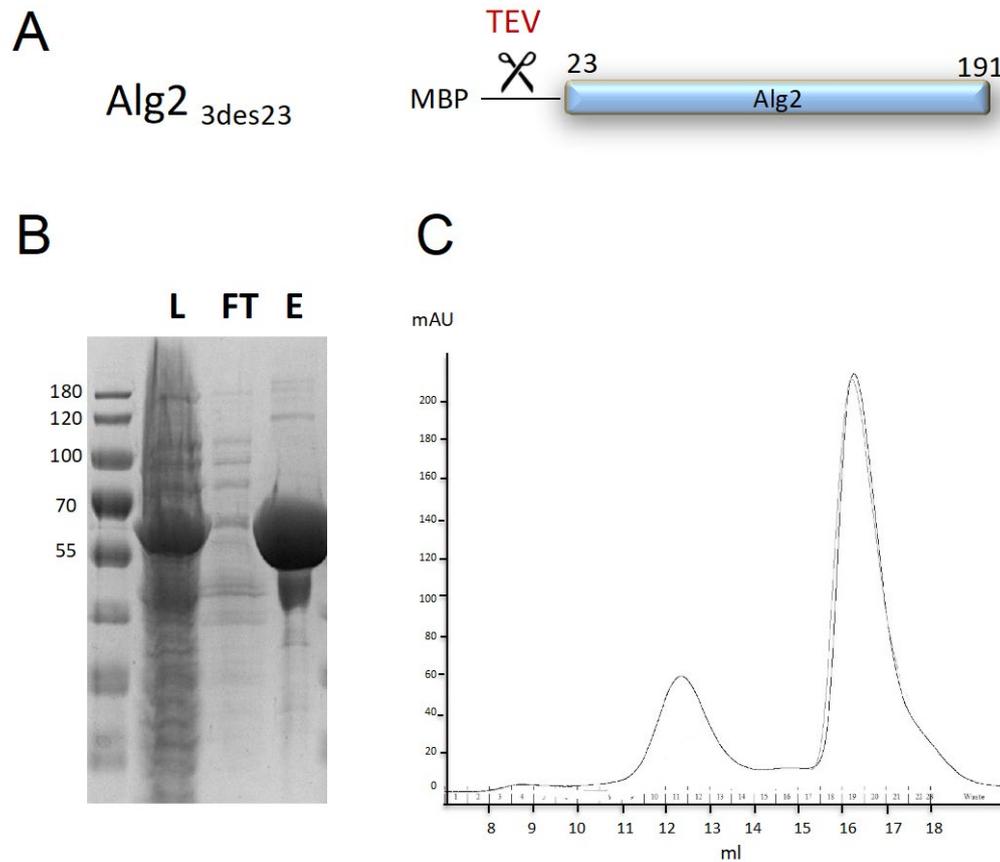
### **I. Caractérisation structurale du complexe Alix FL /Alg-2**

D'après les résultats obtenus par Suzuki et collaborateurs, les protéines Alix et Alg-2 interagissent de façon spécifique et avec une forte affinité. En 2008, cette interaction est décrite à l'échelle atomique par la structure cristallographique du complexe entre la protéine Alg-2, tronquée des 20 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale (des3-23Alg-2), et d'un oligopeptide d'Alix de 16 résidus (1 GPPYPTYPGYPGYSQ 16) correspondant aux acides aminés 799-814 en présence de  $Zn^{2+}$  à une résolution de 2,2 Å (PDB 2ZNE). C'est pourquoi nous avons essayé d'étudier en microscopie électronique la protéine Alix FL en complexe avec Alg-2  $_{3-des23}$ .

#### **1. Expression et purifications des protéines Alix FL et Alg-2 $_{3-des23}$**

L'expression de la protéine de fusion Flag-Alix FL a été réalisée comme décrit précédemment (1<sup>ere</sup> partie III- Figure 84 B). Le profil de filtration sur gel montre deux pics à 10.5ml et 12.5ml correspondant respectivement au dimère (fractions 4-5-6) et au monomère (Fractions 9-10-11) de la protéine (Figure 84 C). Le gène codant pour la protéine Alg-2 dépourvue des 20 acides aminés de l'extrémité N-terminale hydrophobe a été cloné dans le vecteur pETM41. La protéine de fusion MBP-Alg2  $_{3-des23}$  de 64.2kDa est purifiée sur une colonne d'amylose (Figure 91 B). Le profil de filtration sur gel montre

deux pics à 12ml et 16ml attribués, dans un premier temps, respectivement au dimère et au monomère de la protéine (Figure 91 C).

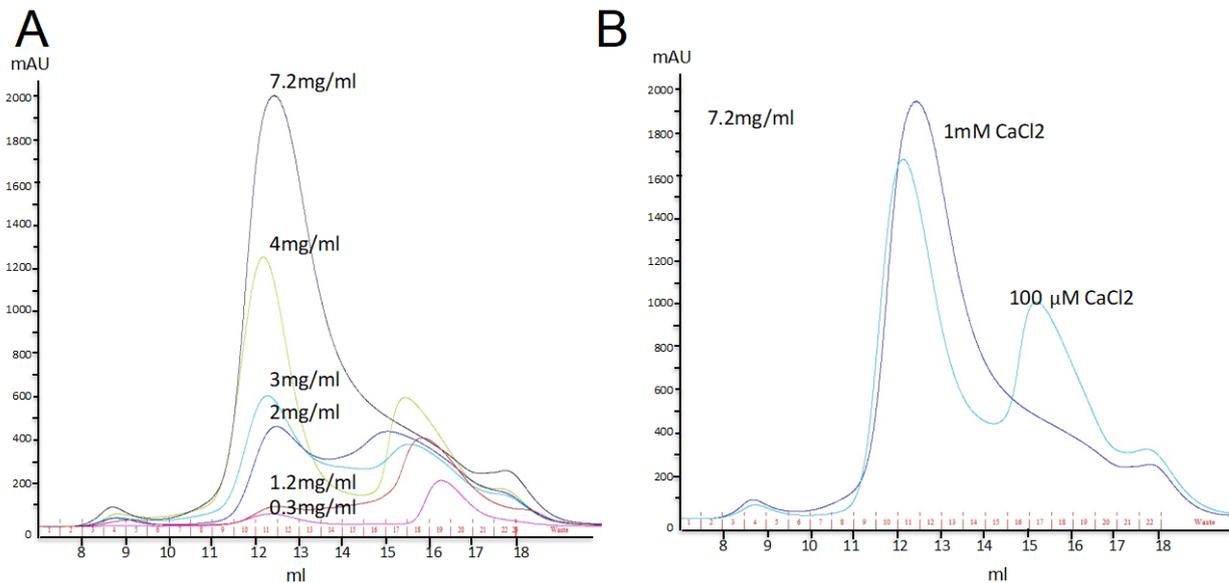


**Figure 91 : Purification de la protéine Alg2<sub>3des23</sub>**

**A.** Représentation schématique de la construction MBP-Alg2<sub>3des23</sub> **B.** Purification de la protéine Alg2<sub>3des23</sub> sur colonne d'amylose L : Échantillon chargé ; FT : Non retenu ; E ; Éluion **C.** Profil de filtration sur gel S200 increase de la protéine Alg2<sub>3des23</sub>.

La protéine Alg-2 a besoin de calcium afin de dimériser (Suzuki et al., 2009). Au cours des purifications successives, j'ai pu observer que l'état d'oligomérisation de la protéine Alg-2 était à la fois dépendant de sa concentration et de la concentration en calcium du tampon dans lequel elle est purifiée (Figure 92). En effet, j'ai pu observer que les différentes concentrations de la protéine ne présentaient pas des profils d'éluion similaires sur la colonne de filtration sur gel. En dessous de 7mg/ml le profil d'éluion présente deux pics à 12ml et 16ml de rétention. Alors qu'au-dessus de 7mg/ml, le profil d'éluion ne présente plus que le seul pic à 12ml, suggérant que l'oligomérisation de Alg-2 est concentration dépendante. J'ai pu observer de la même manière, des différences de profils d'éluion lors de l'augmentation de la concentration en calcium du tampon de

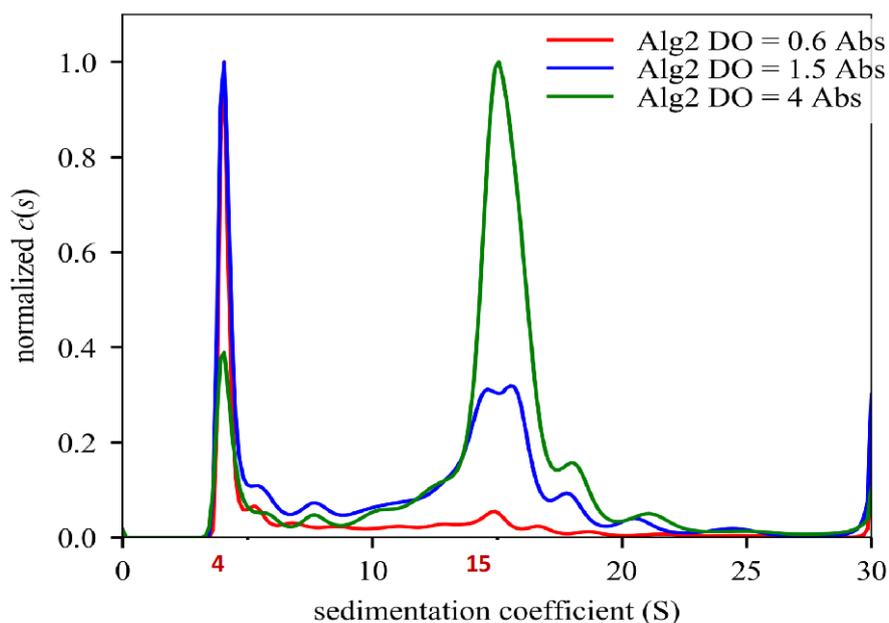
chromatographie. Le profil d'élution de la protéine Alg-2 en présence de 1mM Ca<sup>2+</sup> montre un seul pic à 12ml. Alors que pour la même concentration en Alg-2, le profil d'élution en présence de 100µM Ca<sup>2+</sup> montre deux pics à 12ml et à 16ml (Figure 92 B).



**Figure 92 : L'oligomérisation de la protéine Alg2<sub>3-des23</sub> est dépendante de sa concentration et de la concentration en calcium**

**A.** Profils de filtration sur gel S200 increase de la protéine Alg2<sub>3des23</sub> en fonction de sa concentration dans un tampon comprenant 100µM de CaCl<sup>2+</sup>. Les concentrations indiquées correspondent à la concentration de l'échantillon injectée sur la colonne **B.** Profils de filtration sur gel S200 increase de la protéine Alg2<sub>3des23</sub> obtenus pour deux concentrations de calcium distinctes (1mM et 100µM)

Au vu de ces données, une analyse par ultracentrifugation analytique a été effectuée. L'ultracentrifugation analytique (AUC) est une technique permettant la caractérisation des processus d'auto et hétéro-association de macromolécules en solution. Il s'agit d'une ultracentrifugeuse équipée d'un système de détection optique. Deux types de mesures complémentaires peuvent être réalisées lors d'une ultracentrifugation analytique : la mesure de la vitesse de sédimentation et l'équilibre de sédimentation. A partir de ces mesures, il est possible de déterminer le coefficient de sédimentation et la masse moléculaire des composés étudiés. Trois concentrations de protéine Alg2<sub>3-des23</sub> ont été analysées 0.3 mg/ml (noté D0=0.6), 0.9 mg/ml (noté D0=1.5) et 2.4 mg/ml (noté D0=4) en présence de 1mM calcium (Figure 93).



**Figure 93 : Étude de l'oligomérisation de la protéine Alg2<sub>3-des23</sub> par ultracentrifugation analytique**  
 Profils des trois concentrations de la protéine Alg2<sub>3des23</sub>.

<b>Coefficient de Sédimentation</b>	<b>4 S</b>	<b>15 S</b>
DO=0.6	60%	13%
DO=1.5	27%	33%
DO=4	9%	60%

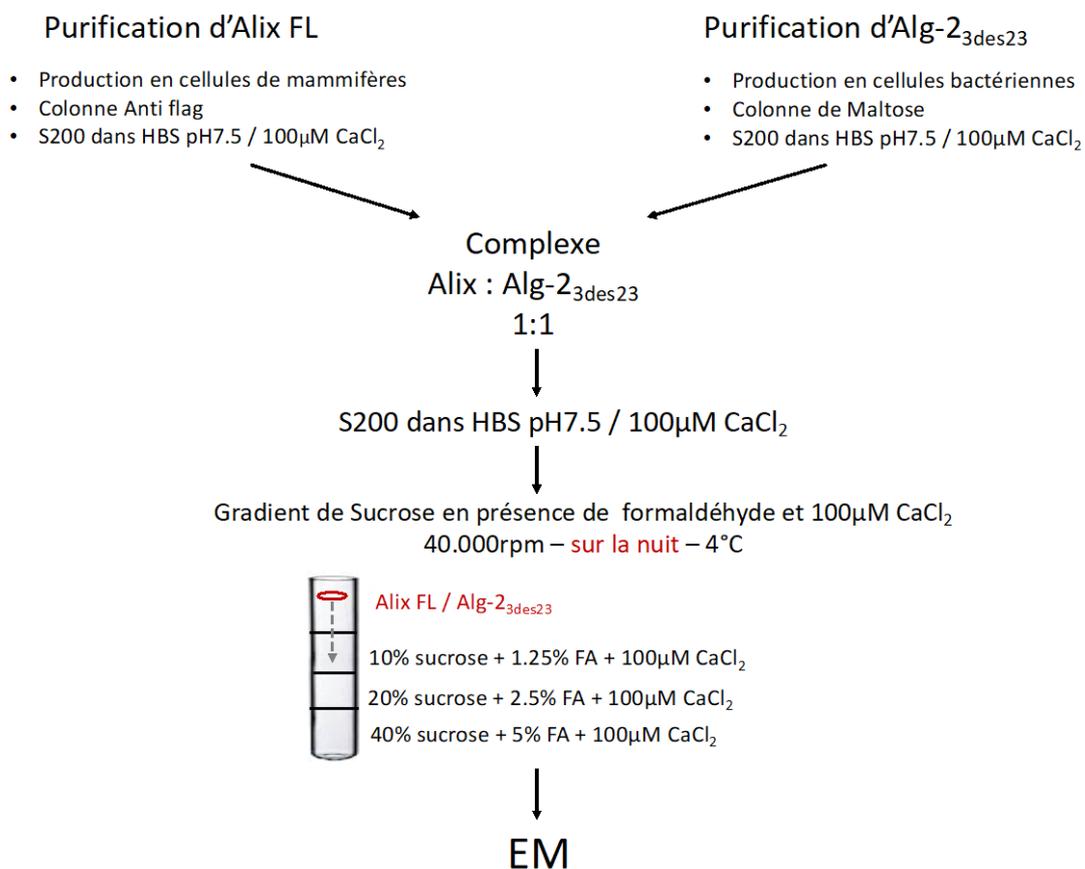
**Tableau 5 : Étude de l'oligomérisation de la protéine Alg2<sub>3-des23</sub> par ultracentrifugation analytique**  
 Les pourcentages notés dans le tableau correspondent au pourcentage de signal total. Le reste du signal concerne des macromolécules non absorbantes, des pics mal définis entre 5 et 13 S et >20S.

Les résultats obtenus ont été synthétisés dans un tableau (Tableau5). A une concentration 0.3 mg/ml (DO=0.6), l'espèce majoritaire dans l'échantillon est l'espèce 4S (60%). A l'inverse, pour une concentration de 2.4mg/ml (DO 4), l'espèce 4S est minoritaire et 60% du signal correspond à l'espèce 15S. En conclusion, La proportion du pic 4S diminue et celle du pic 15S augmente lorsque la concentration en Alg2<sub>3-des23</sub> augmente. Ceci indique qu'il existe un équilibre d'association entre les deux espèces dépendant de la concentration en Alg2<sub>3-des23</sub>. Sachant que la masse moléculaire du monomère de la protéine de fusion MBP- Alg2<sub>3-des23</sub> est de 64.2kDa, il a été défini que le pic 4S correspond à un dimère globulaire. Tandis que le pic asymétrique à 15S correspond soit à un 10-mère globulaire très compact soit à un 12-mère globulaire compact (Figure 93). Contre toute attente, il apparait donc que l'espèce que l'on pensait être monomérique

(volume d'élution = 16ml) correspond en fait au dimère de Alg2 et que l'espèce que l'on pensait dimérique correspond à un multimère (volume d'élution = 12ml). Pour la suite des expérimentations, il a été nécessaire de ne pas concentrer la protéine Alg2<sub>3-des23</sub> au-delà de 4mg/ml et de ne pas utiliser des concentrations de calcium supérieure à 100µM.

## 2. Formation du complexe Alix FL/Alg-2<sub>3-des23</sub>

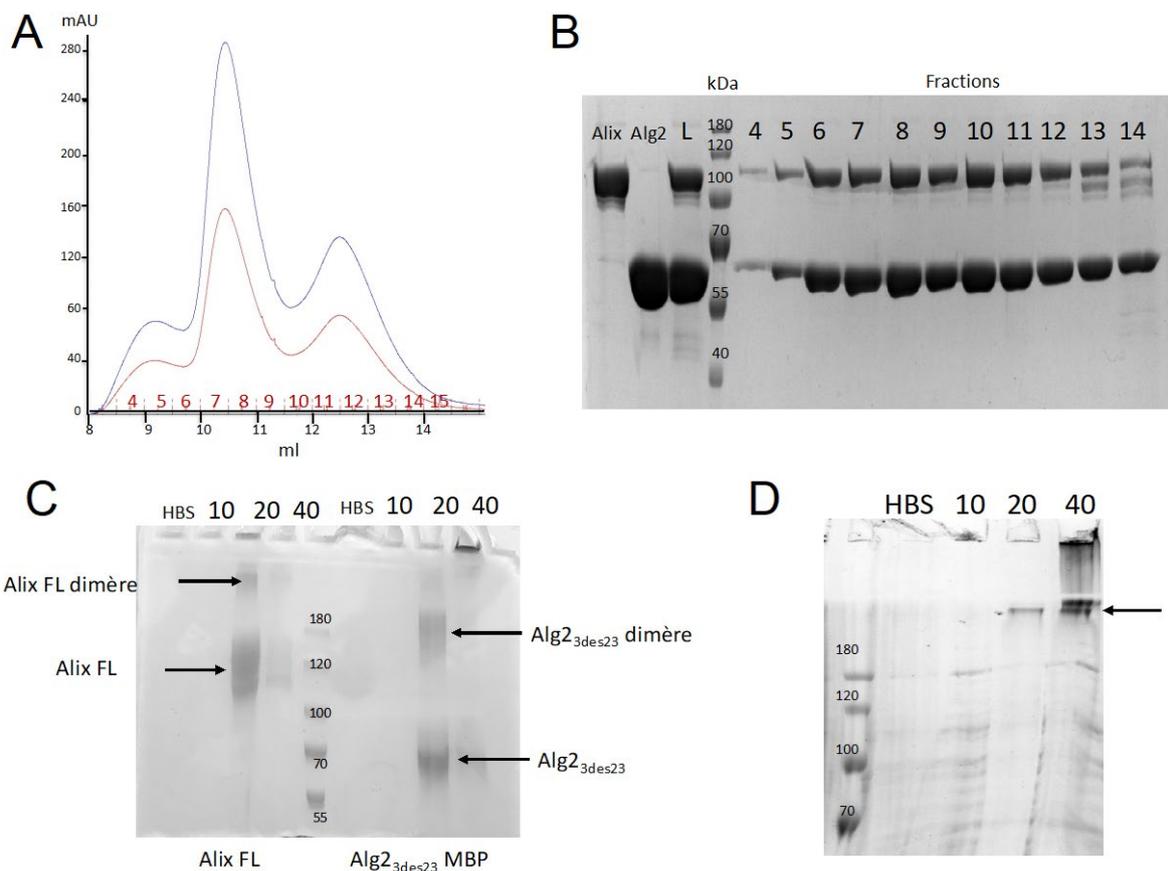
Après plusieurs essais, un protocole de purification a été établi afin d'obtenir un complexe Alix FL/Alg-2<sub>3-des23</sub> homogène et stable (Figure 94).

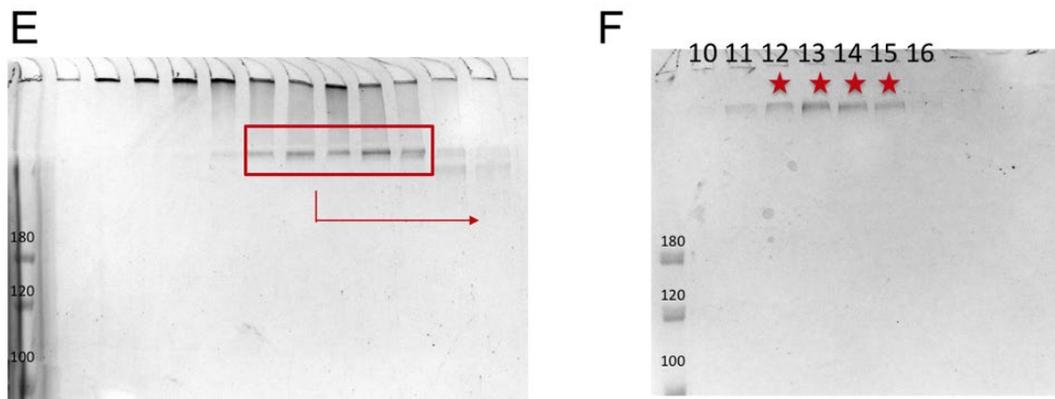


**Figure 94 : Protocole de production et de purification du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub>**

En effet, il est apparu dès les premiers essais, que le complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> semble complètement se dissocier après dilution. Un protocole de purification et d'obtention du complexe a été déterminé (Figure 94). Les protéines sont purifiées séparément (2<sup>eme</sup> partie I.1.a-b). Après formation du complexe Alix /Alg-2<sub>3-des23</sub> dans un rapport 1:1, sur la nuit à 4°C, il est purifié sur filtration sur gel en présence de 100µM de CaCl<sub>2</sub> (Figure 95 A). Le profil de filtration sur gel montre trois pics distincts. La totalité des

fractions des pics de filtration sur gel est déposée sur gel d'acrylamide et montre qu'il s'agit du complexe dans les trois pics (Figure 95 B). Il est décidé de ne garder que les fractions 7-8-9. Elles sont rassemblées et un gradient est réalisé en présence de formaldéhyde afin de réaliser un pontage chimique et d'obtenir un complexe stable (Figure 95 D). Ce même gradient a été réalisé en parallèle sur les protéines purifiées seules (Figure 95 C). On observe que la protéine Alix FL seule se retrouve dans les fractions 20 et 40 du gradient de saccharose. La protéine Alg-2 seule se retrouve essentiellement dans la fraction 20 du gradient. Le complexe après gradient se retrouve essentiellement dans la fraction 40 et apparaît en une bande de très haut poids moléculaire (>180kDa) (Figure 95 D - flèche noire - ligne 40). Enfin, le complexe cross linké est purifié sur deux filtrations sur gel successives. Après la première filtration sur gel, l'échantillon présente encore des agrégats dans les puits qui seront nuisibles à la visualisation en microscopie électronique (Figure 95 E). Il est décidé de reconcentrer les fractions (Figure 95 E carré rouge) et de faire une deuxième filtration sur gel. Les fractions de la deuxième filtration sur gel notées d'une étoile rouge sont visualisées en coloration négative en microscopie électronique (Figure 95 F).



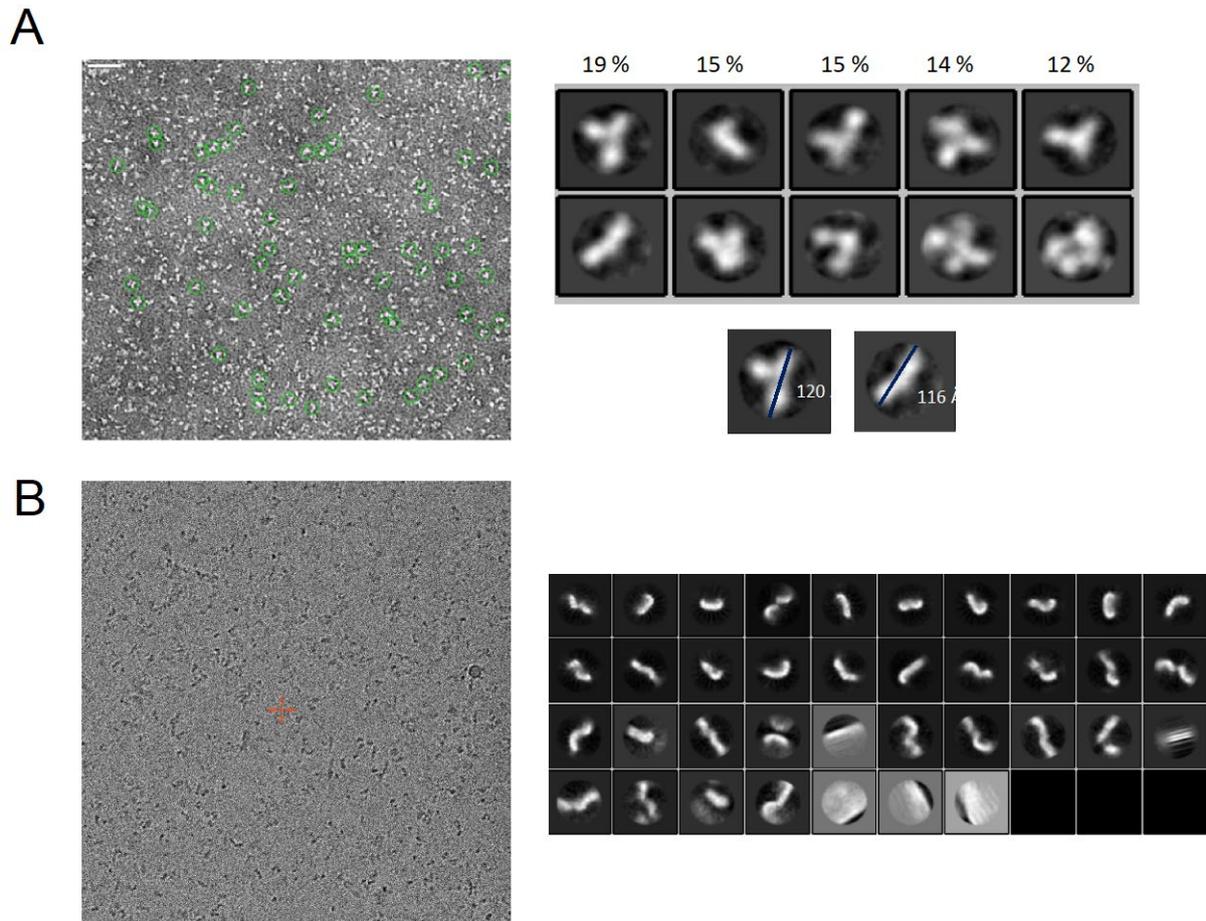


**Figure 95 : Purification du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub>**

**A.** Profil de filtration sur gel S200 du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub>. **B.** Analyse des fractions de la filtration sur gel, sur gel d'acrylamide SDS 15% coloré au bleu de Coomassie L : Complexe injecté sur la colonne de filtration sur gel. 4-14 : Fractions de la filtration sur gel S200. **C.** Analyse du gradient de sucrose des protéines Alix FL et Alg-2<sub>3-des23</sub> seules sur gel d'acrylamide 8%. **D.** Analyse du Gradient de sucrose du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> sur gel d'acrylamide 8%. **E.** Analyse des fractions de la 1<sup>ère</sup> filtration sur gel S200 du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> sur gel d'acrylamide 8% coloré au bleu de Coomassie. Les 5 fractions correspondant au complexe (notées par un carré rouge) sont reconcentrées et déposées sur une 2<sup>ème</sup> filtration sur gel. **F.** Analyse des fractions de la 2<sup>ème</sup> filtration sur gel, sur gel d'acrylamide 8% coloré au bleu de Coomassie. Les échantillons notés d'une étoile rouge sont analysés en microscopie électronique.

### 3. Analyse en microscopie électronique du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub>

Les images obtenues en coloration négative (Figure 96 A panneau de gauche) ont montré un échantillon plutôt prometteur. Cependant, le picking automatique a échoué. Guidenn Sulbaran qui a réalisé les grilles a dû entreprendre un picking manuel des structures. Les structures ont été divisées en cinq classes différentes, sans aucune classe majoritaire (Figure 96 A panneau de droite). D'autres purifications ont été réalisées afin de diminuer l'hétérogénéité de l'échantillon. Un échantillon a finalement montré une homogénéité relative afin de réaliser des grilles de cryo-microscopie. Gregory Effantin du groupe Microscopie Électronique et Méthodes (MEM) de l'IBS a analysé les grilles de cryo-microscopie et après un picking manuel des structures, a initié le travail de classification (Figure 96 B).



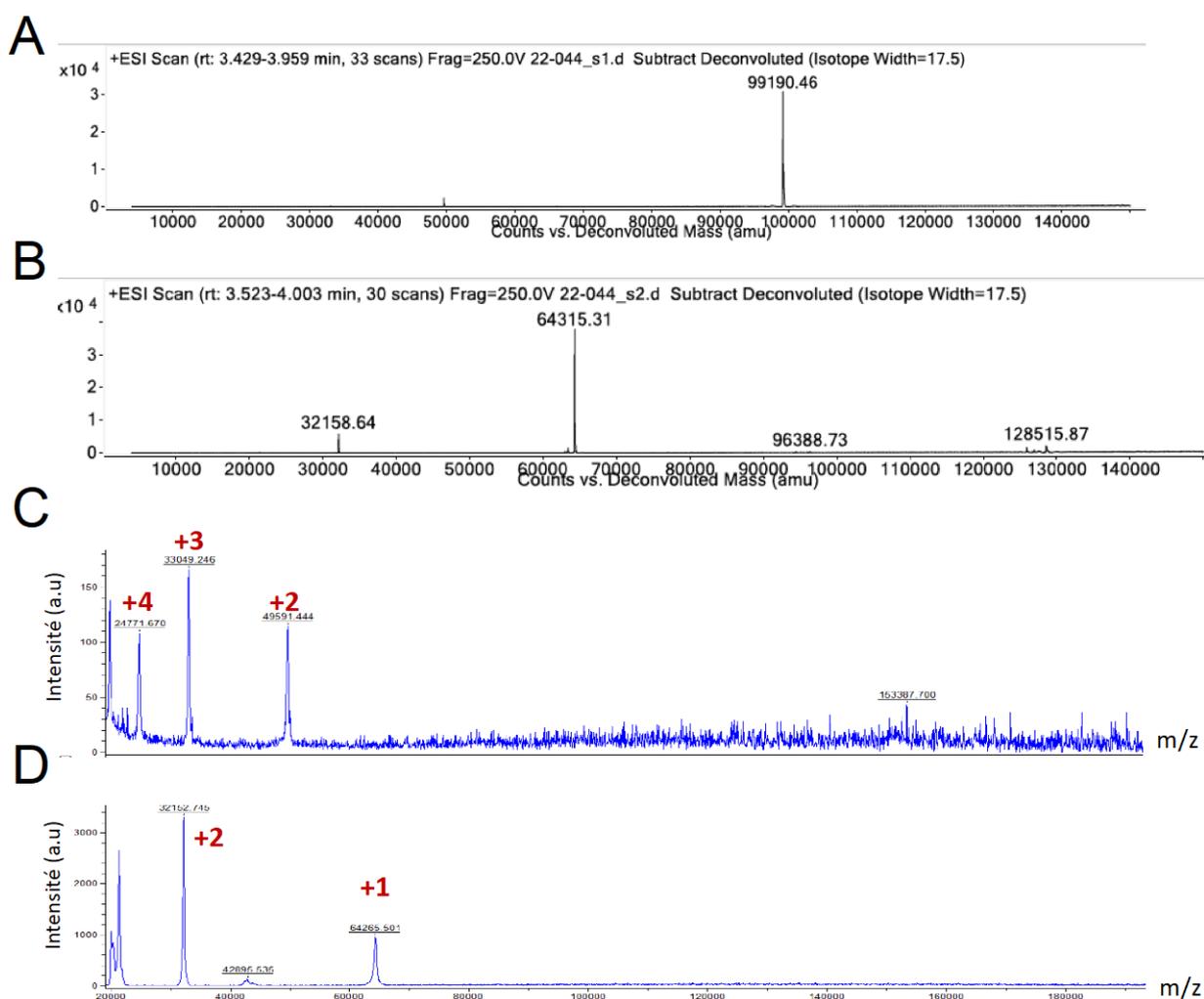
**Figure 96 : Coloration négative en microscopie électronique du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub>**

**A.** Coloration négative en microscopie électronique du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> et classification des particules obtenues. **B.** Image de cryo-microscopie du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> et classification des particules obtenues.

Malgré de gros effort de purification, l'échantillon présente toujours une forte hétérogénéité. Aux vues de la pureté de l'échantillon sur gel de Coomassie, il est très probable que cette hétérogénéité vienne de la flexibilité intrinsèque de la molécule d'Alix. Cette flexibilité rend l'étude en microscopie très complexe. Nous pensons que l'interaction avec son partenaire Alg-2 pourrait permettre de stabiliser un tant soit peu la structure mais il apparait qu'il n'en est rien.

#### 4. Caractérisation du complexe Alix FL / Alg-2<sub>3-des23</sub> en spectrométrie de masse

Si la résolution de structure du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> par microscopie électronique semble être compromise, la question de savoir si la protéine Alg-2 est l'initiateur de la dimérisation d'Alix est toujours en suspens. Une analyse par spectrométrie de masse sur le complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> cross-linké a été envisagée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe. Dans un premier temps, la protéine Alix FL monomérique et la protéine Alg-2 dimérique ont été analysées séparément en spectrométrie de masse afin de vérifier leurs masses respectives (Figure 97).



**Figure 97 : Profils de spectrométrie de masse des protéines Alix FL et Alg-2<sub>3-des23</sub>**

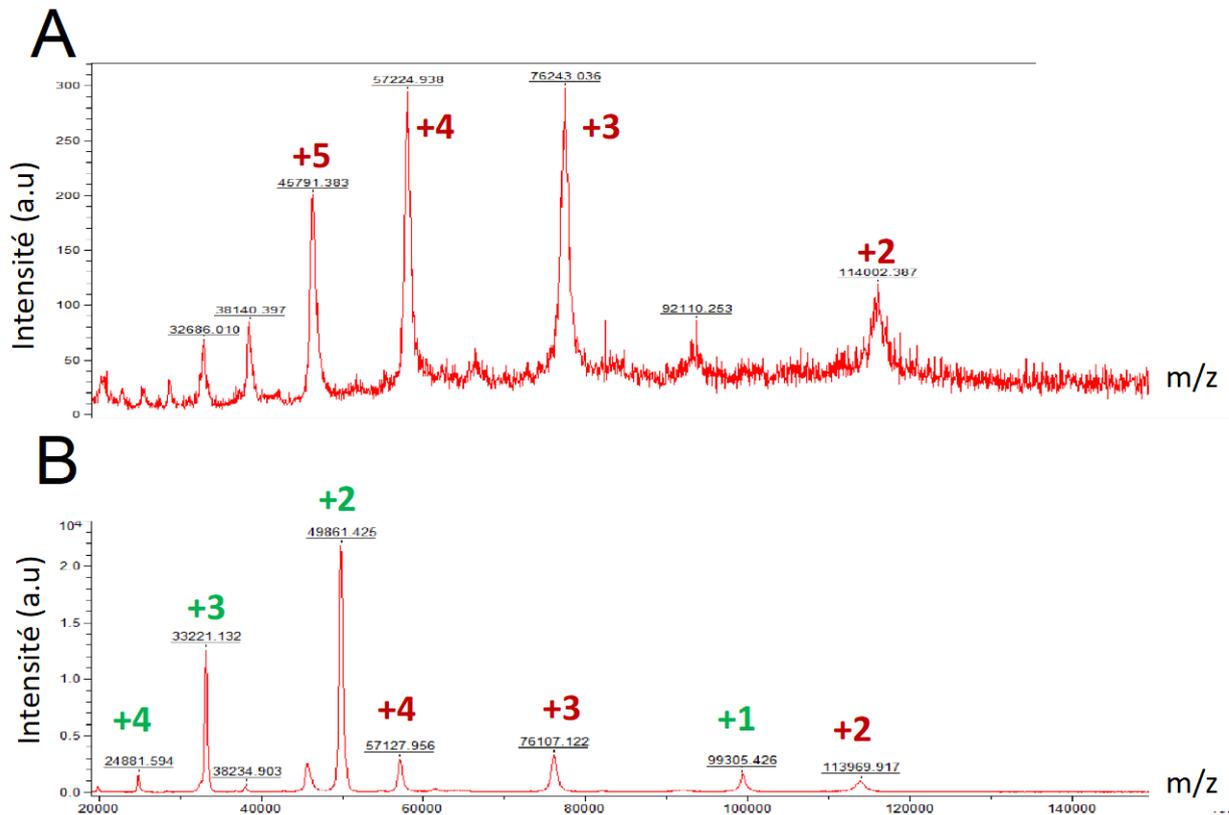
**A.** Profil déconvolué de spectrométrie de masse ESI de la protéine Alix FL **B.** Profil déconvolué de spectrométrie de masse ESI de la protéine Alg-2<sub>3-des23</sub> **C.** Profil de spectrométrie de masse MALDI de la protéine Alix FL **D.** Profil de spectrométrie de masse MALDI de la protéine Alg-2<sub>3-des23</sub>

La masse moléculaire théorique de la protéine Alix entière avec son tag (Flag-Alix FL) est de 99 kDa. Le profil spectrométrie de masse par ESI montre un pic à 99190Da en accord avec la masse théorique de la protéine (Figure 97 A). Le profil de MALDI montre trois espèces qui, si l'on considère  $m/z= 49591$  comme une espèce doublement chargée (+2),  $m/z= 33049$  (+3)  $m/z= 24771$  (+4), est aussi en accord avec la masse théorique de la protéine (Figure 97 C). La masse moléculaire théorique de la protéine Alg-2<sub>3-des23</sub> avec son tag (HIS MBP-TEV Alg2<sub>3-des23</sub>) est de 64.2Kda. Le profil de spectrométrie de masse par ESI montre un pic à 64315Da en accord avec la masse théorique de la protéine (Figure 97 B). Le profil de MALDI montre deux espèces qui, si l'on considère  $m/z= 32152$  comme 2+, correspond à la masse théorique de la protéine (Figure 97 D).

De la même manière que pour le complexe Alix ΔPRD dimérique / Nanocorps 96 cross linké, l'interprétation du spectre obtenu sur les échantillons cross linkés est très compliquée car il est impossible de savoir combien de masses supplémentaires l'agent pontant rajoute dans l'analyse. Afin d'interpréter au mieux le spectre obtenu pour le complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> cross linké, j'ai reporté les différents poids moléculaires des différents composants dans un tableau (Figure 98 et Tableau 6).

	MW	m/z=2	m/z=3	m/z=4
<b>Alix FL</b>	<b>99016</b>	<b>49508</b>	<b>33005</b>	<b>24754</b>
Alg-2	64257	32129	21419	16064
Alix FL dimérique	198032	99016	66011	49508
Alg-2 dimérique	128514	64257	42838	32129
<b>Alix FL monomérique / Alg-2 dimérique</b>	<b>227530</b>	<b>113765</b>	<b>75843</b>	<b>56883</b>
Alix FL dimérique / Alg-2 dimérique	326546	163273	108849	81637

**Tableau 6 : Comparaison des masses moléculaires théoriques des protéines Alix FL, Alg-2<sub>3-des23</sub> et du complexe Alix FL/Alg-2<sub>3-des23</sub> et des masses obtenues en spectrométrie de masse**



**Figure 98 : Profils de spectrométrie de masse du complexe Alix FL/Alg-2<sub>3-des23</sub>**

**A.** Profil de spectrométrie de masse MALDI du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> Fraction 12 **B.** Profil de spectrométrie de masse MALDI du complexe Alix FL/ Alg-2<sub>3-des23</sub> Fraction 15

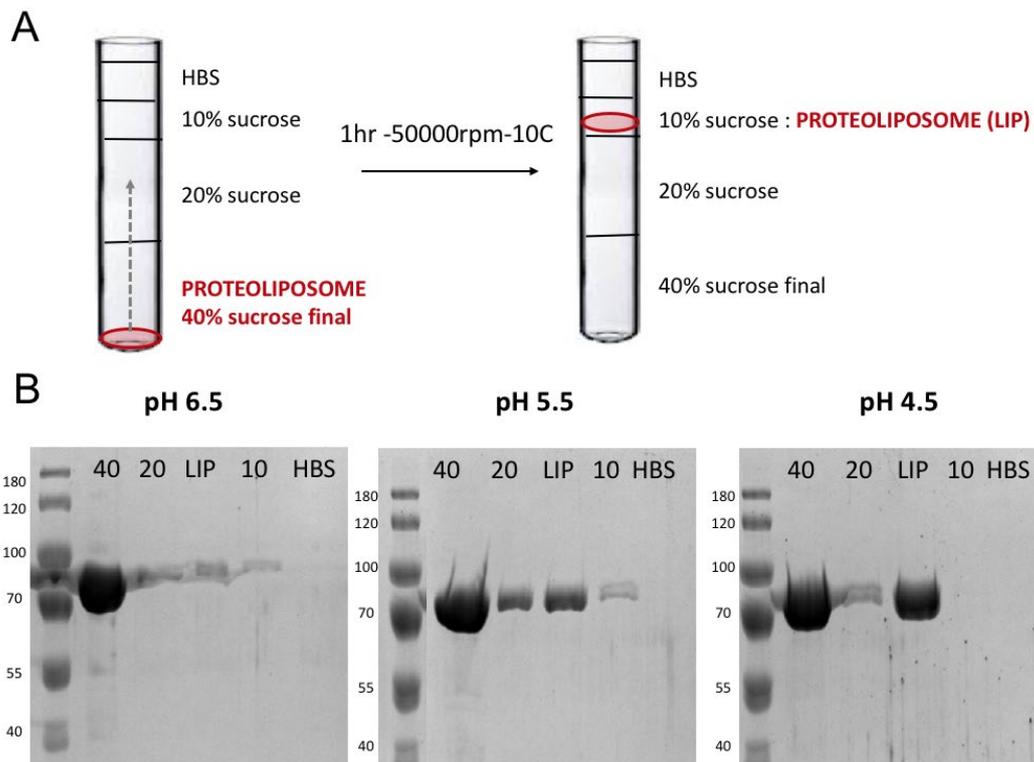
J'ai donné à analyser en spectrométrie de masse dénaturante deux fractions provenant de la filtration sur gel (fraction 12 et fraction 15 - Figure 95 F). On observe que les profils de spectrométrie de masse des deux fractions, pourtant similaires sur gel de Coomassie, ne sont pas identiques. Prenons tout d'abord, le profil de la fraction 12, si l'on considère  $m/z = 114002$  comme +2,  $m/z = 76243$  comme +3 et  $m/z = 57224$  comme +4, le spectre serait en accord avec la masse théorique d'un complexe Alix FL monomérique /Alg-2 dimérique (Figure 98 A). Cela montre que l'interaction de Alg-2 avec la protéine Alix ne nécessite pas la dimérisation d'Alix et suggère qu'elle n'est pas suffisante pour l'initier. Lorsque l'on analyse le spectre de la fraction 15, on observe que trois pics sont similaires au spectre du complexe Alix FL monomérique /Alg-2 dimérique (Figure 98 B noté en rouge) et que 4 autres pics sont nouveaux. Si l'on considère  $m/z = 99305$  comme +1,  $m/z = 49861$  comme +2 et  $m/z = 33221$  comme +3, le spectre serait en accord avec la masse théorique de la protéine Alix FL monomérique seule (Figure 98 B noté en vert).

Il semble donc que la fraction de filtration sur gel F15 contiennent donc un mélange de complexe Alix FL monomérique /Alg-2 dimérique et de protéine Alix FL monomérique seule. Sachant que l'agent pontant amène de forts biais dans l'analyse, il est difficile pour le moment de conclure de façon définitive quant à la stœchiométrie du complexe. Une spectrométrie de masse native est envisagée pour nous permettre de statuer sur cette stœchiométrie.

### ***3<sup>eme</sup> partie : Étude de l'interaction entre la protéine Alix et les membranes biologiques***

#### **I. Rôle du pH dans l'interaction avec les liposomes**

Dans cette partie, j'ai entrepris d'étudier la capacité de la protéine Alix à se lier aux membranes. Le domaine de la protéine Alix mis en évidence pour interagir avec les membranes est son domaine Bro-1 (Bissig et al., 2013). J'ai donc utilisé pour ces analyses, la construction de la protéine, décrite en début de manuscrit : Alix  $\Delta$ PRD, contenant le domaine Bro-1 et le domaine V. Afin de tester si la protéine Alix peut interagir avec les membranes *in vitro*, des liposomes composés de 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) et de Phosphoinositides (PI) dans un ratio DOPC:DOPE:DOPS:PI (4:2:3:1, p/p) ont été utilisés. Alix  $\Delta$ PRD monomérique a été incubé avec des liposomes et l'association protéine-lipide a été analysée par des essais de flottaison par gradient discontinu de saccharose (Figure 99 A) : les liposomes sont dilués dans 80% de saccharose afin d'obtenir un premier coussin à 40% saccharose qui est recouvert de deux coussins de 20% et 10 % de saccharose et de tampon HBS. Les différentes fractions obtenues après une heure de centrifugation à 50000rpm sont analysées sur gel de Coomassie. Après centrifugation, les liposomes flottent jusqu'à l'interface 20:10 (notée LIP sur les gels) entraînant avec eux les protéines associées (Figure 99 A). Alix  $\Delta$ PRD monomérique montre une efficacité de liaison modérée à pH 6.5 ; une toute petite fraction de la protéine interagit avec les liposomes (LIP) alors que la plupart est restée non liée dans la fraction inférieure (Figure 99 - 40% saccharose). La protéine se lie de manière plus importante aux liposomes à pH 5,5 et encore plus à pH 4,5 (Figure 99 - LIP).



**Figure 99 : Effet du pH sur l'interaction de la protéine Alix ΔPRD avec les liposomes**

**A.** Gradient de saccharose

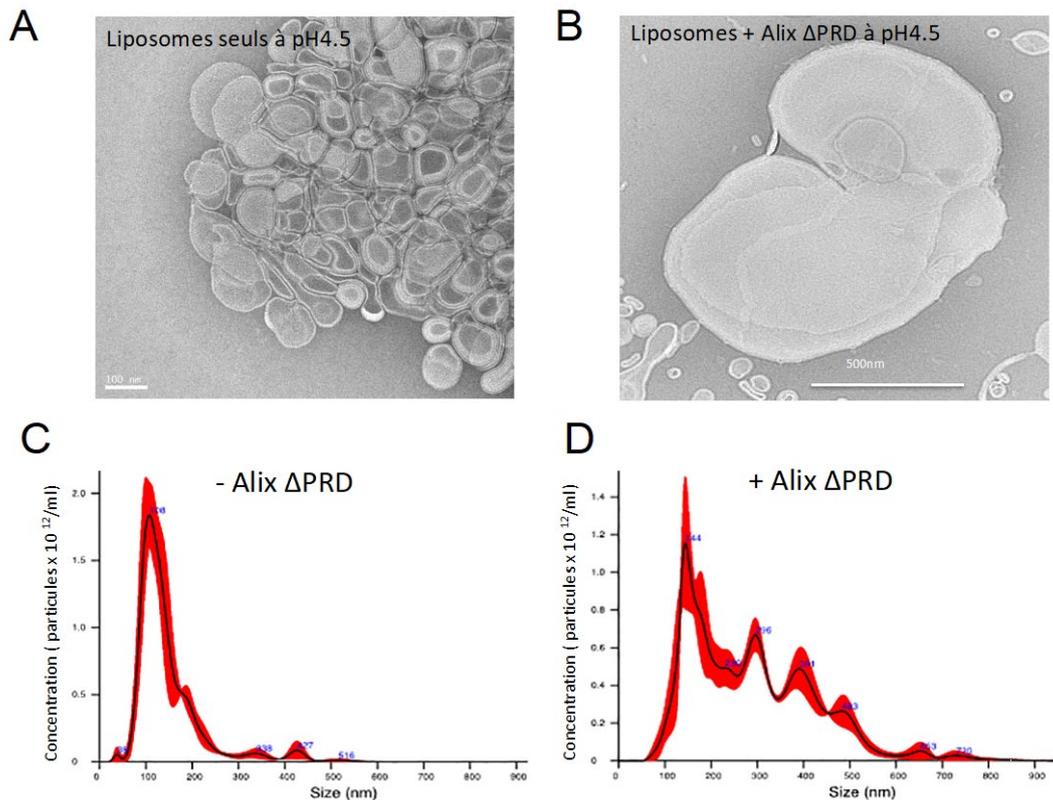
**B.** Centrifugation en gradient de saccharose des liposomes incubés sur la nuit avec Alix ΔPRD à différents pH. Les échantillons de 5 fractions du gradient ont été analysés par SDS- PAGE et les bandes correspondant à la protéine Alix ΔPRD (~ 79KDa) sont détectées par coloration au bleu de Coomassie. 40 : fraction 40% saccharose ; 20 : fraction 20% saccharose ; 10 : fraction 10% saccharose ; LIP : fraction contenant les liposomes.

## II. Alix déforme les membranes lipidiques et provoque la fusion des liposomes

### 1. Nanosight et microscopie électronique

L'analyse de la fraction des liposomes seuls incubés à pH4.5, par microscopie électronique à coloration négative a montré des vésicules rondes d'un diamètre moyen de 100 nm (Figure 100 A). Après une incubation sur la nuit à température ambiante avec 80μM d'Alix ΔPRD d'autres images en microscopie électronique à coloration négative ont été réalisées. On a pu observer que certains des liposomes imagés présentent un diamètre 2 à 5 fois plus important, entre 200 et 500nm (Figure 100 B). Ceci correspondrait à une fusion entre plusieurs liposomes. Les résultats de fusion des liposomes ont été confirmés par l'analyse de suivi de nanoparticules par le NanoSight (NTA)(Figure 100 C et D). Cette

technologie utilise les propriétés de la diffusion de la lumière et du mouvement brownien afin d'obtenir la distribution de taille et la mesure de la concentration des particules en suspension liquide. Alors que l'on observe un seul pic de particules à 100nm pour les liposomes seuls (Figure 100 C), on observe plusieurs pics de particules supplémentaires s'étalant de 200nm à 600nm lorsque les liposomes ont été incubés avec la protéine Alix  $\Delta$ PRD (Figure 100 D).



**Figure 100 : Effet de l'interaction de la protéine Alix  $\Delta$ PRD sur la taille des liposomes à pH 4,5**

Panneau Haut : Analyse en coloration négative en microscopie électronique

**A.** liposomes seuls à pH4.5 (contrôle) **B.** protéoliposomes à pH4.5

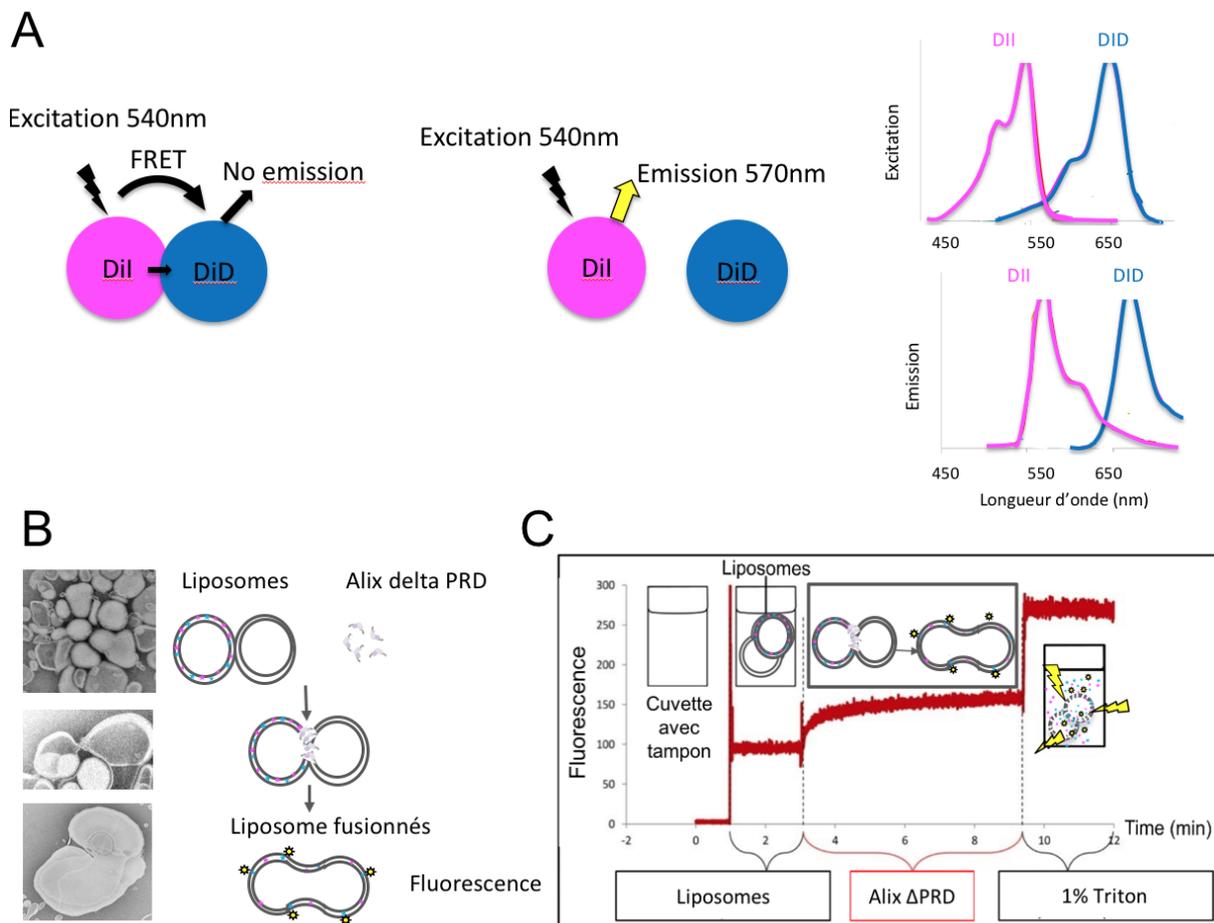
Panneau Bas : Analyse NTA

**C.** liposomes seuls à pH4.5 (contrôle) **D.** protéoliposomes à pH4.5

## 2. Tests de Fluorescence

Un test de fluorescence utilisant deux fluorophores DiI et DiD a été mis en place pour suivre la fusion des liposomes. Ces deux colorants carbocyanines lipophiles ont été choisis pour leur capacité à marquer les membranes et leur capacité au transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET). En effet, lorsque les deux fluorophores sont excités à 540 nm à proximité l'un de l'autre, la lumière émise par le donneur DiI est transférée et

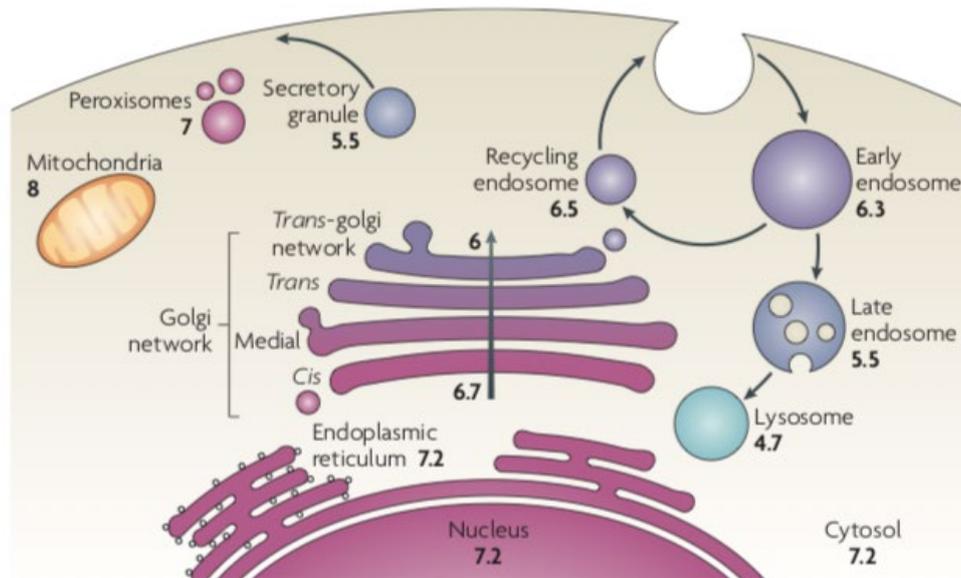
absorbée par l'accepteur DiD, résultant en une diminution de la fluorescence émise du donneur (phénomène de quenching) (Figure 101 A). Lorsque ces deux fluorophores sont dilués lors d'une fusion membranaire, par exemple, le donneur et l'accepteur se dissocient et l'émission de fluorescence du DiI augmente. Des liposomes marqués ont été préparés en utilisant les lipides DOPE:DOPS:DOPC:PI (2:3:4:1) supplémentés des deux marqueurs fluorescents DiI et DiD (2% mol/mol). Une mesure au Nanosight (NTA) de chacun des types de liposomes, marqués et non marqués, a été réalisée pour permettre d'en déterminer la concentration (particules /ml). Un mélange de liposomes  $DiD/DiI$  et de liposomes non marqués est préparé pour atteindre un ratio final de 1:1. L'intensité de fluorescence à 570 nm est mesurée avant et après ajout de la protéine Alix  $\Delta PRD$  est (Figure 101 C).



**Figure 101 : Principe du test de fluorescence**

**(A)** Principe du test de fluorescence : Si les deux fluorophores sont très proches : lorsque l'on excite à 540nm le DiI, la fluorescence émise est absorbée par la molécule DiD (on parle de FRET) ; Si les deux fluorophores sont éloignés : lorsque l'on excite le DiI, la fluorescence à 570nm est émise **(B)** Schématisation du test de fluorescence : Deux types de liposomes sont mélangés (marqués et non marqués), en présence de la protéine Alix, les liposomes fusionnent. Les fluorophores sont donc dilués, il y aura donc une émission de fluorescence **(C)** Profil de fluorescence théorique : La fluorescence est suivie au cours du temps à 570nm. Lorsque du triton est ajouté, tous les liposomes sont solubilisés, la fluorescence est donc maximale.

Les cellules eucaryotes sont très compartimentées. Cette compartimentation est directement liée au besoin de fournir des conditions environnementales distinctes aux différentes voies métaboliques. La fonction de chacune des organelles dépend de l'établissement et du maintien de pH distincts.

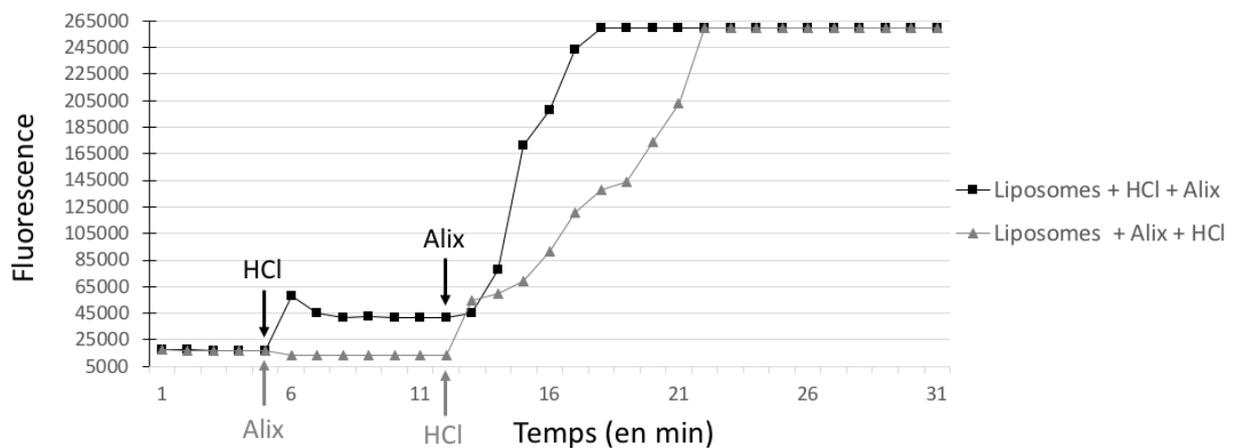


**Figure 102 : pH des différents compartiments subcellulaires d'une cellule de mammifères.**  
Les valeurs de pH indiquées proviennent de différentes sources. (Casey, Orlovski., 2010 review)

La protéine Alix est une protéine que l'on retrouve dans les exosomes (Théry et al., 2001), vésicules extracellulaires d'origine endosomale, dans le cytosol et associé à la face cytosolique des membranes endosomales (Bissig et al., 2013). La protéine Alix est impliquée dans la fusion des membranes vésicules intraluménales à l'intérieur des endosomes (Baietti et al., 2012b). Même si pour le moment le pH des exosomes est inconnu, nous sommes partis du postulat que la protéine Alix peut être en présence d'un pH relativement acide proche de celui des endosomes tardifs, à savoir un pH entre 4.5 et 5.5 (Figure 102).

Un premier test de fusion a été réalisé. Dans ce premier test, j'ai souhaité tester les rôles de la protéine Alix  $\Delta$ PRD et du pH sur le processus de fusion des liposomes. Pour cela, j'ai réalisé deux réactions dans deux puits parallèles. Dans le premier puit, la protéine Alix  $\Delta$ PRD est ajoutée après 5 min. En présence de la protéine Alix  $\Delta$ PRD à pH neutre (pH7.5), aucune augmentation de fluorescence n'est observée (Figure 103 courbe grise). A 11 min, l'HCl ajouté dans le puit, provoque une augmentation remarquable de la

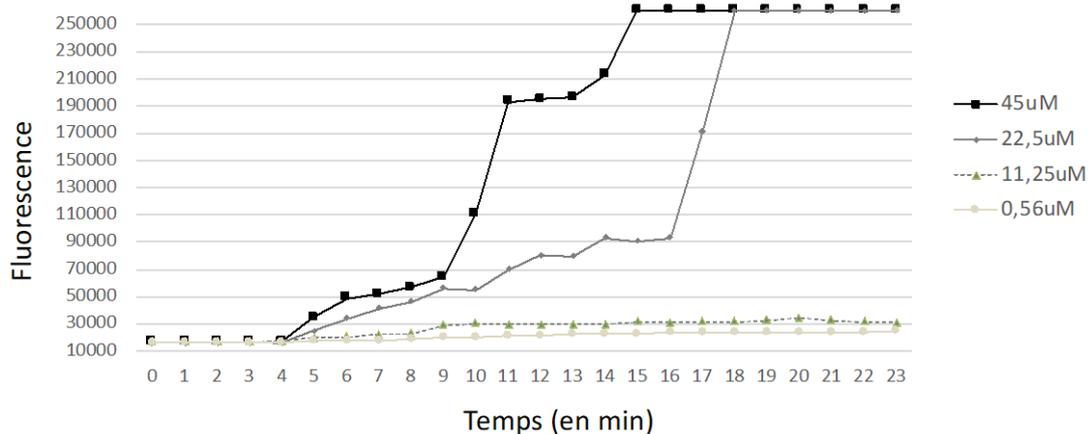
fluorescence indiquant que la protéine Alix  $\Delta$ PRD est capable de générer une fusion lorsque le pH est acidifié. Dans le second puit, j'ai commencé par acidifier le milieu avec 1  $\mu$ l de HCl 1mM. Lorsque le HCl est ajouté une légère augmentation de la fluorescence est observée mais celle-ci reste stable (Figure 99 courbe noire). L'acidification du milieu n'est donc pas, à elle seule, responsable du processus de fusion. A 11min, la protéine Alix  $\Delta$ PRD est ajoutée dans le puit préalablement acidifié. A ce moment-là, on observe une augmentation remarquable de la fluorescence similaire au test décrit précédemment, indiquant que la protéine Alix  $\Delta$ PRD est capable de générer une fusion et que cette fusion est pH dépendante (Figure 103).



**Figure 103 : Test de Fusion**

Les flèches indiquent les temps où ont été ajoutés respectivement la protéine Alix  $\Delta$ PRD ou le HCl.

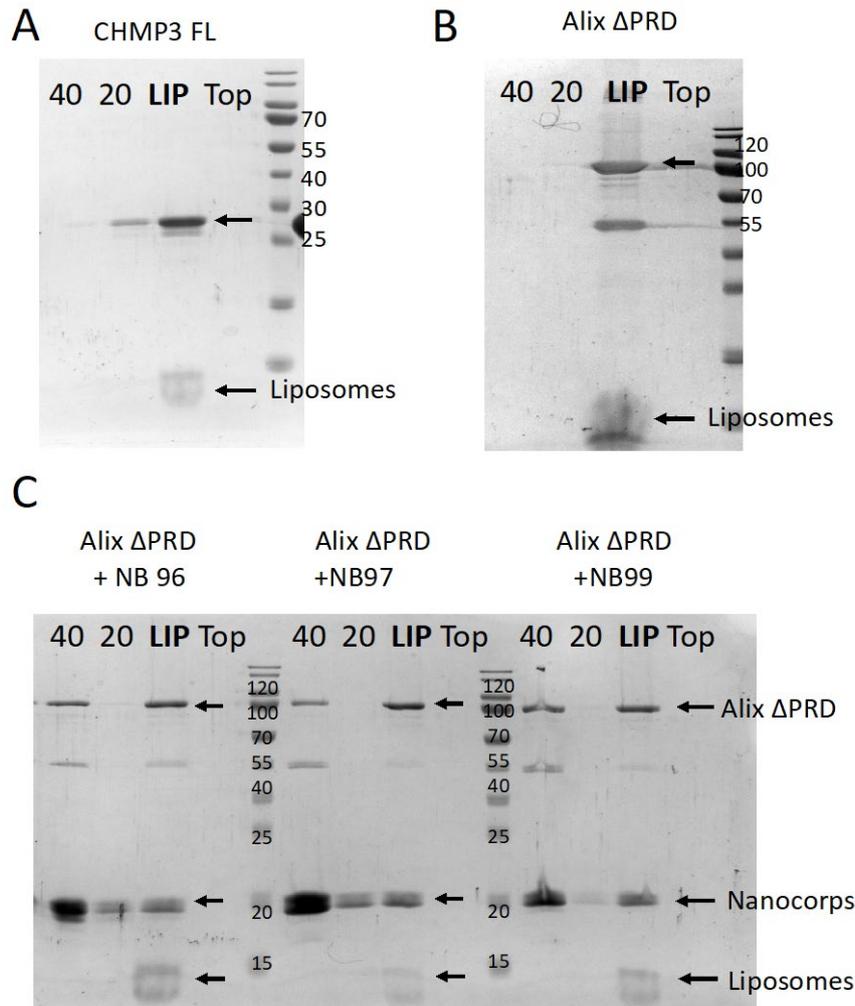
Dans un deuxième temps, un test de titration est réalisé. La fusion des liposomes est donc observée en fonction de la concentration en Alix  $\Delta$ PRD utilisée. La protéine Alix  $\Delta$ PRD est ajoutée après 4 min. Avec une protéine à 22  $\mu$ M, il faut attendre 16min pour obtenir une forte augmentation de la fluorescence, le processus de fusion semble plus lent. Pour les concentrations les plus faibles, aucune fusion n'est observée. Le processus de fusion est donc bien concentration dépendante (Figure 104).



**Figure 104 : Titration de la protéine Alix  $\Delta$ PRD**

La fusion des liposomes est observée pour 4 concentrations différentes d'Alix  $\Delta$ PRD.

Enfin, afin de prouver que la fusion observée est bien due à la protéine Alix, deux tests ont été réalisés. Un test de fusion avec la protéine CHMP3. En effet, il a été montré dans notre laboratoire que la protéine CHMP3 est capable de se lier aux liposomes dans des conditions de pH acide. C'est donc un bon candidat pour savoir si la fusion observée est spécifique ou non de la protéine Alix. Et le deuxième test, en présence de nanocorps spécifiques de la protéine Alix. Pour cela, la protéine Alix  $\Delta$ PRD est incubée 15min à température ambiante avec un excès de nanocorps afin de saturer la protéine. Dans un premier temps, afin de vérifier que les protéines CHMP3FL et les complexes Alix/Nanocorps sont capables d'interagir avec les liposomes, un gradient de saccharose est réalisé (Figure 105).



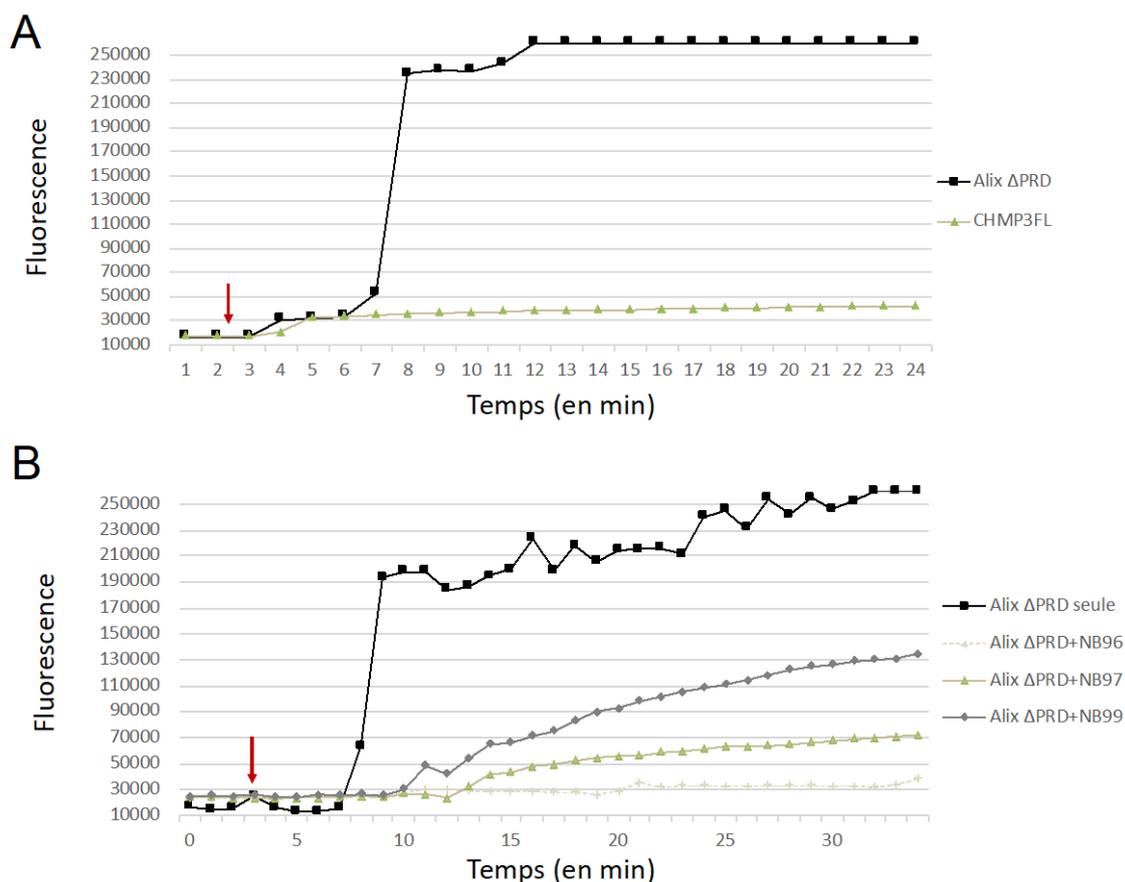
**Figure 105 : Vérification de l'interaction des protéines CHMP3 FL et des complexes Alix /Nanocorps aux liposomes**

Fractions des gradients de saccharose déposées sur gel SDS/15% acrylamide

40 : fraction à 40% saccharose ; 20 : fraction à 20% saccharose ; LIP : LIPOSOMES ; Top : fraction correspondant au HBS. Les flèches noires indiquent les protéines, les liposomes ou les nanocorps.

**A.** Gradient de saccharose pour la protéine CHMP3 FL **B.** Gradient de saccharose pour la protéine Alix ΔPRD **C.** Gradient de saccharose pour les complexes Alix ΔPRD/nanocorps.

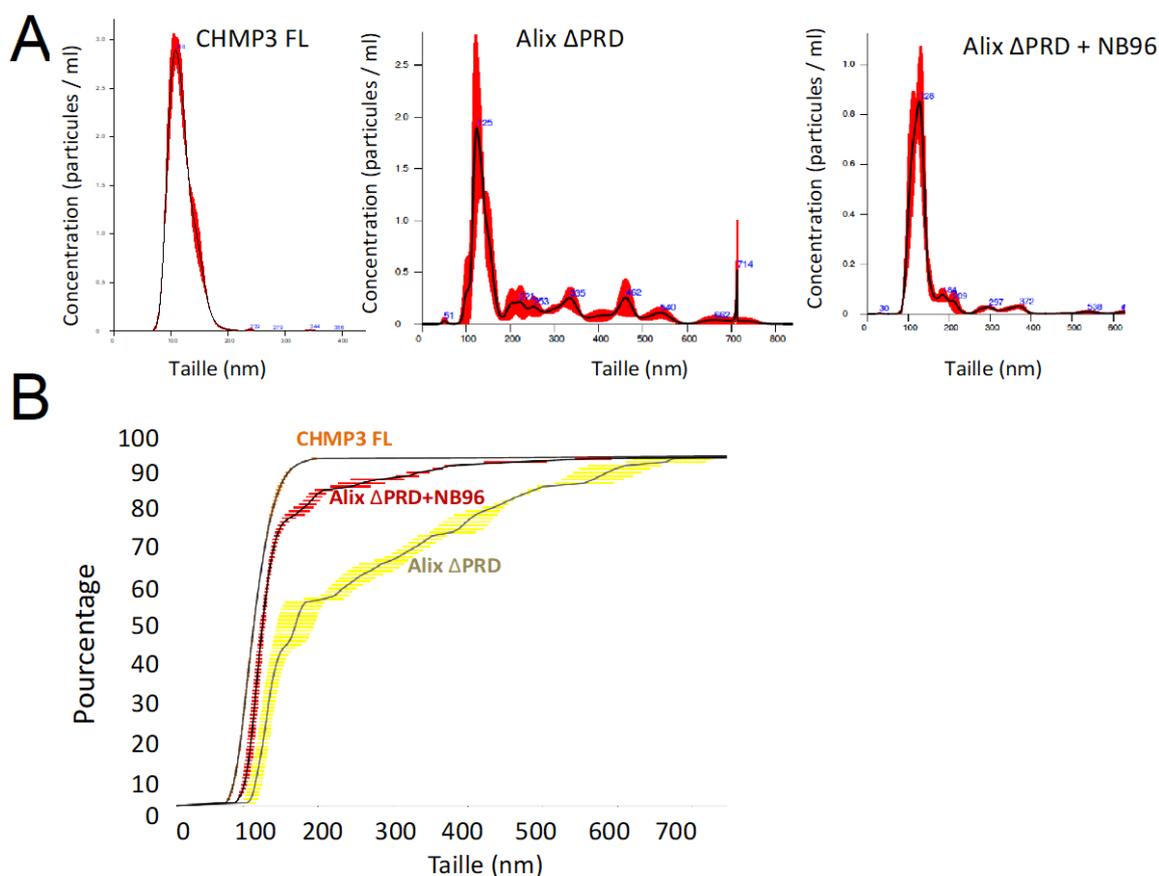
La protéine CHMP3FL se retrouve dans la fraction LIP du gradient (Figure 105 A ligne LIP), CHMP3FL est donc capable de se lier aux liposomes. En ce qui concerne les complexes avec les nanocorps, une partie de la protéine Alix n'est plus capable de se lier aux liposomes comme en atteste la présence de la protéine et des nanocorps dans la fraction 40 (Figure 105 C ligne 40). L'autre partie est capable de se lier aux liposomes (Figure 105 C ligne LIP). Après avoir vérifié la capacité des protéines à se lier aux liposomes, les tests de fluorescence ont été réalisés.



**Figure 106 : Le processus de fusion est Alix dépendante**

Les flèches rouges indiquent les temps où ont été ajoutés respectivement Alix ΔPRD, CHMP3FL ou les complexes Alix ΔPRD /Nanocorps.

Lorsque la protéine CHMP3 entière (CHMP3FL) est ajoutée après 2 min, la fluorescence reste stable tout au long de la réaction, indiquant que la protéine CHMP3FL n'est pas capable d'induire la fusion (Figure 106 A courbe verte). Lorsque les complexes Alix ΔPRD/nanocorps sont ajoutés après 2 min, on observe que la fluorescence reste stable tout au long de la réaction pour le complexe Alix ΔPRD/nanocorps NB96 (Figure 106 B courbe gris clair). Le nanocorps NB96 est donc capable de bloquer le processus de fusion induit par la protéine Alix. Pour les complexes Alix ΔPRD/nanocorps NB99 ou NB97, une augmentation de fluorescence, bien que réduite, par rapport à celle avec la protéine seule est observée (Comparaison Figure 106 B courbe noire versus courbe verte ou gris foncé). Les nanocorps NB99 et NB97 sont donc capables de bloquer en partie le processus de fusion. A la différence du nanocorps NB96, l'affinité d'interaction des deux nanocorps NB99 et NB97 avec la protéine Alix n'a pas été caractérisée. Tous les résultats de fusion des liposomes obtenus par fluorescence ont été confirmés par l'analyse de suivi de nanoparticules par le NanoSight (NTA)(Figure 107).



**Figure 107 : Effet de l'interaction des protéines Alix ΔPRD, CHMP3FL ou des complexes Alix/Nanocorps sur la taille des liposomes à pH 5**

Deux sortes de représentations en A et en B montre les résultats obtenus au nanosight.

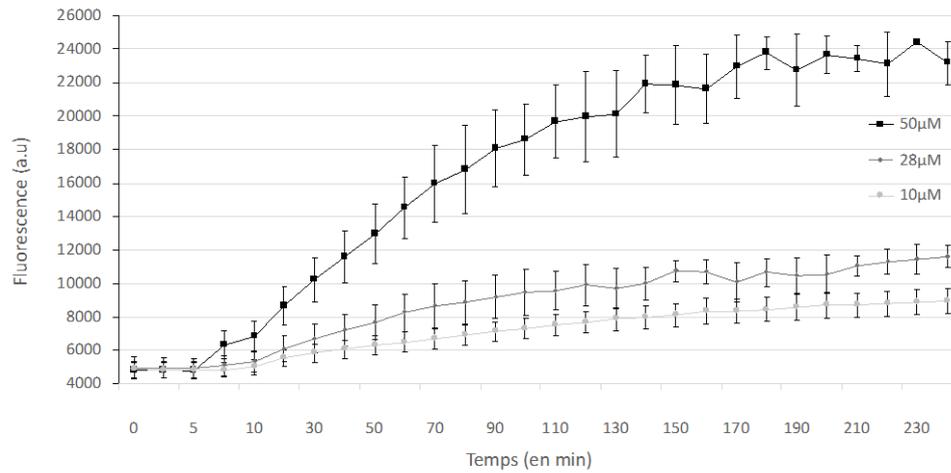
La représentation B indique le nombre de particules (en pourcentage) en fonction de leurs tailles. En présence d'Alix ΔPRD, 40% des particules ont une taille de 100nm et 60% des particules ont une taille supérieure à 100nm. En présence de CHMP3FL, près de 100% des particules ont une taille de 100nm. En présence d'Alix ΔPRD/NB96, 80% des particules ont une taille de 100nm.

Les résultats du nanosight sont en parfait accord avec les résultats obtenus en fluorescence (Figure 107). Alors que l'on observe un seul pic de particules à 100nm pour les liposomes en présences de CHMP3FL (Figure 107 A panneau de gauche), on observe plusieurs pics de particules supplémentaires s'étalant de 200nm à 600nm lorsque les liposomes ont été incubés avec la protéine Alix ΔPRD (Figure 107 A panneau du milieu). En présences du complexe Alix ΔPRD/NB96, on observe un pic majoritaire de particules à 100nm et quelques pics minoritaires de particules ayant un diamètre supérieur à 100nm (Figure 107 A panneau de droite). Une autre représentation des résultats présentée Figure 107 B indique le nombre de particules (en pourcentage) en fonction de leurs tailles. En présence d'Alix ΔPRD, 40% des particules ont une taille de 100nm et 60% des particules ont une taille supérieure à 100nm. En présence de CHMP3FL, près de 100% des

particules ont une taille de 100nm. En présence du complexe Alix  $\Delta$ PRD/NB96, 80% des particules ont une taille de 100nm. Tous les résultats d'analyse de suivi de nanoparticules ont confirmé les résultats de fusion des liposomes obtenus par fluorescence. A savoir que, CHMP3FL n'est pas capable d'induire la fusion des liposomes et le nanocorps NB96 est capable de bloquer en partie ce processus de fusion. Le processus de fusion est donc Alix dépendant.

Tous ces résultats sont très prometteurs mais quelques problèmes ont été soulevés dont il est important de discuter. Premièrement, les tests précédemment présentés ont été réalisés en présence de HCl dans un tampon HEPES qui tamponne difficilement à pH acide, afin d'acidifier le milieu à un pH 4.5. Il est raisonnable de garder à l'esprit qu'il est difficile d'avoir une visibilité stricte sur la valeur du pH final lors de l'ajout de 100mM HCl. Afin de pouvoir affirmer que le processus de fusion mis en évidence n'est pas artefactuel, il est nécessaire d'observer le processus avec un pH stable et contrôlé. J'ai donc décidé de refaire les tests de fluorescence mais cette fois-ci sans utiliser de HCl et à un pH physiologique pH5. Dans cette optique, plusieurs tampons ont été modifiés. En effet, le tampon HEPES de la solution de liposomes a été changé pour le tampon MES, beaucoup plus adapté aux pH acides. Deuxièmement, la stabilité de la protéine Alix à pH acide a été évoquée. En effet, la spécificité de fusion n'est pas assurée puisque l'on pourrait imaginer un effet non spécifique de la liaison sur les lipides si la protéine avait tendance à l'agrégation en pH acide. Pour cela, une filtration sur gel de la protéine Alix à pH 5 a été réalisée. Le profil d'éluion obtenu est similaire de celui obtenu à pH7.5 ne montrant aucune tendance à l'agrégation (résultat non montré). Le dernier point soulevé est celui des valeurs obtenues en fluorescence. En effet, tous les précédents tests présentent des valeurs qui ont atteint un niveau de saturation du détecteur (overflow). Dès lors, une deuxième batterie de test a été réalisée en prenant en compte tous ces points. Un mélange de liposomes marqués DID/DII et de liposomes non marqués est réalisé dans un ratio de 1:10. Afin d'atteindre un pH5, qui correspond à un pH physiologique des endosomes, un volume équivalent du mélange de liposomes dilué et de 50mM MES pH3.6/150mM NaCl sont utilisés comme mélange réactionnel. Le test de titration est réitéré. La fusion des liposomes est observée en fonction de la concentration en Alix  $\Delta$ PRD utilisée (Figure 108). La première observation a été que le phénomène de fusion est beaucoup plus progressif. En 2h30 heure, l'intensité de fluorescence a été multipliée par 5 pour la concentration la plus élevée (50 $\mu$ M). Pour les concentrations les

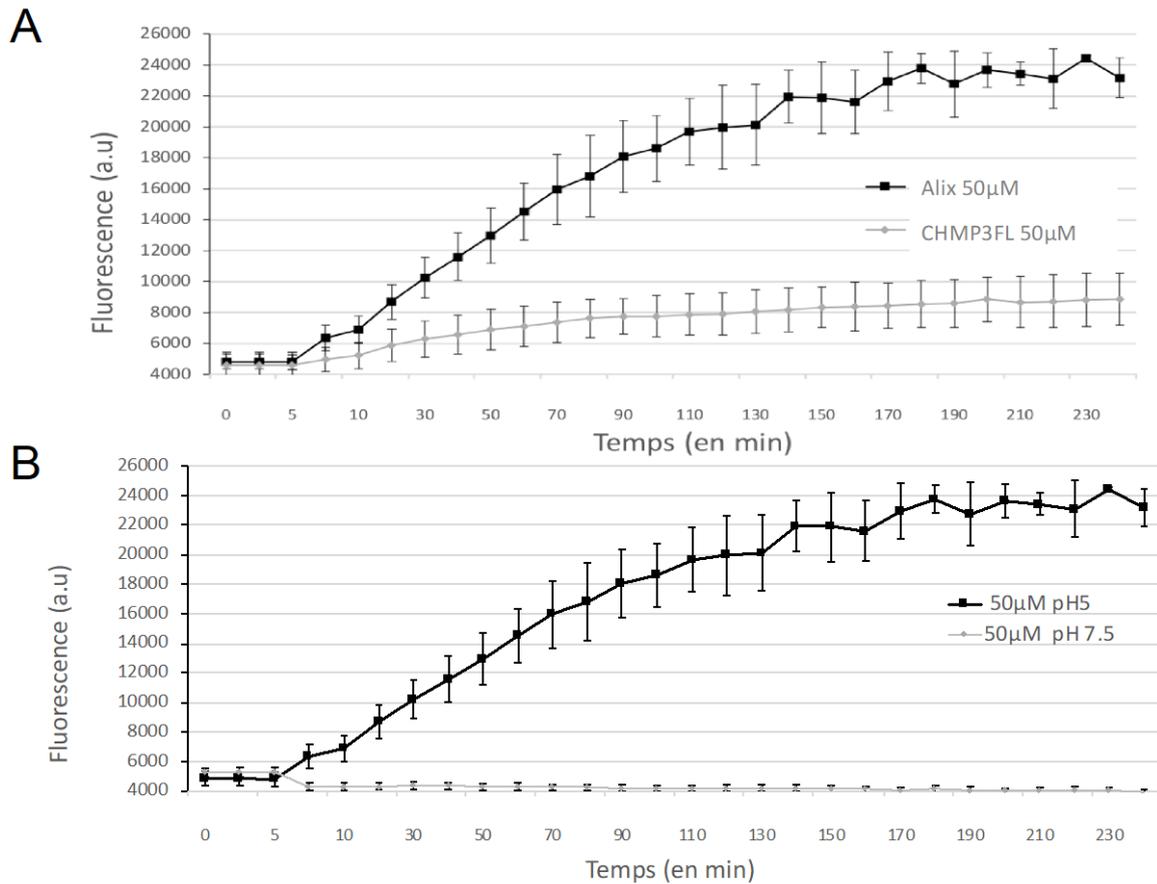
plus faibles, une faible augmentation de la fluorescence est observée. Le processus de fusion est donc bien concentration dépendante (Figure 108).



**Figure 108 : Titration de la protéine Alix**

La fusion des liposomes est observée pour 3 concentrations différentes d'Alix  $\Delta$ PRD. Le test a été réalisé deux fois. Les barres d'erreur sont indiquées en noir.

Afin de prouver que la fusion observée est bien dû à la protéine Alix, le test de fusion avec la protéine CHMP3 a été refait. Comme on peut le voir, l'incubation des liposomes avec 50  $\mu$ M de CHMP3FL ne génère qu'une faible augmentation de la fluorescence (x2). Cela a confirmé que la protéine CHMP3 n'est pas capable de provoquer la fusion (Figure 109 A). Un dernier test a été réalisé pour montrer que ce phénomène de fusion est pH dépendant. Les liposomes ont été laissés à pH7.5 au lieu de pH5. Aucune augmentation de fluorescence n'est mise en évidence à pH7.5 (Figure 109 B). La fusion des liposomes est donc Alix et pH dépendante.

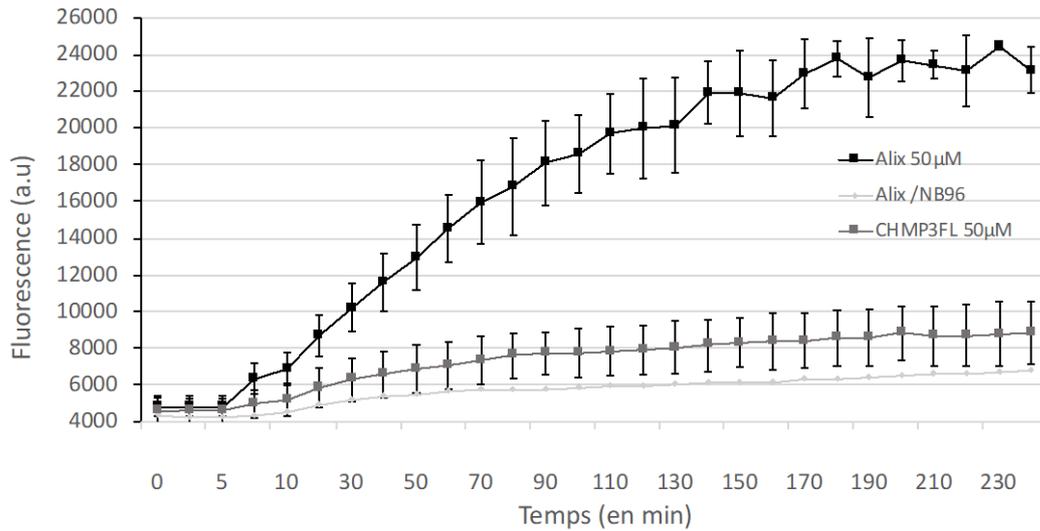


**Figure 109 : Le processus de fusion est Alix et pH dépendant**

**A.** Le test de fusion des liposomes a été réalisé en présence de 50µM d'Alix ΔPRD (courbe noire) ou de 50µM de CHMP3FL (courbe grise)

**B.** Le test de fusion des liposomes a été réalisé en présence de 50µM d'Alix ΔPRD à pH5 (courbe noire) ou de 50µM d'Alix ΔPRD à pH7.5 (courbe grise)

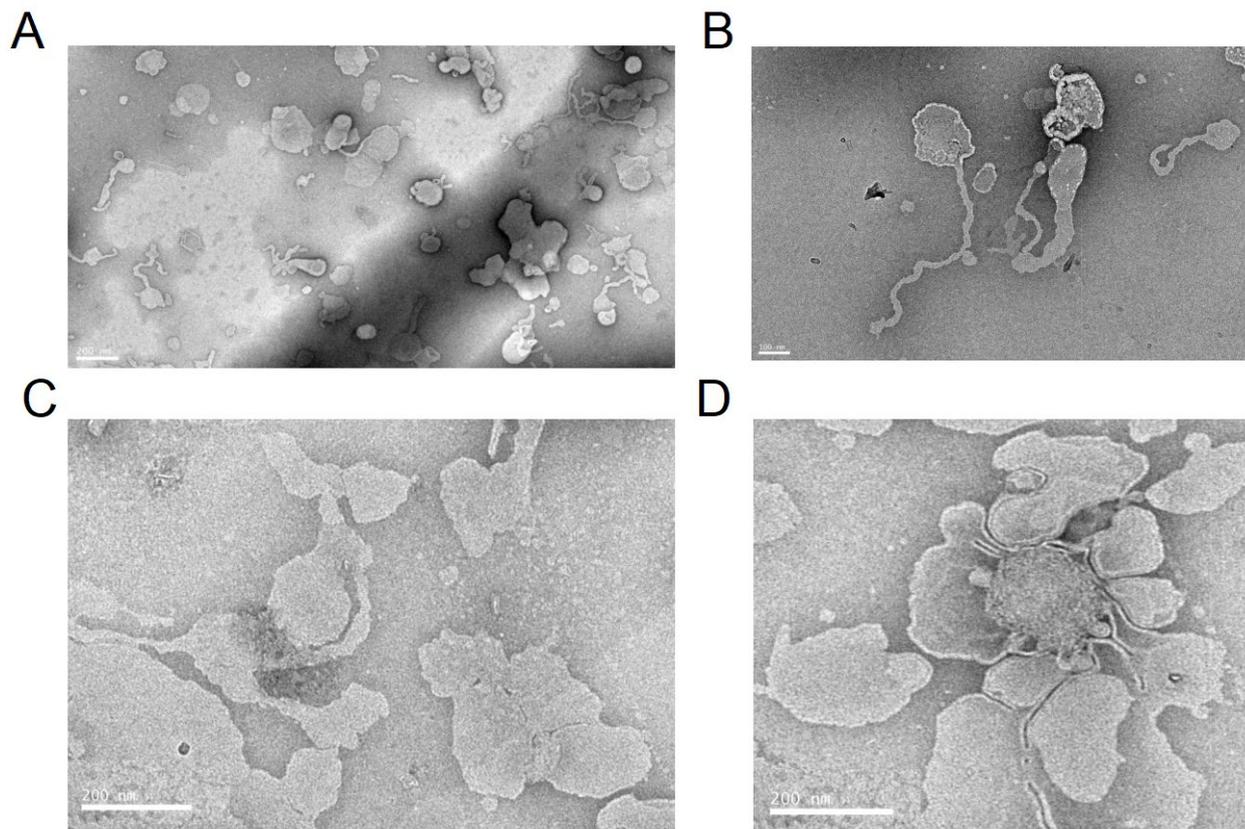
Le deuxième test mis en place afin de prouver que la fusion observée est bien dû à la protéine Alix est le test en présence de nanocorps NB96. Pour ce test, la protéine Alix a été préincubée avec le nanocorps NB96 avant le test de fusion. Comme on peut le voir, l'incubation des liposomes avec 50µM de complexe Alix/NB96 ne génère qu'une faible augmentation de la fluorescence très similaire à celle obtenue avec la protéine CHMP3FL (Figure 110). Cela a confirmé que la fusion des liposomes est donc Alix et pH dépendante.



**Figure 110: Le processus de fusion est Alix dépendant**

Le test de fusion des liposomes a été réalisé en présence de 50µM d’Alix ΔPRD (courbe noire) ou de 50µM de CHMP3FL (courbe gris foncé) ou en présence de 50µM d’Alix ΔPRD en complexe avec le nanocorps NB96 (courbe gris clair)

Afin de vérifier la présence de liposomes fusionnés dans ce nouveau contexte expérimental, deux analyses de la fraction des liposomes à pH5 après gradient de sucrose, par microscopie électronique à coloration négative ont été effectuées avec deux temps d’incubation différents : 2hr ou sur la nuit. Après une incubation de 2hr des liposomes à pH5 à température ambiante en présence de 45µM de protéine Alix ΔPRD, la fraction des liposomes à pH5, a montré que la protéine Alix est capable de déformer les membranes en structures tubulaires très allongées. La plupart des liposomes présente une taille de 200nm et quelques grosses structures correspondant à des liposomes fusionnés sont visible (Figure 111 A et B). Après une incubation sur la nuit des liposomes à pH5 en présence de 45µM de protéine Alix ΔPRD à température ambiante, une majorité de grosses structures correspondant à des liposomes partiellement ou complètement fusionnés est visible (Figure 111 C et D).

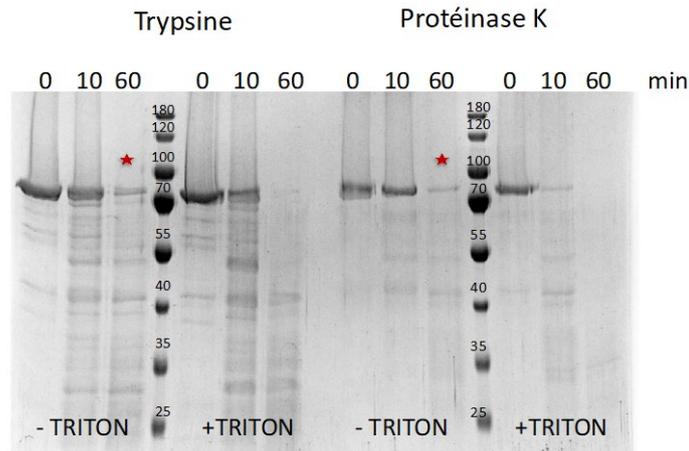


**Figure 111 : Effet de l'interaction de la protéine Alix  $\Delta$ PRD sur la taille et la forme des liposomes à pH 5**

Analyse en coloration négative en microscopie électronique des liposomes à pH5 après **A et B.** 2hr d'incubation avec la protéine Alix  $\Delta$ PRD **C et D.** après une nuit d'incubation avec la protéine Alix  $\Delta$ PRD

### 3. Protéolyse limitée

Étonnamment, en observant les liposomes fusionnés à pH acide, analysés en microscopie électronique, aucune structure évidente, qui pourrait être la protéine Alix  $\Delta$ PRD, n'a pu être observée, à leur surface ou dans l'arrière-plan. La première hypothèse venue de cette observation, est que la protéine pourrait se retrouver dans le lumen des liposomes fusionnés ce qui la rendrait invisible après fusion en microscopie électronique. Afin de tester cette hypothèse, les protéoliposomes ont été soumis à une protéolyse limitée par la trypsine ou par la protéinase K, en présence ou non de Triton-X100 (qui solubilise les liposomes).

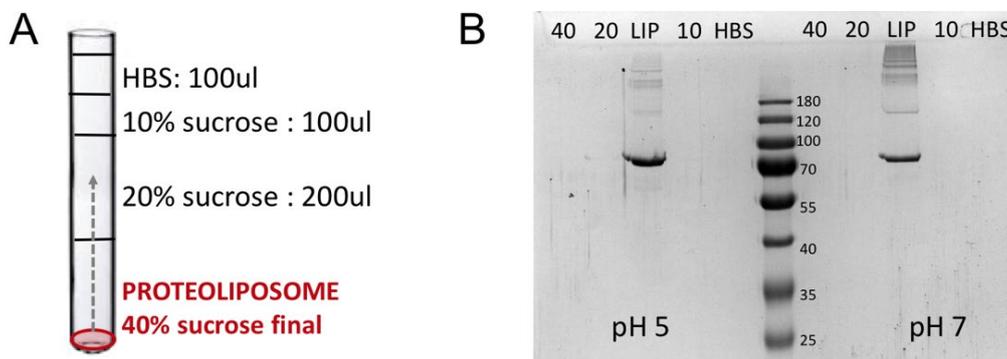


**Figure 112 : L'interaction de la protéine Alix  $\Delta$ PRD avec les liposomes lui confère une protection**  
 Profils de protéolyse limitée sur SDS page obtenus à différents temps de la réaction (0, 10 et 60 minutes) avec un ratio trypsine ou protéinase K : Alix  $\Delta$ PRD de 1:200

Après 1hr de protéolyse à la trypsine ou la protéinase K, la protéine Alix  $\Delta$ PRD est dégradée entièrement en présence de triton alors qu'elle semble en partie protégée en absence de triton (Figure 112).

#### 4. Protéoliposomes remis à pH7

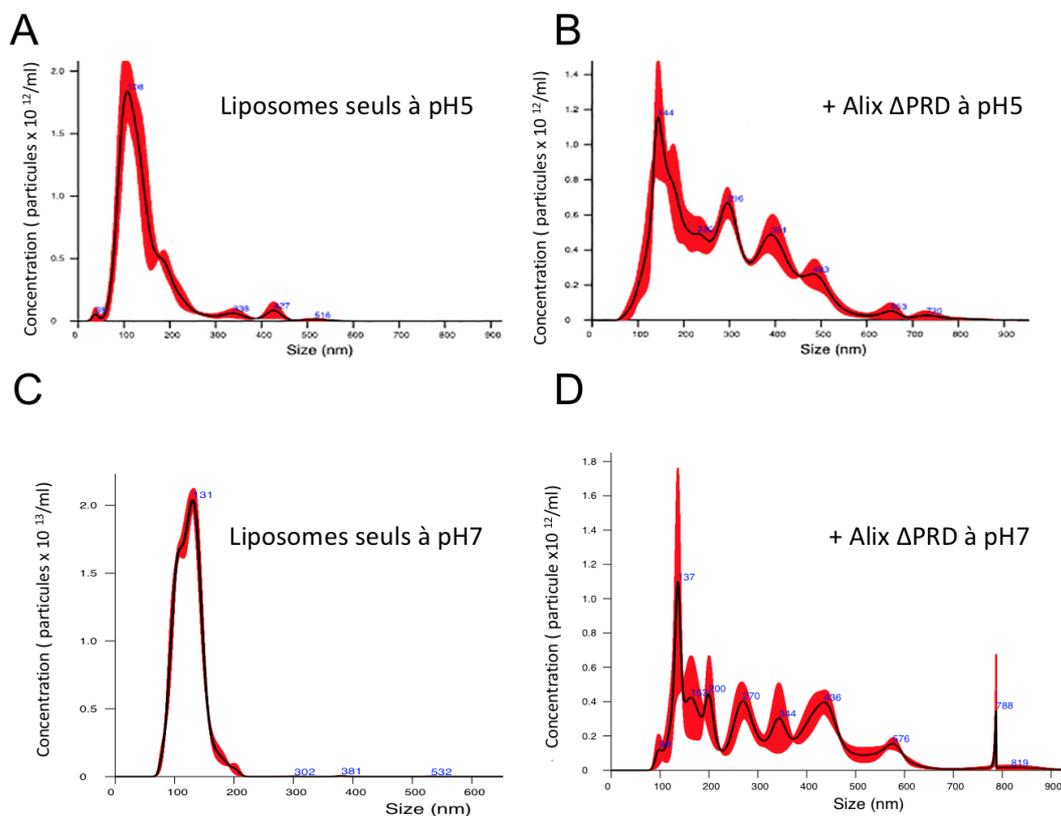
Après avoir déterminé qu'Alix  $\Delta$ PRD est responsable de la fusion des membranes plasmiques à pH5, nous avons souhaité déterminer l'effet d'un retour à pH7 sur l'interaction de la protéine avec les liposomes. Pour cela, le pH de la solution de liposomes a été réajusté à pH7 avec de la Bicine pH9.3 et incubé pendant une nuit à température ambiante. Les liposomes ont alors été déposés sur un gradient de saccharose (Figure 113 A et B).



**Figure 113 : Effet du pH sur l'interaction de Alix  $\Delta$ PRD avec les liposomes**

**A.** Schéma du gradient de saccharose **B.** Centrifugation en gradient de saccharose des liposomes incubés avec Alix  $\Delta$ PRD soit à pH5 soit incubés à pH5 puis remis à pH7. Les échantillons de 5 fractions du gradient ont été analysés par SDS- PAGE et les bandes correspondant à la protéine Alix  $\Delta$ PRD détectées par coloration au bleu de Coomassie.

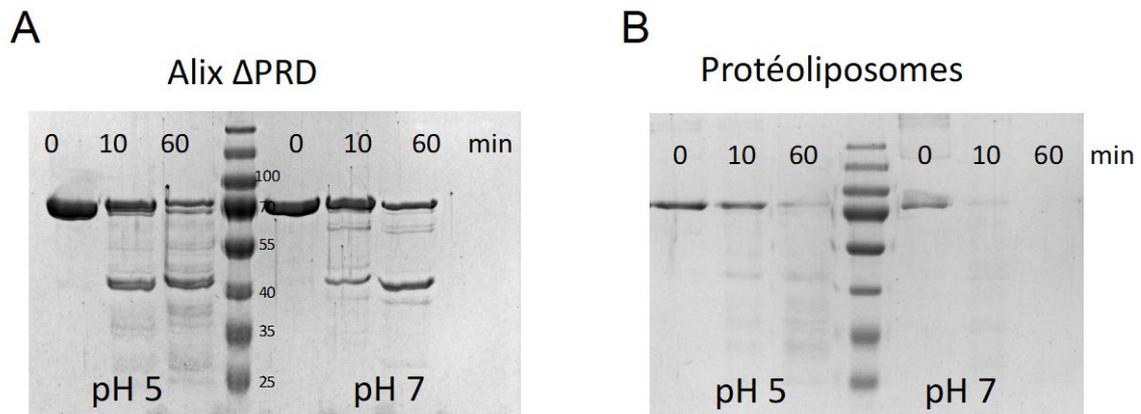
Il apparait que la protéine Alix  $\Delta$ PRD est toujours présente dans la fraction avec les liposomes lorsque les protéoliposomes sont remis à pH7, et non dans la fraction 40 correspondant au fond du gradient, ce qui indique que la protéine ne s'est pas détachée de la membrane (Figure 113). L'analyse de suivi de nanoparticules par le NanoSight montre que le profil de la taille des particules est similaire à pH5 et à pH7 (Figure 114 B et D). Ce qui indique que seul le changement de pH ne provoque pas la séparation des proteoliposomes.



**Figure 114 : Analyse de la taille des protéoliposomes à pH4.5 ou pH7 par NTA**

Profils de NTA. **A.** des liposomes seuls à pH5 (contrôle) **B.** des protéoliposomes à pH5 **C.** des liposomes seuls à pH7 (contrôle) **D.** des protéoliposomes remis à pH7

Afin de déterminer s'il y a un changement de conformation de la protéine dépendant du pH, les protéoliposomes à pH5 ou remis à pH7 sont soumis à une protéolyse limitée par la trypsine. Pour s'assurer que la trypsine a une activité similaire dans les deux pH. Une protéolyse de la protéine Alix  $\Delta$ PRD seule est réalisée en parallèle (Figure 115 A).

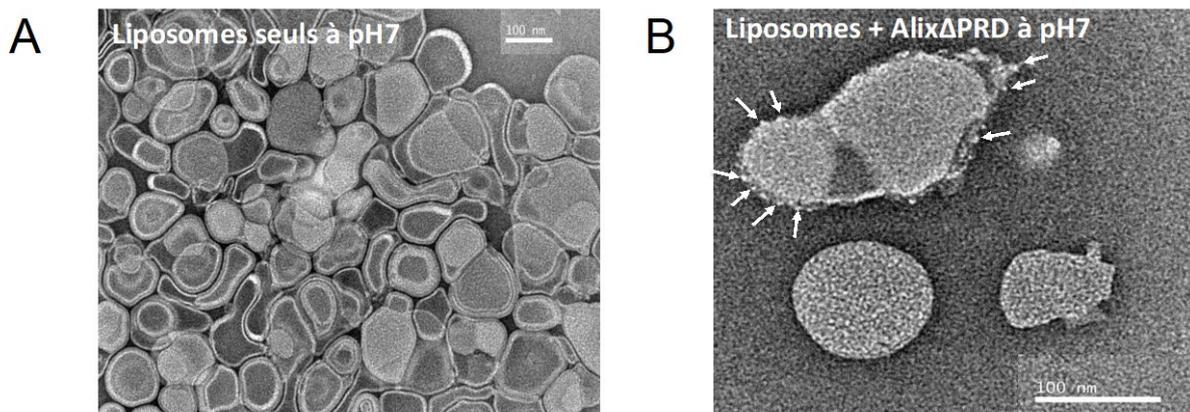


**Figure 115 : Sensibilité des protéoliposomes à pH5 ou pH7 à la trypsine**

Profils de protéolyse limitée sur SDS page obtenus à différents temps de la réaction (0, 10 et 60 minutes) avec un ratio trypsine : Alix  $\Delta$ PRD de 1:200

**A.** pour la protéine Alix  $\Delta$ PRD seule (contrôle) **B.** pour les protéoliposomes à pH5 ou remis à pH7 sans triton

La partie A de la Figure 115 A, nous montre bien que l'efficacité de la trypsine n'est pas dépendante du pH. En effet à pH5 ou à pH7 la protéine Alix  $\Delta$ PRD est dégradée de la même manière. Par contre, on observe que la protéine Alix  $\Delta$ PRD est bien plus sensible à la trypsine lorsque les protéoliposomes sont remis à pH7 qu'à pH5 (Figure 115 B). Afin d'essayer de comprendre la raison de cette sensibilité accrue à la trypsine, ces mêmes protéoliposomes ont été examinés par microscopie électronique.



**Figure 116 : Microscopie électronique des protéoliposomes à pH7 montre une protéine Alix  $\Delta$ PRD attachée à la membrane des liposomes**

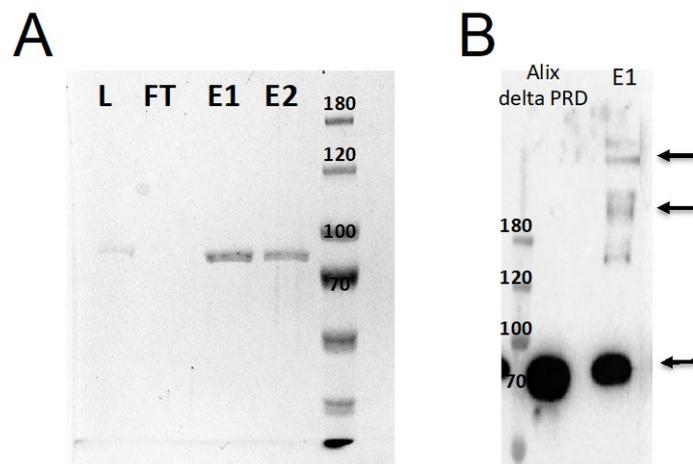
Coloration négative SST 2% de **A.** Liposomes contrôles à pH7 **B.** liposomes incubés à pH5 avec Alix  $\Delta$ PRD et remis à pH7

Lorsque les protéoliposomes sont remis à pH7, il apparait que des structures apparaissent à la membrane des liposomes fusionnés (Figure 116) qui pourraient correspondre à la protéine Alix. Les résultats de protection protéolytique et de microscopie électronique sont extrêmement intrigants puisqu'ils suggèrent que la protéine pourrait être transloquée à travers les bicouches lipidiques en fonction du pH.

### 5. Oligomérisation de la protéine Alix en présence de membranes

Depuis le début de ce parcours de thèse, une question n'a cessé d'être sans réponse. A savoir, quel est le point d'initialisation de la dimérisation, quel(s) facteur(s) est (sont) responsables du déclenchement de la dimérisation ? Une hypothèse, à la suite de ces dernières observations, serait que la dimérisation de la protéine est induite à pH5 en présence des membranes des liposomes.

Pour cela, je suis allée regarder l'état d'oligomérisation de la protéine Alix attachée aux liposomes. Après l'incubation des liposomes avec la protéine Alix  $\Delta$ PRD sur la nuit et un gradient de saccharose, du Triton X-100 (0.1% final) est ajouté aux protéoliposomes. Ainsi, les liposomes sont solubilisés et la protéine peut être purifiée sur une colonne de nickel. La protéine est éluée en présence de 250mM imidazole (Figure 117 A). Pour finir, un western blot anti Alix est réalisé sur la protéine éluée (Figure 117 B - fraction E1).



**Figure 117 : Purification et détermination de l'oligomérisation de la protéine Alix  $\Delta$ PRD attachée à la membrane des liposomes**

**A.** Purification sur colonne de nickel après solubilisation par du Triton X-100 L : Échantillon chargé ; FT : Non retenu ; E1 : Élué 1 ; E2 : Élué 2 **B.** WB anti Alix de la protéine Alix  $\Delta$ PRD purifiée et de la fraction éluée E1. Les flèches noires correspondent au monomère, dimères et oligomères de la protéine Alix. Dans les deux cas la séparation a été faite sur gel SDS /12% acrylamide.

La présence de protéines de hauts poids moléculaire reconnues par l'anticorps anti-Alix visible uniquement dans la fraction éluée de la colonne suggère une oligomérisation SDS résistante de la protéine en présence de membranes. Pourtant, ce résultat préliminaire nécessite d'être validé et confirmé par spectrométrie de masse native.

# Discussion



Alix est une protéine cytoplasmique, adaptatrice, qui a été impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la formation de vésicules intraluminales (ILV) (Larios et al., 2020), la formation d'endosomes (MVE), le bourgeonnement viral (Weissenhorn and Göttlinger, 2011 ; Votteler and Sundquist, 2013), la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007 ; Morita et al., 2010 ; McCullough et al., 2015), la réparation membranaire (Jimenez et al., 2014 ; Scheffer et al., 2014), l'apoptose des neurones (Trioulier et al., 2004 ; Mahul-Mellier et al., 2009), l'élagage des neurites (Loncle et al., 2015), la formation des pores nucléaires et la réparation de l'enveloppe nucléaire (Olmos and Carlton, 2016 ; Scourfield and Martin-Serrano, 2017).

### **I. Multimérisation et activation de la protéine Alix**

De nombreuses études conduisent à une idée, maintenant largement répandue, selon laquelle la protéine Alix existe sous plusieurs formes oligomériques (monomère, dimère, multimère). Cette multimérisation de la protéine a été impliquée dans plusieurs rôles actifs de la protéine Alix, à savoir pour le bourgeonnement de l'EIAV dans les cellules de mammifères (Zhou et al., 2010), le recrutement de la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I et le bourgeonnement du VIH-1 (Carlton et al., 2008 ; Pires et al., 2009). Carlton *et al* montrent par des tests de double hybride le rôle du motif C-terminal <sup>852</sup>PSYP<sup>855</sup> dans la multimérisation de la protéine (Carlton et al., 2008). De plus, Elias et ses collaborateurs ont montré que le PRD<sub>800-868</sub> de la protéine Alix forme des fibres amyloïdes capables de se dissoudre en monomère soluble lors de l'hyperphosphorylation par Src et sont capables de se reformer après déphosphorylation par PTP1B (Elias et al., 2021). Ces deux publications impliquent définitivement le domaine PRD dans un rôle de multimérisation de la protéine. D'autre part, les travaux de Keren Kaplan qui, par des mesures d'affinité biophysique utilisant, entre autres, la thermophorèse (MST) et le pontage chimique, a montré que le domaine V de la protéine Alix est capable de se lier à la mono-ubiquitine elle-même capable d'induire l'oligomérisation d'Alix *in vitro* (Keren-Kaplan et al., 2013). En 2009, notre laboratoire montre que la dimérisation de la protéine par le domaine V est impliquée, entre autres, dans le bourgeonnement du VIH-1 (Pires et al., 2009). Dès lors, il est donc admis que la protéine Alix est capable de dimériser ou de multimériser via soit son domaine central V soit son domaine PRD. Ces observations mènent à l'hypothèse que la forme dimérique ou multimérique est la forme active de la protéine.

En parallèle, d'autres études montrent que l'activation d'Alix, n'est possible qu'en levant l'interaction intramoléculaire entre son domaine Bro-1 et son domaine PRD, qui verrouille Alix dans une conformation fermée (Zhou et al., 2010 ; Sun et al., 2016 ; Sun, Zhou, Corvera, et al., 2015a ; Sun, Zhou, Zhang, et al., 2015). Ainsi, il est maintenant établi qu'Alix existe sous une forme monomérique fermée inactive dans le cytosol et une forme dimérique ouverte active. Bien que des structures monomériques de ses domaines Bro-1 et V aient été résolues, au début de ce travail il n'y avait aucune information structurale à haute résolution disponible pour la forme dimérique jusqu'à ce que l'on parvienne à obtenir la structure dimérique du mutant Alix -V QC8 en 2021. La structure dimérique du domaine V a été résolue à une résolution de 2.7 Å. Cette structure a permis de mettre en évidence une dimérisation impliquant à la fois une ouverture de la molécule et à la fois un échange de domaine (SWAPP dimère). En définitive, très peu de changements significatifs en dehors de cet échange de domaine n'est visible et rien dans l'analyse de la structure ne nous permet d'envisager des hypothèses sur le processus d'initiation de la dimérisation. Cependant, dans la littérature, l'activation d'Alix, c'est-à-dire les processus levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine Bro1 et le PRD qui verrouille Alix dans une conformation fermée, a été rapportée comme étant régulée par la phosphorylation (Sun et al., 2016), par l'ubiquitination (Dores et al., 2015b) et par certains adaptateurs membranaires CEP55 (Carlton et al., 2008) et Alg-2 (Shibata, 2004). Il nous est donc possible d'envisager qu'un ou plusieurs de ces systèmes de régulation soit le point initial de la dimérisation.

### ***Modifications post traductionnelle et activation d'Alix***

De nombreux travaux ont mis en évidence que la phosphorylation des domaines Bro-1 et PRD d'Alix serait impliquée dans la dynamique de la protéine. Entre autres, les phosphorylations des serines S<sub>718</sub> et S<sub>721</sub> du domaine PRD de la protéine ont été impliquées dans le changement conformationnel de la protéine Alix, nécessaire à sa fonction lors de la cytokinèse et lors du bourgeonnement du virus EIAV (Sun et al., 2016). L'hyperphosphorylation d'Alix par la protéine Src provoque un changement dans la localisation cellulaire d'Alix, de la fraction membranaire vers le cytoplasme, réduit son interaction avec le complexe SET/CIN85 et inhibe l'internalisation du récepteur à l'EGF (Chen et al, 2000 ; Schmidt et al, 2004). Une autre étude montre l'implication de

l'hyperphosphorylation du PRD<sub>800-868</sub> par la protéine Src dans la dissolution des fibres amyloïdes (Elias et al., 2021). La phosphorylation au sein du domaine V, même si elle a été démontrée par une étude de phosphoprotéomique basée sur la spectrométrie de masse reste pour l'instant très peu caractérisée (Zhou et al., 2013).

La spectrométrie de masse sur résidus phosphorylés effectuée sur les monomères et les dimères du domaine V de la protéine Alix a révélé une phosphorylation spécifique des monomères (6 sites) et des dimères (6 sites) lorsque la protéine est exprimée et produite dans *E.coli*. Aucuns mutants de phosphorylation n'ont montré une meilleure propension à dimériser. Par contre, nos études de SAXS montrent que certaines mutations induisent l'ouverture de la protéine en solution. Dès lors, il semblerait que la phosphorylation de la protéine tende à favoriser son ouverture mais n'est pas suffisante pour provoquer la dimérisation de la protéine. Afin de vérifier si Alix est régulée par les modifications post-traductionnelle, il est envisagé d'analyser le profil de phosphorylation de la protéine entière, exprimée dans des cellules de mammifère, par spectrométrie de masse. Différentes fractions cellulaires seront préparées pour comparer le degré de phosphorylation dans le cytosol et les différents compartiments membranaires tels que les endosomes et la membrane plasmique. En parallèle des études de phosphorylation, le statut oligomérique de la protéine pourra être étudié par pontage chimique et western blot.

### ***Alg-2 et activation d'Alix***

Un des processus levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine Bro-1 et le PRD de la protéine Alix est l'interaction avec la protéine senseur du calcium Alg-2 (Shibata, 2004). Notre étude en microscopie électronique de la protéine Alix FL en complexe avec la protéine Alg-2<sub>3-des23</sub> n'a pas permis d'obtenir un échantillon assez homogène afin d'envisager une résolution de structure. Cependant, nos analyses préliminaires en spectrométrie de masse dénaturante montrent que l'interaction de la protéine Alg-2 avec la protéine Alix FL n'est pas suffisante à elle seule pour initier la dimérisation de la protéine Alix. Plusieurs études montrent que l'interaction d'Alix avec Alg-2 provoque le changement conformationnel d'Alix et que cette protéine activée est capable de se relocaliser aux membranes (Sun, Zhou, Corvera, et al., 2015 ; Mercier et al., 2016 ; Scheffer et al., 2014). Nos tests amènent à penser que l'interaction seule avec Alg-

2 ne serait pas capable de provoquer la dimérisation d'Alix *in vitro*. Mais nous sommes à même d'émettre l'hypothèse, que cette interaction avec Alg-2 permet la relocalisation d'Alix à la membrane et que ce soit l'interaction avec la membrane qui induirait la dimérisation de la protéine préalablement activée par la liaison avec Alg-2.

### ***Interaction membranaire et activation d'Alix***

Alix est décrite comme une protéine cytosolique, pourtant afin de jouer son rôle de protéine adaptatrice dans les processus de remodelage de la membrane par les protéines ESCRT, elle est recrutée à la membrane. En utilisant des tests de liaison aux liposomes, j'ai montré la capacité de la protéine Alix  $\Delta$ PRD monomérique à se lier, à déformer et à faire fusionner les liposomes *in vitro* à pH acide. Cependant, de façon assez surprenante les images des protéoliposomes fusionnés obtenues en coloration négative en microscopie électronique n'ont révélé aucune présence de protéine sauf lorsque les protéoliposomes ont été remis à pH7. A pH7, des structures apparaissent à la membrane des liposomes fusionnés. Tous ces résultats soulèvent un certain nombre de questions. Pourquoi la protéine Alix n'est-elle plus visible après la fusion des liposomes ? Les structures observées à pH7 sur les liposomes pourraient-elles correspondre à la protéine Alix ? Enfin, des essais de protéolyse limitée à la trypsine ou à la protéine K ont montré, d'une part, que la protéine semble en partie protégée lorsqu'elle est en interaction avec la membrane à pH acide et, d'autre part que cette protection est abolie lorsque le pH est remis à un pH neutre. Ces tests d'interaction avec les membranes des liposomes nous permettent deux voies de réflexion. L'une, sur la nécessité d'un pH acide pour l'interaction de la protéine Alix avec les membranes *in vitro* ainsi que la relevance de cette observation en termes de processus cellulaire et l'autre, sur la protection partielle de la protéine en protéolyse limitée et l'absence de structure au niveau des membranes.

### ***Fusion membranaire pH dépendante***

La protéine Alix est une protéine que l'on retrouve dans le cytosol, associée à la face cytosolique des membranes endosomales (Bissig et al., 2013) et dans les exosomes (Théry et al., 2001). Il a été montré que la protéine Alix est impliquée dans la formation des vésicules intraluminales à l'intérieur des endosomes (Baietti et al., 2012 ; Matsuo et

al., 2004) et dans la re-fusion de ces vésicules avec la membrane des endosomes : processus de back fusion (Gruenberg, 2020). Même si pour le moment le pH des exosomes est inconnu, il n'est pas complètement aberrant de penser que la protéine Alix peut être en présence d'un pH relativement acide proche de celui des endosomes tardifs, à savoir un pH entre 4.5 et 5.5 lors de ce processus de fusion des exosomes avec les membranes endosomales. Dès lors, nos travaux de fusion membranaire réalisés à pH 5 associés aux données de Bissig *et al*, soutiennent un modèle dans lequel Alix serait recrutée aux membranes endosomales par le phospholipide LBPA, ce qui déclencherait la dimérisation d'Alix, qui conduirait à l'exposition et à l'insertion partielle d'une boucle hydrophobe dans les bicouches lipidiques (Bissig et al., 2013 ; Matsuo et al., 2004). Ceci pourrait expliquer que la protéine est à la fois impliquée dans la formation et la fusion des vésicules intracellulaires.

### ***Fusion membranaire et translocation***

Une étude de Pan *et al* a mis en évidence que la protéine Alix, conventionnellement admise pour être cytosolique peut être sécrétée afin de réguler l'adhésion cellulaire intégrine dépendante et l'assemblage de la fibronectine (Pan et al., 2008). A part, cette étude de Pan *et al*, l'idée que la protéine Alix serait capable de traverser la membrane plasmique est une idée pour le moment non étudiée. Cependant, nos travaux montrant l'absence de structure au niveau des membranes après fusion des liposomes, nous font penser que la protéine pourrait être transloquée à travers la membrane et être internalisée lors du processus de fusion *in vitro*. En effet, cette hypothèse est appuyée par le fait que de nombreuses protéines cytosoliques ayant des fonctions extracellulaires sont sécrétées de manière non conventionnelle et la plupart de ces protéines lient les phospholipides. Certaines de ces protéines sont directement transloquées à travers la membrane. Il a été montré pour l'Annexine, que le phénomène de translocation à travers la membrane peut être dû, seulement à des mouvements bilatéraux des lipides (Stewart et al., 2018), ce qui dans le cas de la protéine Alix pourrait être induit par l'insertion de sa boucle hydrophobe dans les bicouches lipidiques (Bissig et al., 2013 ; Matsuo et al., 2004). En conclusion, nous démontrons que la protéine Alix a bien une capacité à se lier à la membrane *in vitro* à pH acide mais d'autres études sont nécessaires afin de valider ses activités de remodelage membranaire. Au vu des

différentes possibilités, il n'est pas exclu que l'activation d'Alix ait plusieurs points d'entrée différents selon le processus et la localisation cellulaire engagés. Il sera nécessaire de vérifier si l'interaction membranaire de la protéine induit sa dimérisation et si la protéine est capable ou non de transloquer à travers la membrane.

## **II. Alix versus ESCRT-I/II : Deux voies concomitantes**

Les membranes cellulaires sont des entités hautement dynamiques. Elles subissent au cours du temps, des processus continus de remodelage, de fusion, de bourgeonnement ou de fission. Il a été démontré depuis quelques années que ces processus de remodelage sont médiés par les composants de la machinerie ESCRT associée à la protéine accessoire Alix (Christ et al., 2017 ; Lippincott-Schwartz et al., 2017 ; Schöneberg et al., 2017 ; Scourfield and Martin-Serrano, 2017 ; McCullough et al., 2018 ; Stoten and Carlton, 2018). L'assemblage et la formation des filaments du complexe ESCRT-III, responsable de la fission membranaire, peuvent être favorisés par la courbure de la membrane (Lee et al., 2015) ou par des partenaires de liaison. Les deux « nucléateurs » les mieux caractérisés de la polymérisation du complexe ESCRT-III sont la protéine Alix et le complexe ESCRT-II. Ces deux derniers recrutent la protéine CHMP4, qui participe à toutes les réactions connues de fission membranaire dépendante de la machinerie ESCRT.

Pendant des années, des études sur le rôle et l'implication des complexes ESCRT-I/II dans les processus de cytokinèse et de bourgeonnement viral du VIH-1 ont fait l'objet de controverses. Les études initiales utilisant la technique de siRNA afin de supprimer le complexe ESCRT-II montrait que ce complexe n'était pas nécessaire au bourgeonnement du VIH dans les cellules T 293 (Langelier et al., 2006). De la même manière, les premiers essais de déplétion des sous unités du complexe ESCRT-II n'entraînant qu'un défaut minime dans la cytokinèse ont conduit à la conclusion qu'ils n'étaient pas indispensables à la cytokinèse (Morita et al., 2007 ; Morita et al., 2010 ; Peel et al., 2011 ; Schuh and Audhya, 2014). Au contraire, en utilisant un système de liposomes, les travaux du laboratoire Hurley ont montré que la protéine Gag du VIH-1, marquée par un fluorophore, ne forme des punctuations qu'en présence du complexe ESCRT-II et de CHMP6, ce qui suggère que le complexe ESCRT-II fait partie intégrante du complexe nécessaire au bourgeonnement du VIH-1 (Carlson and Hurley, 2012). Et des études récentes

d'invalidation ont rapporté que les complexes ESCRT-I, ESCRT-II et la protéine CHMP6 sont nécessaires à la cytokinèse (Christ et al., 2016 ; Christ et al., 2017). Il est maintenant admis que le complexe ESCRT-I/II d'une part, et la protéine Alix d'autre part, constituent deux points d'entrée partiellement redondants pour la scission membranaire médiée par la machinerie ESCRT lors des deux processus de cytokinèse (Christ et al., 2016) et de bourgeonnement du VIH-1. Or, l'un de leur rôle le plus important de ces deux voies ESCRT-I/II et Alix est leur rôle de recrutement de la protéine CHMP4 du complexe ESCRT-III pour que l'initiation de la fission de la membrane puisse être effective.

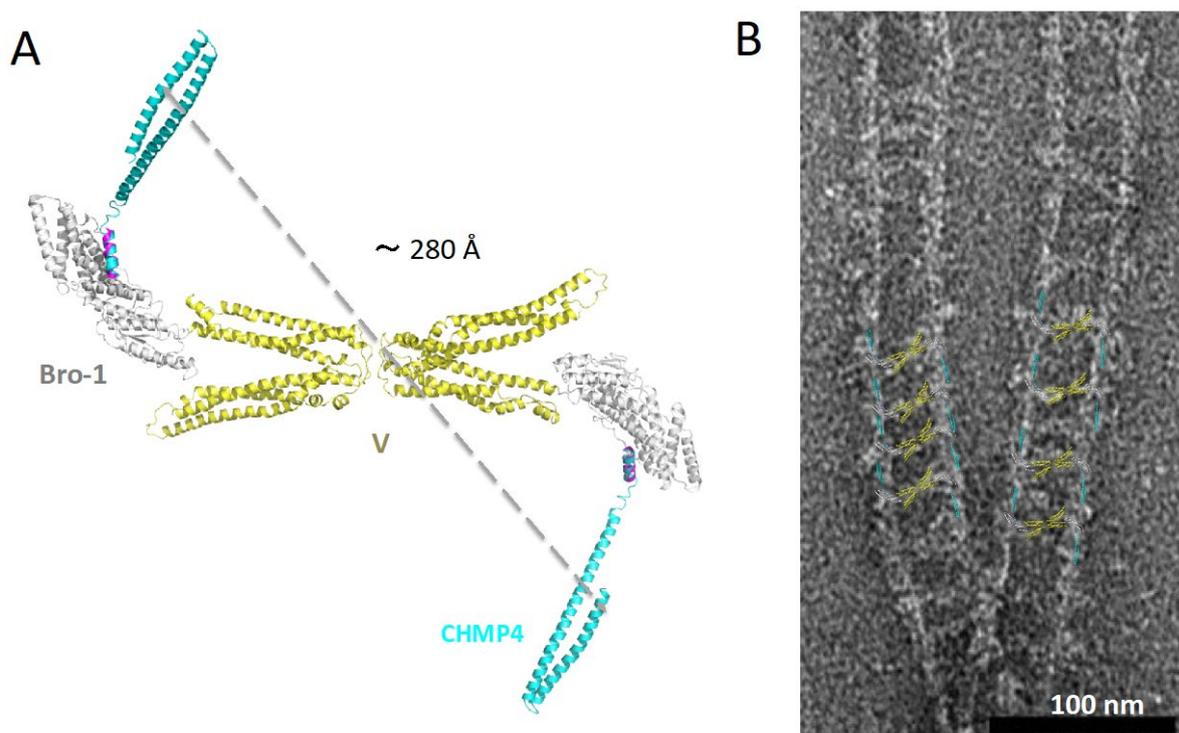
En effet, il est maintenant parfaitement établi que la machinerie ESCRT est l'acteur principal du bourgeonnement viral. Les rétrovirus détournent les composants de cette machinerie cellulaire ESCRT afin de favoriser le détachement des virions naissants de la surface cellulaire. Le VIH-1 recrute le complexe de scission ESCRT-III sur les sites d'assemblage du virus (Jouvenet et al., 2011) via le domaine L tardif PTAP de la protéine virale Gag<sup>p6</sup> qui se lie à Tsg101 (ESCRT-I) (Martin-Serrano et al., 2003 ; Martin-Serrano, 2007 ; Pornillos et al., 2002 ; Sundquist et al., 2004 ; Garrus et al., 2001 ; VerPlank et al., 2001 ; Demirov et al., 2002). En effet, la mutation de ce domaine tardif affecte la libération des particules et conduit à l'arrêt des structures en bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique (Göttlinger et al., 1991). Bien que la mutation du site de liaison de la protéine Alix (LYPXL) ait des effets moins prononcés que la mutation du site de liaison à Tsg101 (PTAP) sur la libération du VIH-1, la libération des virions par des mutants du VIH-1 incapables d'interagir avec Tsg101 (mutant  $\Delta$ PTAP) peut être compensée par la surexpression de la protéine Alix (Fisher et al., 2007 ; Usami et al., 2007). ESCRT-I et Alix ont donc un rôle redondant dans le recrutement du complexe ESCRT-III au site de bourgeonnement viral (Strack et al., 2003 ; Fisher et al., 2007 ; Pires et al., 2009 ; McCullough et al., 2008)

### ***Recrutement de CHMP4 au site de bourgeonnement viral par la protéine Alix***

La compréhension actuelle de la manière dont la déformation et la fission membranaire sont orchestrées par les protéines ESCRT-III est encore débattue. En 2009, l'interaction de la protéine Alix  $\Delta$ PRD avec des polymères de la protéine CHMP4 a été mise en évidence dans notre laboratoire, en microscopie électronique par Ricardo Pires (Pires

et al., 2009) (Figure 118 B). Dans les structures observées, la protéine Alix  $\Delta$ PRD dimérique « pont » deux filaments de CHMP4 et génère des structures en échelle avec des échelons d'une largeur d'environ 30nm.

Nous avons modélisé la protéine Alix Bro-V dimérique interagissant avec CHMP4 à l'aide du logiciel COOT. Pour cela, nous avons utilisé la structure de la protéine Alix Bro-V monomérique (PDB 20EV), celle de l'homologue de la protéine CHMP4 de *saccharomyces cerevisiae* PDB 3C30 et 5F7D et celle de notre structure dimérique du domaine V (Figure 118 A – Légende sur la page suivante). Cette modélisation montre une distance d'environ 280 Å entre les deux filaments de CHMP4. Dès lors, la configuration dimérique présentée Figure 118 A est en adéquation avec les structures en « échelle » obtenues avec la protéine CHMP4 par Ricardo Pires. Il est alors possible d'envisager le rôle de la protéine Alix dimérique dans le recrutement des polymères CHMP4 sur les membranes pendant le bourgeonnement viral du VIH-1. Les filaments de CHMP4 recrutés par la protéine Alix pourraient former une plateforme qui pourrait accueillir et contribuer à activer les sous-unités ESCRT-III (CHMP2/CHMP3) pour former deux filaments ou même des filaments à double brin (Henne et al., 2012 ; McCullough et al., 2015 ; Mierzwa et al., 2017 ; Teis et al., 2010 ; Prescher et al., 2015 ; Jouvenet et al., 2011 ; Morita et al., 2011 ; Cashikar et al., 2014 ; Saksena et al., 2009).



**Figure 118 : Modélisation de la structure dimérique de la protéine Alix Bro-V en interaction avec un homologue de CHMP4**

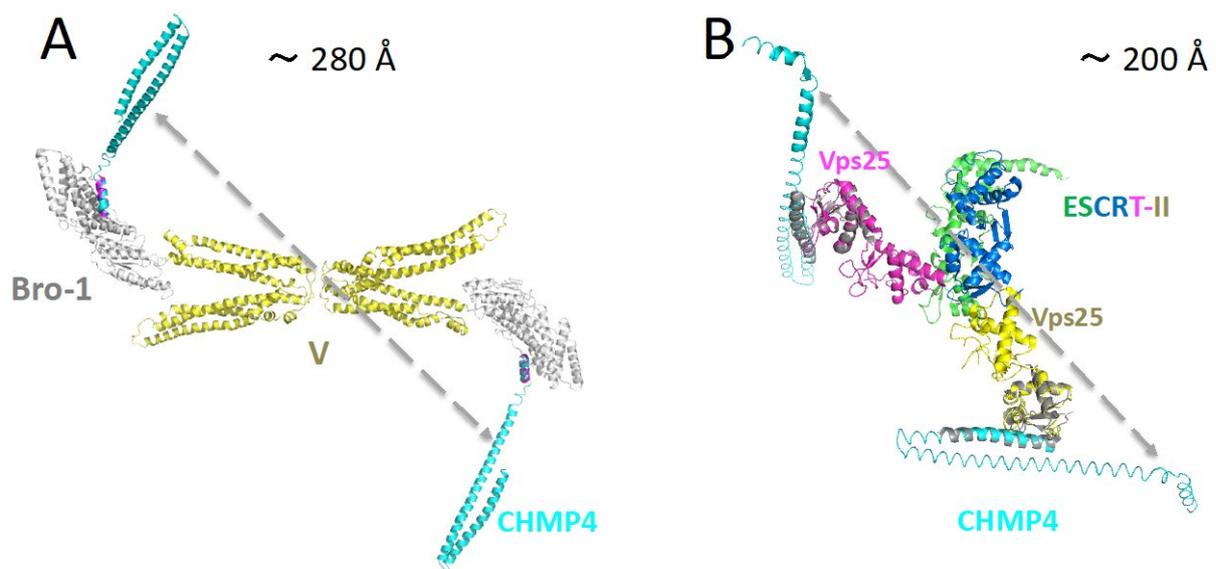
**A.** Le domaine V de la protéine Alix est matérialisé en jaune. Les domaines Bro-1 ont été modélisés avec le PDB 2OEV, ils sont en gris. Les structures PDB utilisées pour réaliser l'interaction avec l'homologue de CHMP4 sont 3C30 et 5FD7. En magenta, nous avons la structure d'un peptide de CHMP4 en interaction avec le domaine Bro-1 d'Alix. En cyan, nous avons représenté la structure de snf7 (homologue de *saccharomyces cerevisiae* de CHMP4) en conformation ouverte. La distance a été déterminée à l'aide du logiciel PYMOL.

**B.** Image en coloration négative en microscopie électronique des filaments CHMP4 en interaction avec la protéine Alix Bro-V dimérique (Pires et al., 2009).

Il a été démontré que la protéine Alix, en plus de se lier au domaine tardif de la protéine Gag<sup>p6</sup> par son domaine V, est aussi capable de se lier au domaine de la nucléocapside Gag<sup>NC</sup> par son domaine Bro-1 N-terminal (Popov et al., 2008). De telles interactions multi-domaines suggèrent que, pendant l'assemblage viral au niveau de la membrane plasmique, un certain nombre de molécules de CHMP4 pourrait être recrutées par l'intermédiaires de la protéine Alix.

***Recrutement de CHMP4 au site de bourgeonnement viral par le complexe ESCRT-I/II***

Maintenant, regardons l'autre point d'entrée de la scission membranaire, à savoir le complexe ESCRT-I/II. De la même manière que la protéine Alix, il a été montré que le complexe ESCRT-II a la capacité de recruter la protéine CHMP4. Cependant, ce recrutement est plus ou moins indirect puisqu'il requiert dans un premier temps, l'interaction des sous unités Vps25 du complexe ESCRT-I/II avec la protéine CHMP6 (ESCRT-III) (Im and Hurley, 2008) qui elle-même, recrute la protéine CHMP4 (Lee et al., 2015) (Figure 119 B). Un modèle de structure du complexe ESCRT-II en interaction avec CHMP4 a été construit selon la procédure qui suit, grâce au logiciel COOT et à partir de données PDB existantes. Le complexe ESCRT-II (PDB 1U5T) en forme de Y présente deux sous-unités EAP20 (Vps25) à ses deux extrémités (Hierro et al., 2004 ; Teo et al., 2004). Ces sous-unités EAP20 lient la protéine CHMP6 (Vps20), qui à son tour lie CHMP4 (Snf7) (Im et al., 2009). La sous-unité CHMP6 (Vps20) myristoylée adopte préférentiellement une conformation ouverte, cohérente avec son rôle dans la nucléation des filaments CHMP4 (Fyfe et al., 2011). La structure cristalline du domaine WH2 de la sous-unité Vps25 liée à un fragment de la protéine CHMP6 (PDB 3HTU) a permis de reconstruire la connexion entre le complexe ESCRT-II et la protéine CHMP6. Enfin, la structure de snf7 (CHMP4) (PDB 5F7D) en conformation ouverte a été ajoutée (Figure 119 B).



**Figure 119 : Comparaison des modélisations de la structure de la protéine Alix Bro-V dimérique et de la structure ESCRT-II en interaction avec un homologue de CHMP4**

**A.** Le domaine V de la protéine Alix est matérialisé en jaune. Les domaines Bro-1 ont été modélisés avec le PDB 2OEV, ils sont notés en gris. En cyan, nous avons représenté la structure de snf7 (homologue de *saccharomyces cerevisiae* de CHMP4) en conformation ouverte (PDB 5FD7).

**B.** ESCRT-II : les deux sous unité Vps25 (jaune et magenta) sont connectées à la protéine CHMP6. En gris, est représentée la connexion entre Vps25 et CHMP6 (PDB 3HTU : Vps25/Vps20). En cyan, snf7 (homologue de *saccharomyces cerevisiae* de CHMP4) en conformation ouverte (PDB 5FD7).

Si l'on compare les deux voies de recrutement de la protéine CHMP4, on observe qu'Alix comme le complexe ESCRT-II est capable de coordonner un assemblage de deux filaments de CHMP4 avec une distance entre ces deux filaments assez similaire ( $\sim 200 \text{ \AA}$ ) pour imaginer pourquoi ces deux points d'entrée sont partiellement redondants pour la scission membranaire médiée par la machinerie ESCRT lors des deux processus de cytokinèse et de bourgeonnement du VIH-1.

En conclusion, ce travail a permis de déterminer les détails moléculaires du dimère Alix, qui a probablement une fonction importante dans la coordination de l'assemblage des filaments CHMP4 du complexe ESCRT-III. Fonction très similaire au complexe ESCRT-II qui coordonne également deux filaments CHMP6-CHMP4. Cependant, des questions demeurent. Quel(s) est (sont) le(s) processus qui induit(sent) la dimérisation de la protéine Alix ? Quel est le rôle de l'interaction d'Alix avec la membrane ? Quel est le rôle d'Alix dans le remodelage de la membrane ? Pourrait-elle être

impliquée dans la fusion des exosomes, de façon similaire au modèle de back fusion proposé ?

# Références



## A.

**Azad K.**, Delphine Guilligay, Cecile Boscheron, Sourav Maity, Nicola De Franceschi, Guidenn Sulbaran, Gregory Effantin, Haiyan Wang, Jean-Philippe Kleman, Patricia Bassereau, Guy Schoehn, Wouter H Roos, Ambroise Desfosses, Winfried Weissenhorn, 2022, Structural basis of CHMP2A-CHMP3 ESCRT-III polymer assembly and membrane cleavage

**Abrami, L.**, L. Brandi, M. Moayeri, M. J. Brown, B. A. Krantz, S. H. Leppla, and F. G. van der Goot, 2013, Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin: *Cell Reports*, v. 5, no. 4, p. 986–996, doi:10.1016/j.celrep.2013.10.019.

**Agromayor, M.**, and J. Martin-Serrano, 2013, Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission: *Trends in Cell Biology*, v. 23, no. 9, p. 433–441, doi:10.1016/j.tcb.2013.04.006.

**Antonny, B.** et al., 2016, Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know: *The EMBO Journal*, v. 35, no. 21, p. 2270–2284, doi:10.15252/embj.201694613.

**Arribas Perez, M.**, and P. A. Beales, 2021, Biomimetic Curvature and Tension-Driven Membrane Fusion Induced by Silica Nanoparticles: *Langmuir*, v. 37, no. 47, p. 13917–13931, doi:10.1021/acs.langmuir.1c02492.

## B.

**Bache, K. G.**, A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark, 2003, Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes: *The Journal of Cell Biology*, v. 162, no. 3, p. 435–442, doi:10.1083/jcb.200302131.

**Baietti, M. F.** et al., 2012, Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes: *Nature Cell Biology*, v. 14, no. 7, p. 677–685, doi:10.1038/ncb2502.

**Barrett, C. T.**, and R. E. Dutch, 2020, Viral Membrane Fusion and the Transmembrane Domain: *Viruses*, v. 12, no. 7, p. 693, doi:10.3390/v12070693.

**Bastos, R. N.**, and F. A. Barr, 2010, Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission: *Journal of Cell Biology*, v. 191, no. 4, p. 751–760, doi:10.1083/jcb.201008108.

**Bissig, C.**, M. Lenoir, M.-C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, and J. Gruenberg, 2013, Viral Infection Controlled by a Calcium-Dependent Lipid-Binding Module in ALIX: *Developmental Cell*, v. 25, no. 4, p. 364–373, doi:10.1016/j.devcel.2013.04.003.

**Blot, V.**, F. Perugi, B. Gay, M.-C. Prévost, L. Briant, F. Tangy, H. Abriel, O. Staub, M.-C. Dokh lar, and C. Pique, 2004, Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding: *Journal of Cell Science*, v. 117, no. Pt 11, p. 2357–2367, doi:10.1242/jcs.01095.

**Blumenthal, R.**, S. A. Gallo, M. Viard, Y. Raviv, and A. Puri, 2002, Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion: *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 116, no. 1–2, p. 39–55, doi:10.1016/S0009-3084(02)00019-1.

**Bodon, G.** 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: *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, no. 46, p. 40276–40286, doi:10.1074/jbc.M111.283671.

**Bolognesi, G.**, M. S. Friddin, A. Salehi-Reyhani, N. E. Barlow, N. J. Brooks, O. Ces, and Y. Elani, 2018, Sculpting and fusing biomimetic vesicle networks using optical tweezers: *Nature Communications*, v. 9, no. 1, p. 1882, doi:10.1038/s41467-018-04282-w.

**Buysse, D.**, M. West, M. Leih, and G. Odorizzi, 2022, Bro1 binds the Vps20 subunit of ESCRT-III and promotes ESCRT-III regulation by Doa4: *Traffic*, v. 23, no. 2, p. 109–119, doi:10.1111/tra.12828.

**Byrnes, L. J.**, A. Singh, K. Szeto, N. M. Benveniste, J. P. O'Donnell, W. R. Zipfel, and H.

Sondermann, 2013, Structural basis for conformational switching and GTP loading of the large G protein atlastin: *The EMBO Journal*, v. 32, no. 3, p. 369–384, doi:10.1038/emboj.2012.353.

### C.

**Cabezas, A.**, 2005, Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes: *Journal of Cell Science*, v. 118, no. 12, p. 2625–2635, doi:10.1242/jcs.02382.

**Caillat, C.**, S. Maity, N. Miguet, W. H. Roos, and W. Weissenhorn, 2019, The role of VPS4 in ESCRT-III polymer remodeling: *Biochemical Society Transactions*, v. 47, no. 1, p. 441–448, doi:10.1042/BST20180026.

**Campsteijn, C.**, M. Vietri, and H. Stenmark, 2016, Novel ESCRT functions in cell biology: spiraling out of control? *Current Opinion in Cell Biology*, v. 41, p. 1–8, doi:10.1016/j.ceb.2016.03.008.

**Carlson, L.-A.**, and J. H. Hurley, 2012, In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, no. 42, p. 16928–16933, doi:10.1073/pnas.1211759109.

**Carlton, J. G.**, M. Agromayor, and J. Martin-Serrano, 2008, Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, no. 30, p. 10541–10546, doi:10.1073/pnas.0802008105.

**Carlton, J. G.**, and J. Martin-Serrano, 2007, Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery: *Science*, v. 316, no. 5833, p. 1908–1912, doi:10.1126/science.1143422.

**Cashikar, A. G.**, S. Shim, R. Roth, M. R. Maldazys, J. E. Heuser, and P. I. Hanson, 2014, Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding: *eLife*, v. 3, doi:10.7554/eLife.02184.

**Chang, C.-W.**, and M. B. Jackson, 2015, Synaptobrevin Transmembrane Domain Influences Exocytosis by Perturbing Vesicle Membrane Curvature: *Biophysical Journal*, v. 109, no. 1, p. 76–84, doi:10.1016/j.bpj.2015.05.021.

**Chatellard-Cause, C.**, B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul, 2002, Alix (ALG-2-interacting Protein X), a Protein Involved in Apoptosis, Binds to Endophilins and Induces Cytoplasmic Vacuolization: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, no. 32, p. 29108–29115, doi:10.1074/jbc.M204019200.

**Chen, B.**, S. C. Borinstein, J. Gillis, V. W. Sykes, and O. Bogler, 2000, The Glioma-associated Protein SETA Interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and Modulates Apoptosis in Astrocytes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, no. 25, p. 19275–19281, doi:10.1074/jbc.M908994199.

**Chiaruttini, N.**, L. Redondo-Morata, A. Colom, F. Humbert, M. Lenz, S. Scheuring, and A. Roux, 2015, Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation: *Cell*, v. 163, no. 4, p. 866–879, doi:10.1016/j.cell.2015.10.017.

**Chiaruttini, N.**, and A. Roux, 2017, Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments: *Current Opinion in Cell Biology*, v. 47, p. 126–135, doi:10.1016/j.ceb.2017.07.002.

**Christ, L.**, C. Raiborg, E. M. Wenzel, C. Campsteijn, and H. Stenmark, 2017, Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 42, no. 1, p. 42–56, doi:10.1016/j.tibs.2016.08.016.

**Christ, L.**, E. M. Wenzel, K. Liestøl, C. Raiborg, C. Campsteijn, and H. Stenmark, 2016, ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission: *The Journal of Cell Biology*, v. 212, no. 5, p. 499–513, doi:10.1083/jcb.201507009.

## D.

**DeJournett, R. E.**, R. Kobayashi, S. Pan, C. Wu, L. D. Etkin, R. B. Clark, O. Böglér, and J. Kuang, 2007, Phosphorylation of the proline-rich domain of Xp95 modulates Xp95 interaction with partner proteins: *Biochemical Journal*, v. 401, no. 2, p. 521–531, doi:10.1042/BJ20061287.

**Demirov, D. G.**, A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed, 2002, Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, no. 2, p. 955–960, doi:10.1073/pnas.032511899.

**Demonbreun, A. R.**, B. H. Biersmith, and E. M. McNally, 2015, Membrane fusion in muscle development and repair: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 45, p. 48–56, doi:10.1016/j.semcd.2015.10.026.

**Dores, M. R.**, B. Chen, H. Lin, U. J. K. Soh, M. M. Paing, W. A. Montagne, T. Meerloo, and J. Trejo, 2012, ALIX binds a YPX<sub>3</sub>L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting: *The Journal of Cell Biology*, v. 197, no. 3, p. 407–419, doi:10.1083/jcb.201110031.

**Dores, M. R.**, N. J. Grimsey, F. Mendez, and J. Trejo, 2016, ALIX Regulates the Ubiquitin-Independent Lysosomal Sorting of the P2Y1 Purinergic Receptor via a YPX3L Motif: *PLOS ONE*, v. 11, no. 6, p. e0157587, doi:10.1371/journal.pone.0157587.

**Dores, M. R.**, H. Lin, N. J. Grimsey, F. Mendez, and J. Trejo, 2015, The  $\alpha$ -arrestin ARRDC3 mediates ALIX ubiquitination and G protein-coupled receptor lysosomal sorting: *Molecular Biology of the Cell*, v. 26, no. 25, p. 4660–4673, doi:10.1091/mbc.E15-05-0284.

**Dowlatshahi, D. P.**, V. Sandrin, S. Vivona, T. A. Shaler, S. E. Kaiser, F. Melandri, W. I. Sundquist, and R. R. Kopito, 2012, ALIX Is a Lys63-Specific Polyubiquitin Binding Protein that Functions in Retrovirus Budding: *Developmental Cell*, v. 23, no. 6, p. 1247–1254, doi:10.1016/j.devcel.2012.10.023.

**Dussupt, V.**, M. P. Javid, G. Abou-Jaoudé, J. A. Jadwin, J. de La Cruz, K. Nagashima, and F. Bouamr, 2009, 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*, v. 5, no. 3, p. e1000339, doi:10.1371/journal.ppat.1000339.

## E.

**Effantin, G.**, A. Dordor, V. Sandrin, N. Martinelli, W. I. Sundquist, G. Schoehn, and W. Weissenhorn, 2013, ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers *in vitro* and act synergistically during HIV-1 budding: Structure of CHMP2A-CHMP3 tubes and HIV-1 budding: *Cellular Microbiology*, v. 15, no. 2, p. 213–226, doi:10.1111/cmi.12041.

**Eikenes, Å. H.**, L. Malerød, A. L. Christensen, C. B. Steen, J. Mathieu, I. P. Nezis, K. Liestøl, J.-R. Huynh, H. Stenmark, and K. Haglund, 2015, ALIX and ESCRT-III Coordinately Control Cytokinetic Abscission during Germline Stem Cell Division In Vivo: *PLOS Genetics*, v. 11, no. 1, p. e1004904, doi:10.1371/journal.pgen.1004904.

**El Omari, K.** et al., 2019, The structure of a prokaryotic viral envelope protein expands the landscape of membrane fusion proteins: *Nature Communications*, v. 10, no. 1, p. 846, doi:10.1038/s41467-019-08728-7.

**Elias, R. D.**, B. Ramaraju, and L. Deshmukh, 2021, Mechanistic roles of tyrosine phosphorylation in reversible amyloids, autoinhibition, and endosomal membrane association of ALIX: *Journal of Biological Chemistry*, v. 297, no. 5, p. 101328, doi:10.1016/j.jbc.2021.101328.

## F.

**Fabrikant, G.**, S. Lata, J. D. Riches, J. A. G. Briggs, W. Weissenhorn, and M. M. Kozlov, 2009, Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III: *PLoS Computational Biology*, v. 5, no. 11, p. e1000575, doi:10.1371/journal.pcbi.1000575.

**Fisher, R. D.**, H.-Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, 2007, Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding: *Cell*, v. 128, no. 5, p. 841–852, doi:10.1016/j.cell.2007.01.035.

**Fyfe, I.**, A. L. Schuh, J. M. Edwardson, and A. Audhya, 2011, Association of the Endosomal Sorting Complex ESCRT-II with the Vps20 Subunit of ESCRT-III Generates a Curvature-sensitive Complex Capable of Nucleating ESCRT-III Filaments: *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, no. 39, p. 34262–34270, doi:10.1074/jbc.M111.266411.

## G.

**Garrus, J. E.** et al., 2001, Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding: *Cell*, v. 107, no. 1, p. 55–65, doi:10.1016/S0092-8674(01)00506-2.

**Göttlinger, H. G.**, T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine, 1991, Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release.: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, no. 8, p. 3195–3199, doi:10.1073/pnas.88.8.3195.

**Gruenberg, J.**, 2020, Life in the lumen: The multivesicular endosome: *Traffic*, v. 21, no. 1, p. 76–93, doi:10.1111/tra.12715.

**Gruenberg, J.**, and H. Stenmark, 2004, The biogenesis of multivesicular endosomes: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, no. 4, p. 317–323, doi:10.1038/nrm1360.

**Guizetti, J.**, L. Schermelleh, J. Mäntler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Müller-Reichert, and D. W. Gerlich, 2011, Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments: *Science*, v. 331, no. 6024, p. 1616–1620, doi:10.1126/science.1201847.

## H.

**Haluska, C. K.**, K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J.-M. Lehn, R. Lipowsky, and R. Dimova, 2006, Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, no. 43, p. 15841–15846, doi:10.1073/pnas.0602766103.

**Hanson, P. I.**, R. Roth, Y. Lin, and J. E. Heuser, 2008, Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments: *Journal of Cell Biology*, v. 180, no. 2, p. 389–402, doi:10.1083/jcb.200707031.

**Hastoy, B.** et al., 2017, A Central Small Amino Acid in the VAMP2 Transmembrane Domain Regulates the Fusion Pore in Exocytosis: *Scientific Reports*, v. 7, no. 1, p. 2835, doi:10.1038/s41598-017-03013-3.

**Henne, W. M.**, N. J. Buchkovich, and S. D. Emr, 2011, The ESCRT Pathway: *Developmental Cell*, v. 21, no. 1, p. 77–91, doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015.

**Henne, W. M.**, N. J. Buchkovich, Y. Zhao, and S. D. Emr, 2012, The Endosomal Sorting Complex ESCRT-II Mediates the Assembly and Architecture of ESCRT-III Helices: *Cell*, v. 151, no. 2, p. 356–371, doi:10.1016/j.cell.2012.08.039.

**Henzl, M. T.**, B. B. Frey, and A. J. Wolf, 2016, ALG-2 divalent-ion affinity: Calorimetric analysis of the des23 versions reveals high-affinity site for Mg(2): *Biophysical Chemistry*, v. 209, p. 28–40, doi:10.1016/j.bpc.2015.10.009.

**Hierro, A.**, J. Sun, A. S. Rusnak, J. Kim, G. Prag, S. D. Emr, and J. H. Hurley, 2004, Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex: v. 431, p. 6.

**Hinshaw, J. E.**, and S. L. Schmid, 1995, Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding: *Nature*, v. 374, no. 6518, p. 190–192,

doi:10.1038/374190a0.

**Hurley, J. H.**, and A. K. Cada, 2018, Inside job: how the ESCRTs release HIV-1 from infected cells: *Biochemical Society Transactions*, v. 46, no. 5, p. 1029–1036, doi:10.1042/BST20180019.

**Hurley, J. H.**, and P. I. Hanson, 2010, Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, no. 8, p. 556–566, doi:10.1038/nrm2937.

**Im, Y. J.**, and J. H. Hurley, 2008, Integrated Structural Model and Membrane Targeting Mechanism of the Human ESCRT-II Complex: *Developmental Cell*, v. 14, no. 6, p. 902–913, doi:10.1016/j.devcel.2008.04.004.

**Im, Y. J.**, T. Wollert, E. Boura, and J. H. Hurley, 2009, Structure and Function of the ESCRT-II-III Interface in Multivesicular Body Biogenesis: *Developmental Cell*, v. 17, no. 2, p. 234–243, doi:10.1016/j.devcel.2009.07.008.

## J.

**Jia, J.**, S. Tarabykina, C. Hansen, M. Berchtold, and M. Cygler, 2001, Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca<sup>2+</sup>-induced changes in penta-EF-hand proteins: *Structure (London, England:1993)*, v.9, no.4, p. 267–275, doi:10.1016/s0969-2126(01)00585-8.

**Jimenez, A. J.**, P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez, 2014, ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair: *Science*, v. 343, no. 6174, p. 1247136–1247136, doi:10.1126/science.1247136.

**Jouvenet, N.**, M. Zhadina, P. D. Bieniasz, and S. M. Simon, 2011, Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly: *Nature Cell Biology*, v. 13, no. 4, p. 394–401, doi:10.1038/ncb2207.

## K.

**Katoh, K.**, H. Shibata, H. Suzuki, A. Nara, K. Ishidoh, E. Kominami, T. Yoshimori, and M. Maki, 2003, 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*, v. 278, no. 40, p. 39104–39113, doi:10.1074/jbc.M301604200.

**Keren-Kaplan, T.** et al., 2013, Structure-based in silico identification of ubiquitin-binding domains provides insights into the ALIX-V:ubiquitin complex and retrovirus budding: *The EMBO Journal*, v. 32, no. 4, p. 538–551, doi:10.1038/emboj.2013.4.

**Kim, W.** et al., 2011, Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome: *Molecular Cell*, v. 44, no. 2, p. 325–340, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025.

**Kim, J.**, S. Sitaraman, A. Hierro, B. M. Beach, G. Odorizzi, and J. H. Hurley, 2005, Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain: *Developmental Cell*, v. 8, no. 6, p. 937–947, doi:10.1016/j.devcel.2005.04.001.

## L.

**Langelier, C.**, U. K. von Schwedler, R. D. Fisher, I. De Domenico, P. L. White, C. P. Hill, J. Kaplan, D. Ward, and W. I. Sundquist, 2006, Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release: *Journal of Virology*, v. 80, no. 19, p. 9465–9480, doi:10.1128/JVI.01049-06.

**Larios, J.**, V. Mercier, A. Roux, and J. Gruenberg, 2020, ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes: *Journal of Cell Biology*, v. 219, no. 3, doi:10.1083/jcb.201904113.

**Lata, S.**, G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H. G. Gottlinger, and W. Weissenhorn, 2008, Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4: *Science*, v. 321, no. 5894, p. 1354–1357, doi:10.1126/science.1161070.

- Le Blanc, I.** et al., 2005, Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids: *Nature Cell Biology*, v. 7, no. 7, p. 653–664, doi:10.1038/ncb1269.
- Lee, H. H.,** N. Elia, R. Ghirlando, J. Lippincott-Schwartz, and J. H. Hurley, 2008, Midbody Targeting of the ESCRT Machinery by a Noncanonical Coiled Coil in CEP55: *Science*, v. 322, no. 5901, p. 576–580, doi:10.1126/science.1162042.
- Lee, S., A. Joshi,** K. Nagashima, E. O. Freed, and J. H. Hurley, 2007, Structural basis for viral late-domain binding to Alix: *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 14, no. 3, p. 194–199, doi:10.1038/nsmb1203.
- Lee, I.-H.,** H. Kai, L.-A. Carlson, J. T. Groves, and J. H. Hurley, 2015, Negative membrane curvature catalyzes nucleation of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III assembly: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, no. 52, p. 15892–15897, doi:10.1073/pnas.1518765113.
- Lie-Jensen, A.,** K. Ivanauskienė, L. Malerød, A. Jain, K. W. Tan, J. K. Laerdahl, K. Liestøl, H. Stenmark, and K. Haglund, 2019, Centralspindlin Recruits ALIX to the Midbody during Cytokinetic Abscission in *Drosophila* via a Mechanism Analogous to Virus Budding: *Current Biology*, v. 29, no. 20, p. 3538–3548.e7, doi:10.1016/j.cub.2019.09.025.
- Lin, Y.,** L. A. Kimpler, T. V. Naismith, J. M. Lauer, and P. I. Hanson, 2005, 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*, v. 280, no. 13, p. 12799–12809, doi:10.1074/jbc.M413968200.
- Lippincott-Schwartz, J.,** E. O. Freed, and S. B. van Engelenburg, 2017, A Consensus View of ESCRT-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Abscission: *Annual Review of Virology*, v. 4, no. 1, p. 309–325, doi:10.1146/annurev-virology-101416-041840.
- Lira, R. B.,** T. Robinson, R. Dimova, and K. A. Riske, 2019, Highly Efficient Protein-free Membrane Fusion: A Giant Vesicle Study: *Biophysical Journal*, v. 116, no. 1, p. 79–91, doi:10.1016/j.bpj.2018.11.3128.
- Loncle, N.,** M. Agromayor, J. Martin-Serrano, and D. W. Williams, 2015, An ESCRT module is required for neuron pruning: *Scientific Reports*, v. 5, no. 1, doi:10.1038/srep08461.

## M.

- Mahul-Mellier, A.-L.** et al., 2008, Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death: *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, no. 50, p. 34954–34965, doi:10.1074/jbc.M803140200.
- Mahul-Mellier, A.-L.** et al., 2009, Alix and ALG-2 make a link between endosomes and neuronal death: *Biochemical Society Transactions*, v. 37, no. Pt 1, p. 200–203, doi:10.1042/BST0370200.
- Maity, S.,** C. Caillat, N. Miguet, G. Sulbaran, G. Effantin, G. Schoehn, W. H. Roos, and W. Weissenhorn, 2019, VPS4 triggers constriction and cleavage of ESCRT-III helical filaments: *Science Advances*, v. 5, no. 4, p. eaau7198, doi:10.1126/sciadv.aau7198.
- Maki, M.,** 2020, Structures and functions of penta-EF-hand calcium-binding proteins and their interacting partners: enigmatic relationships between ALG-2 and calpain-7: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 84, no. 4, p. 651–660, doi:10.1080/09168451.2019.1700099.
- Malerød, L.,** R. Le Borgne, A. Lie-Jensen, Å. H. Eikenes, A. Brech, K. Liestøl, H. Stenmark, and K. Haglund, 2018, Centrosomal ALIX regulates mitotic spindle orientation by modulating astral microtubule dynamics: *The EMBO Journal*, v. 37, no. 13, doi:10.15252/embj.201797741.
- Martin-Serrano, J.,** 2007, The Role of Ubiquitin in Retroviral Egress: *Traffic*, v. 8, no. 10, p. 1297–1303, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00609.x.
- Martin-Serrano, J.,** T. Zang, and P. D. Bieniasz, 2001, HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress: *Nature*

Medicine, v. 7, no. 12, p. 1313–1319, doi:10.1038/nm1201-1313.

**Martin-Serrano, J.**, T. Zang, and P. D. Bieniasz, 2003, Role of ESCRT-I in Retroviral Budding: *Journal of Virology*, v. 77, no. 8, p. 4794–4804, doi:10.1128/JVI.77.8.4794-4804.2003.

**Matias, N. R.**, J. Mathieu, and J.-R. Huynh, 2015, Abscission Is Regulated by the ESCRT-III Protein Shrub in *Drosophila* Germline Stem Cells: *PLOS Genetics*, v. 11, no. 2, p. e1004653, doi:10.1371/journal.pgen.1004653.

**Matsuo, H.** et al., 2004, and Endosome Organization: v. 303, p. 5.

**McCullough, J.** et al., 2015, Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers: *Science*, v. 350, no. 6267, p. 1548–1551, doi:10.1126/science.aad8305.

**McCullough, J.**, R. D. Fisher, F. G. Whitby, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, 2008, ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, no. 22, p. 7687–7691, doi:10.1073/pnas.0801567105.

**McCullough, J.**, A. Frost, and W. I. Sundquist, 2018, Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 34, no. 1, p. 85–109, doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060600.

**McMillan, B. J.**, C. Tibbe, H. Jeon, A. A. Drabek, T. Klein, and S. C. Blacklow, 2016, Electrostatic Interactions between Elongated Monomers Drive Filamentation of *Drosophila* Shrub, a Metazoan ESCRT-III Protein: *Cell Reports*, v. 16, no. 5, p. 1211–1217, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.093.

**Mercier, V.** et al., 2016, ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis and signaling: *Scientific Reports*, v. 6, no. 1, doi:10.1038/srep26986.

**Mierzwa, B. E.** et al., 2017, Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis: *Nature Cell Biology*, v. 19, no. 7, p. 787–798, doi:10.1038/ncb3559.

**Mion, D.**, L. Bunel, P. Heo, and F. Pincet, 2022, The beginning and the end of SNARE -induced membrane fusion: *FEBS Open Bio*, v. 12, no. 11, p. 1958–1979, doi:10.1002/2211-5463.13447.

**Mishima, M.**, S. Kaitna, and M. Glotzer, 2002, Central Spindle Assembly and Cytokinesis Require a Kinesin-like Protein/RhoGAP Complex with Microtubule Bundling Activity: *Developmental Cell*, v. 2, no. 1, p. 41–54, doi:10.1016/S1534-5807(01)00110-1.

**Misra, S.**, and J. H. Hurley, 1999, Crystal Structure of a Phosphatidylinositol 3-Phosphate-Specific Membrane-Targeting Motif, the FYVE Domain of Vps27p: *Cell*, v. 97, no. 5, p. 657–666, doi:10.1016/S0092-8674(00)80776-X.

**Missotten, M.**, A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul, 1999, Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein: *Cell Death & Differentiation*, v. 6, no. 2, p. 124–129, doi:10.1038/sj.cdd.4400456.

**Mora, N. L.**, A. L. Boyle, B. J. van Kolck, A. Rossen, Š. Pokorná, A. Koukalová, R. Šachl, M. Hof, and A. Kros, 2020, Controlled Peptide-Mediated Vesicle Fusion Assessed by Simultaneous Dual-Colour Time-Lapsed Fluorescence Microscopy: *Scientific Reports*, v. 10, no. 1, p. 3087, doi:10.1038/s41598-020-59926-z.

**Morita, E.**, L. A. Colf, M. A. Karren, V. Sandrin, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist, 2010, Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, no. 29, p. 12889–12894, doi:10.1073/pnas.1005938107.

**Morita, E.**, V. Sandrin, H.-Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist, 2007, Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis: *The EMBO Journal*, v. 26, no. 19, p. 4215–4227, doi:10.1038/sj.emboj.7601850.

**Morita, E.**, V. Sandrin, J. McCullough, A. Katsuyama, I. Baci Hamilton, and W. I. Sundquist, 2011, ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding: *Cell Host & Microbe*, v. 9, no. 3,

p. 235–242, doi:10.1016/j.chom.2011.02.004.

**Murk, J.-L.**, W. Stoorvogel, M. J. Kleijmeer, and H. J. Geuze, 2002, The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 13, no. 4, p. 303–311, doi:10.1016/S1084952102000605.

**Muziol, T.**, E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Göttlinger, and W. Weissenhorn, 2006, Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3: *Developmental Cell*, v. 10, no. 6, p. 821–830, doi:10.1016/j.devcel.2006.03.013.

## O.

**Odorizzi, G.**, 2006, The multiple personalities of Alix: *Journal of Cell Science*, v. 119, no. 15, p. 3025–3032, doi:10.1242/jcs.03072.

**Olmos, Y.**, and J. Carlton, 2016, The ESCRT machinery: new roles at new holes: *Current Opinion in Cell Biology*, v. 38, p. 1–11, doi:10.1016/j.ceb.2015.12.001.

**Orso, G.** et al., 2009, Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase Atlastin: *Nature*, v. 460, no. 7258, p. 978–983, doi:10.1038/nature08280.

**Ott, D. E.**, L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert, 2000, Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag: *Virology*, v. 278, no. 1, p. 111–121, doi:10.1006/viro.2000.0648.

**Ott, D. E.**, L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson, 1998, Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus: *Journal of Virology*, v. 72, no. 4, p. 2962–2968, doi:10.1128/JVI.72.4.2962-2968.1998.

**Ozeir, M.**, and M. M. Cohen, 2022, From dynamin related proteins structures and oligomers to membrane fusion mediated by mitofusins: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1863, no. 8, p. 148913, doi:10.1016/j.bbabi.2022.148913.

## P.

**Pan, S.**, R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G. E. Gallick, S.-H. Lin, and J. Kuang, 2008, Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly: *The EMBO Journal*, v. 27, no. 15, p. 2077–2090, doi:10.1038/emboj.2008.134.

**Pan, S.**, R. Wang, X. Zhou, G. He, J. Koomen, R. Kobayashi, L. Sun, J. Corvera, G. E. Gallick, and J. Kuang, 2006, Involvement of the Conserved Adaptor Protein Alix in Actin Cytoskeleton Assembly: *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, no. 45, p. 34640–34650, doi:10.1074/jbc.M602263200.

**Patnaik, A.**, V. Chau, and J. W. Wills, 2000, Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, no. 24, p. 13069–13074, doi:10.1073/pnas.97.24.13069.

**Peel, S.**, P. Macheboeuf, N. Martinelli, and W. Weissenhorn, 2011, Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 36, no. 4, p. 199–210, doi:10.1016/j.tibs.2010.09.004.

**Pires, R.** et al., 2009, A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments: *Structure*, v. 17, no. 6, p. 843–856, doi:10.1016/j.str.2009.04.007.

**Popov, S.**, E. Popova, M. Inoue, and H. G. Göttlinger, 2008, Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Engages the Bro1 Domain of ALIX/AIP1 through the Nucleocapsid: *Journal of Virology*, v. 82, no. 3, p. 1389–1398, doi:10.1128/JVI.01912-07.

**Pornillos, O.**, S. L. Alam, D. R. Davis, and W. I. Sundquist, 2002, Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein: *Nature Structural Biology*, doi:10.1038/nsb856.

**Pornillos, O.**, D. S. Higginson, K. M. Stray, R. D. Fisher, J. E. Garrus, M. Payne, G.-P. He, H.

E. Wang, S. G. Morham, and W. I. Sundquist, 2003, HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein: *The Journal of Cell Biology*, v. 162, no. 3, p. 425–434, doi:10.1083/jcb.200302138.

**Prescher, J.**, V. Baumgärtel, S. Ivanchenko, A. A. Torrano, C. Bräuchle, B. Müller, and D. C. Lamb, 2015, Super-Resolution Imaging of ESCRT-Proteins at HIV-1 Assembly Sites: *PLOS Pathogens*, v. 11, no. 2, p. e1004677, doi:10.1371/journal.ppat.1004677.

**Putterman, D.**, R. B. Pepinsky, and V. M. Vogt, 1990, Ubiquitin in avian leukosis virus particles: *Virology*, v. 176, no. 2, p. 633–637, doi:10.1016/0042-6822(90)90035-p.

## R.

**Raiborg, C.**, K. G. Bache, D. J. Gillooly, I. H. Madhus, E. Stang, and H. Stenmark, 2002, Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes: *Nature Cell Biology*, v. 4, no. 5, p. 394–398, doi:10.1038/ncb791.

**Raiborg, C.**, B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, and H. Stenmark, 2001, FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes: *Journal of Cell Science*, v. 114, no. 12, p. 2255–2263, doi:10.1242/jcs.114.12.2255.

**Ramachandran, R.**, and S. L. Schmid, 2018, The dynamin superfamily: *Current Biology*, v. 28, no. 8, p. R411–R416, doi:10.1016/j.cub.2017.12.013.

Risselada, H. J., and A. Mayer, 2020, SNAREs, tethers and SM proteins: how to overcome the final barriers to membrane fusion? *Biochemical Journal*, v. 477, no. 1, p. 243–258, doi:10.1042/BCJ20190050.

**Rothman, J. E.**, 2015, Le principe de la fusion membranaire dans la cellule: *Biologie Aujourd'hui*, v. 209, no. 1, p. 63–85, doi:10.1051/jbio/2015010.

## S.

**Saksena, S.**, J. Sun, T. Chu, and S. Emr, 2007, ESCRTing proteins in the endocytic pathway: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 32, no. 12, p. 561–573, doi:10.1016/j.tibs.2007.09.010.

**Saksena, S.**, J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, and S. D. Emr, 2009, Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly: *Cell*, v. 136, no. 1, p. 97–109, doi:10.1016/j.cell.2008.11.013.

**Scheffer, L. L.**, S. C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K. J. Brown, A. Defour, and J. K. Jaiswal, 2014, Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair: *Nature Communications*, v. 5, no. 1, doi:10.1038/ncomms6646.

**Schmidt, M. H. H.**, I. Dikic, and O. Bögl, 2005, Src Phosphorylation of Alix/AIP1 Modulates Its Interaction with Binding Partners and Antagonizes Its Activities\*, *S*: p. 25.

**Schmidt, M. H. H.**, D. Hoeller, J. Yu, F. B. Furnari, W. K. Cavenee, I. Dikic, and O. Bogler, 2004, Alix/AIP1 Antagonizes Epidermal Growth Factor Receptor Downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 Complex: *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, no. 20, p. 8981–8993, doi:10.1128/MCB.24.20.8981-8993.2004.

**Schoch, S.**, F. Deák, A. Königstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Südhof, and E. T. Kavalali, 2001, SNARE Function Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice: *Science*, v. 294, no. 5544, p. 1117–1122, doi:10.1126/science.1064335.

**Schöneberg, J.**, I.-H. Lee, J. H. Iwasa, and J. H. Hurley, 2017, Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 18, no. 1, p. 5–17, doi:10.1038/nrm.2016.121.

**Schuh, A. L.**, and A. Audhya, 2014, The ESCRT machinery: From the plasma membrane to endosomes and back again: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 49, no. 3, p. 242–261, doi:10.3109/10409238.2014.881777.

**Scourfield, E. J.**, and J. Martin-Serrano, 2017, Growing functions of the ESCRT machinery in cell biology and viral replication: *Biochemical Society Transactions*, v. 45, no. 3, p. 613–634,

doi:10.1042/BST20160479.

**Sette, P.**, J. A. Jadwin, V. Dussupt, N. F. Bello, and F. Bouamr, 2010, 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*, v. 84, no. 16, p. 8181–8192, doi:10.1128/JVI.00634-10.

**Shi, L.**, Q.-T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H.-W. Wang, T. J. Melia, J. E. Rothman, and F. Pincet, 2012, SNARE Proteins: One to Fuse and Three to Keep the Nascent Fusion Pore Open: *Science*, v. 335, no. 6074, p. 1355–1359, doi:10.1126/science.1214984.

**Shibata, H.**, 2004, The Penta-EF-Hand Protein ALG-2 Interacts with a Region Containing PxY Repeats in Alix/AIP1, Which Is Required for the Subcellular Punctate Distribution of the Amino-Terminal Truncation Form of Alix/AIP1: *Journal of Biochemistry*, v. 135, no. 1, p. 117–128, doi:10.1093/jb/mvh014.

**Soubeyran, P.**, K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W. Y. Langdon, and I. Dikic, 2002, Cbl–CIN85–endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors: *Nature*, v. 416, no. 6877, p. 183–187, doi:10.1038/416183a.

**Stewart, S. E.**, A. Ashkenazi, A. Williamson, D. C. Rubinsztein, and K. Moreau, 2018, Transbilayer phospholipid movement facilitates annexin translocation across membranes: *Journal of Cell Science*, p. jcs.217034, doi:10.1242/jcs.217034.

**Stoten, C. L.**, and J. G. Carlton, 2018, ESCRT-dependent control of membrane remodelling during cell division: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 74, p. 50–65, doi:10.1016/j.semdb.2017.08.035.

**Strack, B.**, A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Göttlinger, 2003, AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding: *Cell*, v. 114, no. 6, p. 689–699, doi:10.1016/S0092-8674(03)00653-6.

**Sun, S.**, L. Sun, X. Zhou, C. Wu, R. Wang, S.-H. Lin, and J. Kuang, 2016, Phosphorylation-Dependent Activation of the ESCRT Function of ALIX in Cytokinetic Abscission and Retroviral Budding: *Developmental Cell*, v. 36, no. 3, p. 331–343, doi:10.1016/j.devcel.2016.01.001.

**Sun, S.**, X. Zhou, J. Corvera, G. E. Gallick, S.-H. Lin, and J. Kuang, 2015, ALG-2 activates the MVB sorting function of ALIX through relieving its intramolecular interaction: *Cell Discovery*, v. 1, p. 15018, doi:10.1038/celldisc.2015.18.

**Sun, S.**, X. Zhou, W. Zhang, G. E. Gallick, and J. Kuang, 2015, Unravelling the pivotal role of Alix in MVB sorting and silencing of the activated EGFR: *Biochemical Journal*, v. 466, no. 3, p. 475–487, doi:10.1042/BJ20141156.

**Sundquist, W. I.**, and H.-G. Krausslich, 2012, HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, no. 7, p. a006924–a006924, doi:10.1101/cshperspect.a006924.

**Sundquist, W. I.**, H. L. Schubert, B. N. Kelly, G. C. Hill, J. M. Holton, and C. P. Hill, 2004, Ubiquitin Recognition by the Human TSG101 Protein: *Molecular Cell*, v. 13, no. 6, p. 783–789, doi:10.1016/S1097-2765(04)00129-7.

**Suzuki, H.**, M. Kawasaki, T. Inuzuka, M. Okumura, T. Kakiuchi, H. Shibata, S. Wakatsuki, and M. Maki, 2008, Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex: Ca<sup>2+</sup>/EF3-driven arginine switch mechanism: *Structure (London, England: 1993)*, v. 16, no. 10, p. 1562–1573, doi:10.1016/j.str.2008.07.012.

**Suzuki, H.**, M. Kawasaki, T. Inuzuka, M. Okumura, T. Kakiuchi, H. Shibata, S. Wakatsuki, and M. Maki, 2009, The mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent recognition of Alix by ALG-2: insights from X-ray crystal structures: *Biochemical Society Transactions*, v. 37, no. 1, p. 190–194, doi:10.1042/BST0370190.

## T.

**Tang, S.**, N. J. Buchkovich, W. M. Henne, S. Banjade, Y. J. Kim, and S. D. Emr, 2016, ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis: *eLife*, v. 5, p. e15507, doi:10.7554/eLife.15507.

**Teis, D.**, S. Saksena, B. L. Judson, and S. D. Emr, 2010, ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation: *The EMBO Journal*, v. 29, no. 5, p. 871–883, doi:10.1038/emboj.2009.408.

**Teo, H.**, D. B. Veprintsev, and R. L. Williams, 2004, Structural Insights into Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT-I) Recognition of Ubiquitinated Proteins: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, no. 27, p. 28689–28696, doi:10.1074/jbc.M400023200.

**Théry, C.**, M. Boussac, P. Véron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena, 2001, Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles: *The Journal of Immunology*, v. 166, no. 12, p. 7309–7318, doi:10.4049/jimmunol.166.12.7309.

**Towler, M. C.**, S. J. Kaufman, and F. M. Brodsky, 2004, Membrane Traffic in Skeletal Muscle: *Membrane Traffic in Skeletal Muscle: Traffic*, v. 5, no. 3, p. 129–139, doi:10.1111/j.1600-0854.2003.00164.x.

**Trioulier, Y.**, S. Torch, B. Blot, N. Cristina, C. Chatellard-Causse, J.-M. Verna, and R. Sadoul, 2004, Alix, a Protein Regulating Endosomal Trafficking, Is Involved in Neuronal Death: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, no. 3, p. 2046–2052, doi:10.1074/jbc.M309243200.

## U.

**Usami, Y.**, S. Popov, and H. G. Göttlinger, 2007, Potent Rescue of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Late Domain Mutants by ALIX/AIP1 Depends on Its CHMP4 Binding Site: *Journal of Virology*, v. 81, no. 12, p. 6614–6622, doi:10.1128/JVI.00314-07.

## V.

**VerPlank, L.**, F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter, 2001, Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55<sup>Gag</sup>: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, no. 14, p. 7724–7729, doi:10.1073/pnas.131059198.

**Villarroya-Beltri, C.**, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid, and M. Mittelbrunn, 2014, Sorting it out: Regulation of exosome loading: *Seminars in Cancer Biology*, v. 28, p. 3–13, doi:10.1016/j.semcancer.2014.04.009.

**Vito, P.**, E. Lacaná, and L. D'Adamio, 1996, Interfering with Apoptosis: Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein ALG-2 and Alzheimer's Disease Gene *ALG-3*: *Science*, v. 271, no. 5248, p. 521–525, doi:10.1126/science.271.5248.521.

**Vito, P.**, L. Pellegrini, C. Guiet, and L. D'Adamio, 1999, Cloning of AIP1, a Novel Protein That Associates with the Apoptosis-linked Gene ALG-2 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent Reaction: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, no. 3, p. 1533–1540, doi:10.1074/jbc.274.3.1533.

**Votteler, J.**, and W. I. Sundquist, 2013, Virus Budding and the ESCRT Pathway: *Cell Host & Microbe*, v. 14, no. 3, p. 232–241, doi:10.1016/j.chom.2013.08.012.

## W.

**Washbourne, P.** et al., 2002, Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis: *Nature Neuroscience*, v. 5, no. 1, p. 19–26, doi:10.1038/nn783.

**Washington, N. L.**, and S. Ward, 2006, FER-1 regulates Ca<sup>2+</sup>-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis: *Journal of Cell Science*, v. 119, no. 12, p. 2552–2562, doi:10.1242/jcs.02980.

**Wehland, J.-D.**, A. S. Lygina, P. Kumar, S. Guha, B. E. Hubrich, R. Jahn, and U. Diederichsen, 2016, Role of the transmembrane domain in SNARE protein mediated membrane fusion: peptide nucleic acid/peptide model systems: *Molecular BioSystems*, v. 12, no. 9, p. 2770–2776, doi:10.1039/C6MB00294C.

**Weissenhorn, W.**, and H. Göttlinger, 2011, Essential Ingredients for HIV-1 Budding: *Cell Host & Microbe*, v. 9, no. 3, p. 172–174, doi:10.1016/j.chom.2011.03.005.

**Weissenhorn, W.**, A. Hinz, and Y. Gaudin, 2007, Virus membrane fusion: *FEBS Letters*, v. 581, no. 11, p. 2150–2155, doi:10.1016/j.febslet.2007.01.093.

**Witt, H.**, F. Savić, S. Verbeek, J. Dietz, G. Tarantola, M. Oelkers, B. Geil, and A. Janshoff, 2021, Membrane fusion studied by colloidal probes: *European Biophysics Journal*, v. 50, no. 2, p. 223–237, doi:10.1007/s00249-020-01490-5.

## **Y.**

**Yoo, G.**, Y.-K. Shin, and N. K. Lee, 2022, The Role of  $\alpha$ -Synuclein in SNARE-mediated Synaptic Vesicle Fusion: *Journal of Molecular Biology*, p. 167775, doi:10.1016/j.jmb.2022.167775.

## **Z.**

**Zeev-Ben-Mordehai, T.**, D. Vasishtan, C. A. Siebert, and K. Grünewald, 2014, The full-length cell–cell fusogen EFF-1 is monomeric and upright on the membrane: *Nature Communications*, v. 5, no. 1, p. 3912, doi:10.1038/ncomms4912.

**Zhai, Q.**, R. D. Fisher, H.-Y. Chung, D. G. Myszka, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, 2008, Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX n L late domains of HIV-1 and EIAV: *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 15, no. 1, p. 43–49, doi:10.1038/nsmb1319.

**Zhang, P.**, and J. E. Hinshaw, 2001, Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state: *Nature Cell Biology*, v. 3, no. 10, p. 922–926, doi:10.1038/ncb1001-922.

**Zhao, W.**, A. Seki, and G. Fang, 2006, Cep55, a Microtubule-bundling Protein, Associates with Centralspindlin to Control the Midbody Integrity and Cell Abcission during Cytokinesis: *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, no. 9, p. 3881–3896, doi:10.1091/mbc.e06-01-0015.

**Zhou, H.**, S. Di Palma, C. Preisinger, M. Peng, A. N. Polat, A. J. R. Heck, and S. Mohammed, 2013, Toward a Comprehensive Characterization of a Human Cancer Cell Phosphoproteome: *Journal of Proteome Research*, v. 12, no. 1, p. 260–271, doi:10.1021/pr300630k.

**Zhou, X.**, J. Si, J. Corvera, G. E. Gallick, and J. Kuang, 2010, Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins: *The Biochemical Journal*, v. 432, no. 3, p. 525–534, doi:10.1042/BJ20100862.

# **Annexe**



## **Contexte de l'étude :**

Alix est une protéine cytoplasmique adaptatrice qui existe sous plusieurs formes oligomériques. Elle est capable de multimériser via soit son domaine central V soit son domaine C-terminal riche en proline (PRD). La multimérisation de la protéine Alix a été impliquée dans plusieurs processus biologiques. Bien que les structures monomériques des domaines Bro-1 et V aient été résolues, il n'y a aucune information structurale à haute résolution disponible pour la forme active dimérique. Afin d'obtenir une information structurale de cette forme dimérique, des cristaux de la forme dimérique du domaine V de la protéine Alix ont été obtenus. Ces cristaux ont toujours montré une forte anisotropie et un faible pouvoir de diffraction. La flexibilité de la protéine mise en évidence par des études de SAXS est responsable de la faible qualité des cristaux. Dans le but de stabiliser, rigidifier une conformation dimérique de la protéine, une demande de nanocorps dirigés contre le domaine V dimérique de la protéine Alix, a été réalisée au centre INSTRUCT de Belgique. Voici le dossier de recherche qui a été soumis et accepté en novembre 2019.

# Structural characterization of dimeric alix

## Proposal Content

### **1/ Scientific background, significance and objectives**

The endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) is a conserved protein machinery that mediates membrane remodeling in a variety of cellular processes in eukaryotes and archaea (Hurley, 2015; Samson, 2017). The ESCRT machinery has been implicated in many membrane-remodeling processes. These include budding of enveloped viruses (Weissenhorn, 2013), cytokinesis (McCullough, 2013), biogenesis of microvesicles and exosomes, plasma membrane repair (Jimenez, 2014), neuron pruning (Loncle, 2015), dendritic spine maintenance (Sadoul, 2018) and nuclear envelope reformation (Olmos, 2016). The ESCRT machinery comprises five different complexes that are assembled sequentially. ESCRT-0 recognizes ubiquitylated cargo (Ren, 2010), while ESCRT-I and -II have a role in vesicle formation (Hurley, 2010) and finally ESCRT-III constitutes the fission machinery, with support from the VPS4 complex, which also recycles ESCRT-III from cellular membranes (McCullough, 2018). Tightly associated with ESCRT function is an accessory protein called Alix (ALG-2 interacting protein-X), which interacts with the ESCRT-I subunit Tsg101 and the ESCRT-III CHMP4 A, B and C proteins. Alix is an 868 amino acid cytosolic protein, composed of an N-terminal Bro1 domain linked to a V-shaped coiled-coil domain (Fisher, 2007) and a C-terminal proline-rich domain. The Bro1 domain interacts with CHMP4 (Kato, 2003; Kim, 2005) and the LBPA (Lysobiphosphatidic acid) (Bissig 2013; Matsuo, 2004), the V-shaped coiled-coil domain interacts with ubiquitin (Pashkova, 2013), the complex synthenin-syndecan (Baietti, 2012) and viral late domains (Zhai, 2008). Finally, the C-terminal proline-rich domain has many interaction partners including ESCRT-I (Strack, 2003), CEP55 (Carlton and Martin Serrano, 2007), endophilin and ALG2 (Chatellard-Causse, 2002). Alix activation was reported to be regulated by phosphorylation (Sun, 2016), by ubiquitination (Dores, 2015) and by the membrane adaptors CEP55 (Carlton, 2008) and ALG-2 (Shibata, 2004). Furthermore, we have shown that Alix dimerization is important for its function during HIV-1 budding. Dimerization is mediated by the V-domain and we have identified mutations that lead to an elongated open form of the monomer that no longer dimerizes.

Our hypothesis is that the dimeric form of Alix is required to coordinate the formation of two CHMP4 filaments at budding sites (Pires et al,2008).

## 2/ Background in your lab & current results

Although many binding partners of Alix are known, the physiological process that induces dimerization and its exact role in the regulation of ESCRT-III are still poorly understood. The recombinant expression of Alix containing the Bro1-V domains or the V-domain alone leads to formation of stable dimers and monomers in vitro (Pires, 2009) whereas the dimers and monomers are formed concentration independent. We have crystallized the dimeric Alix V-domain and collected native data to 2.7 Å as well as a 3.5 Å dataset with experimental phases to resolution of ~7-8 Å.

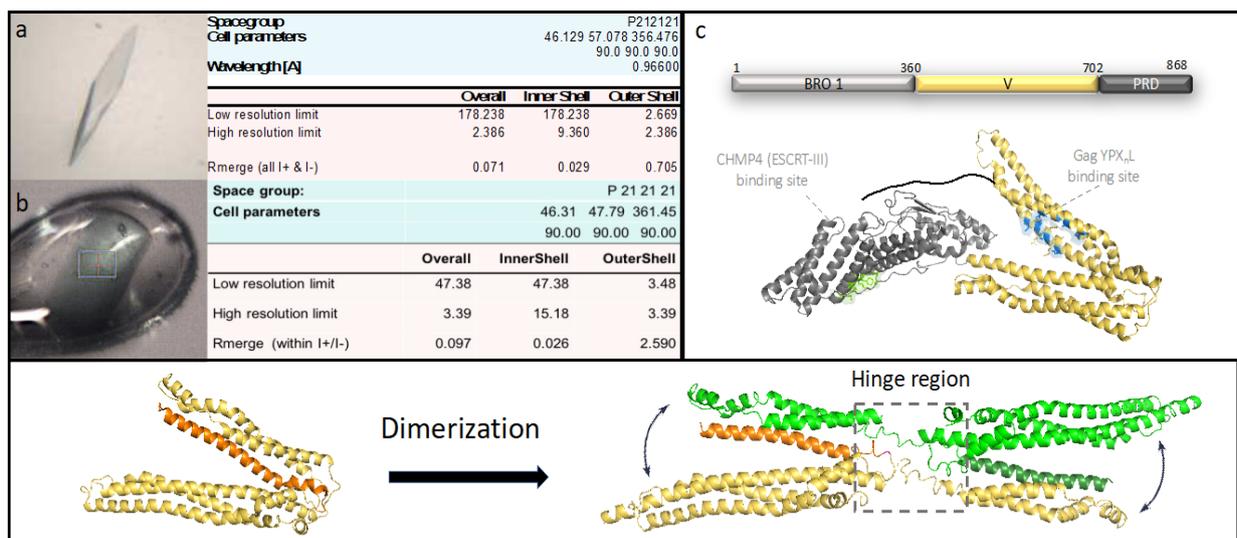


Figure 1: Crystals of Alix-V; The crystals belong to space group P212121 with two molecules per asymmetric unit.

a. X ray data analysis of Alix-V native crystal

b. X ray data analysis of Alix-V tantalum crystal

c. Schematic representation of Alix domain structure. (PDB 2eov)

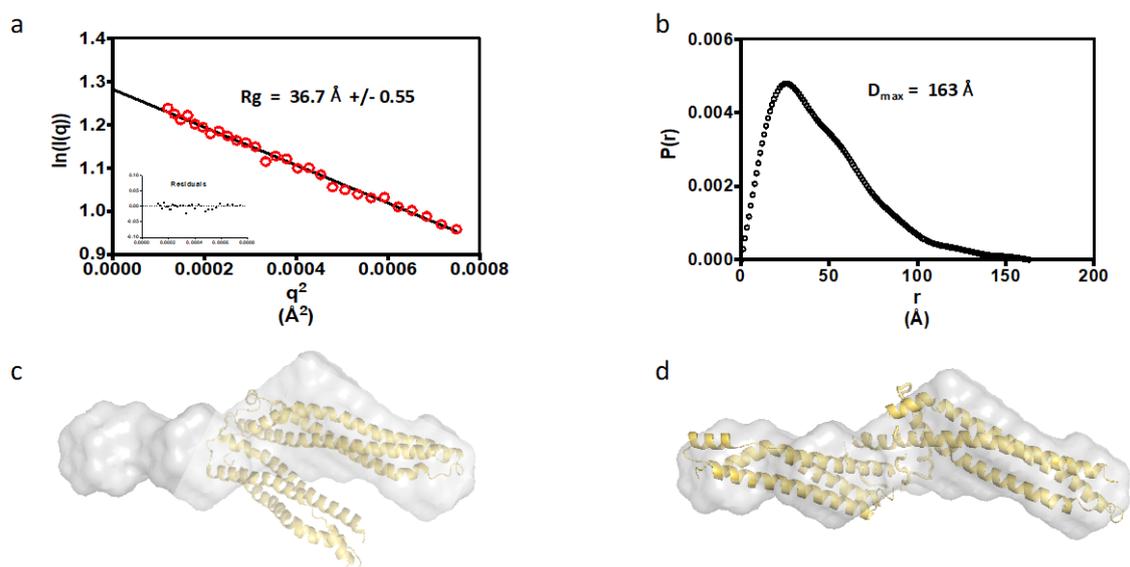
d. The left panel shows the structure of monomeric Alix V domain (PDB 2ojq). The right panel show the predicted model of dimeric Alix V domain. The current model of dimeric Alix is based on efforts to phase the crystallographic data. However, this is still only a hypothetical model and requires solid crystallographic data. The helice  $\alpha$  1 (showed in orange) detaches from the other two helices to form the second protomer (showed in green). The arrows showed the flexibility of the dimeric molecule due to the hinge region.

All datasets are anisotropic and although the structure of the monomer is known (Fisher, Chung 2007 PDB code 2OEV; Lee, Hurley 2007 PDB code 2OJQ), we have not yet succeeded in solving the dimer structure by molecular replacement.

All experimental procedures tried so far to obtain better phases failed until now (selenomethionine, selenocysteine, soaking with heavy metals, lanthanide, Argon). Only the treatment with a tantalum bromide cluster produced phases to ~7-8 Å, which are,

however, not sufficient to unambiguously solve the structures. In total, several hundred crystals have been tested in the last years. Crystal dehydrating, cross-linking, micro-seeding, macro-seeding, dialysis, additive screening procedures have so far failed to produce crystals that allow successful soaking with heavy metals for phasing.

As indicated already in the Pires et al paper, the two helical arms of the monomeric V-domain are quite flexible and we hypothesize that this flexibility is also present within the dimer assembly. Indeed, SAXS (Small Angle Xray Scattering) analyses performed with a new Alix V-domain mutant showed an open elongated monomeric conformation (Figure 2).



**Figure 2: X ray scattering analysis of monomeric mutant Alix-V<sub>T422A-T431A</sub> in solution:**

a. Linear regression of the guinier plot provided Rg values

b. Paired-distance distribution function of monomeric mutant Alix-V<sub>T422A-T431A</sub> determined using GNOM.

c. Ab initio model of monomeric mutant Alix-V<sub>T422A-T431A</sub> was fit into the molecular envelopes of the PDB 2ojq

d. Ab initio model of monomeric mutant Alix-V<sub>T422A-T431A</sub> was fit into an CORAL model using SUPCOMB. This mutant show an open monomeric conformation in solution

The aim of the nanobody production is to screen for nanobodies that are specific for the dimer. Based on our current hypothetical dimer model that proposes an elongated hinge region connecting the V-arms (Figure 2), we propose to screen for nanobodies that recognize the dimer and not the monomer. Screening for nanobodies will thus be performed with the dimer and negatively selected against the monomer. Such nanobodies are likely nanobodies that bind to the hinge region connecting the helical arms. In agreement with this approach, we have shown that mutations within the Alix-V-domain hinge region abolishes dimerization, implicating the hinge region in dimerization (Pires

et al,2008). Such nanobodies are thus likely to stabilize a dimeric conformation, provide better crystal quality, which allows successful phasing of the crystallographic data. If we succeed in isolating dimer-specific nanobodies, such nanobodies may then be further used in functional cellular studies to localize dimeric Alix at the different cellular membrane remodeling processes that recruit Alix. We are aware that not all nanobodies will be suitable for cellular expression, but it will be worthwhile to try all selected nanobodies once they are available. Such nanobodies will be an important tool for cell biologist beyond the current work.