

Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de Strasbourg.

Discipline : Sciences de la vie et de la santé  
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par Vincent Dalibard

**Les protéines Lsb3 et Lsb4 : une connexion entre la  
machinerie de l'actine et le trafic au niveau des corps  
multivésiculaires chez *S. cerevisiae***

Soutenue le 18 Decembre 2009

**Jury**

Mme G. Mirey  
M S. Gasman  
M Ch. Lamaze  
Mme V. Moreau  
Mme R. Haguenaue-Tsapis  
Mme B. Winsor  
Mme S. Friant

Directrice de Thèse  
Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examinateur  
Examinateur  
Membre invité



# Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger le travail réalisé au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse, Gladys Mirey, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir accompagné et supporté durant toutes ces péripéties, merci pour ta bonne humeur et merci d'avoir tenté jour après jour de lutter contre mon esprit finistérien.

Je tiens à remercier Barbara Winsor pour m'avoir accueilli au sein de son équipe durant ces trois années de thèse ainsi que pour m'avoir trouvé un financement pour les quelques mois supplémentaires.

Merci aux différents membres de l'équipe qui étaient là à mon arrivé: Lydia, Clélia, Albert et ceux qui seront là lors de mon départ: Audrey, Ray, Guillaume, Aline et Matthias. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, que ce soit au laboratoire, en ville, dans les Vosges ou même en Suisse.

Merci aux stagiaires, Dimitri, Dina, Marina, Thibault, Samantha, Elodie et Marie qui ont travaillé avec moi ou Gladys sur ce projet et apporté leur bonne humeur au laboratoire.

Merci à Sylvie et à son équipe. Merci à Sylvie pour ses conseils et son investissement. Merci à Vanessa à l'origine de ce projet. Un grand merci à Johan et Joëlle pour leurs conseils, leur disponibilité et l'intérêt tout particulier porté au travail du Petit. Merci à Serge, Dimitri et Bruno pour les bons moments passés ensemble.

Merci à Cathy et Aline pour m'avoir aidé dans les démarches administratives et pour l'organisation de mes voyages professionnels.

Merci à mes amis de Strasbourg (certains déjà cités plus haut) qui m'ont fait découvrir et apprécier l'Alsace. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, au resto, dans les Vosges, devant un film/un docu/une série ou devant une table de JDR. Merci à Nico, mon colocataire pendant ces trois années.

Merci aux Zamis de Francfort à Toulouse, en passant par Mâcon et la région parisienne, qui sont restés très présents malgré la distance.

Merci à ma famille qui me supporte depuis un certain temps déjà...



# Sommaire

<b>Abréviations</b>	<b>13</b>
<b>Liste des protéines de levure mentionnées</b>	<b>17</b>
<b>Introduction</b>	<b>19</b>
<i>I. Le cytosquelette d'actine.</i>	19
A. L'actine.	19
B. Dynamique de l'Actine.	20
C. Nucléation de la polymérisation de l'actine.	23
D. Le cytosquelette d'actine chez la levure.	33
<i>II. Les protéines Lsb3/Lsb4.</i>	43
A. Découverte de Lsb3 et Lsb4 lors d'un crible double-hybride.	43
B. Les homologues de Lsb3 et Lsb4.	44
C. Rôle de Lsb3 et Lsb4 au niveau des patchs corticaux d'actine.	47
D. Lsb3 et Lsb4 interagissent avec les epsines Ent3 et Ent5.	48
<i>III. Le trafic intracellulaire.</i>	51
A. Les grandes voies du trafic intracellulaire.	51
B. Le corps multivésiculaire ou endosomes tardifs	63
C. Les epsines.	77
D. Objectifs.	80
<b>Résultats</b>	<b>81</b>
<i>I Article</i>	83
<i>II. Expériences complémentaires de trafic.</i>	121
A. Endocytose.	121
B. Las17 et la voie VPS.	123
<i>III. Localisation des protéines Lsb3, Lsb4, Ent3 et Ent5.</i>	125
A. Lsb3 et Lsb4.	125
B. Localisation simultanée des epsines et de Lsb3.	129
C. La localisation des epsines dans les mutants <i>lsb3Δ</i> ou <i>lsb4Δ</i> .	131
<i>IV. Lsb3, Lsb4 et l'actine.</i>	135
A. Latrunculine A.	135
B. Profil de bourgeonnement.	138
C. Organisation du cytosquelette d'actine.	139
<b>Discussion</b>	<b>141</b>
<i>I. Interaction entre Lsb3 et Ent5.</i>	141
<i>II. L'internalisation des protéines empruntant la voie VPS.</i>	143
<i>III. Localisation de Lsb3 et Lsb4.</i>	145
<i>IV. Actine et MVB.</i>	147



<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>151</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>155</b>
<i>I. Bactéries.</i>	155
A. Souches utilisées et géotypes.	155
B. Conditions de croissance, milieux de culture et conservation.	155
C. Transformation des plasmides chez les bactéries.	156
<i>II. Levures.</i>	159
A. Souches utilisées et géotypes.	159
B. Conditions et milieux de croissance, conservation des cellules.	160
C. Transformation d'ADN chez la levure.	161
D. Préparation d'ADN à partir des cellules de levures.	162
E. Techniques génétiques.	162
<i>III. Manipulations de l'ADN.</i>	165
A. Oligonucléotides.	165
B. Plasmides.	166
C. Détermination de la concentration en ADN.	168
D. Clonage des gènes.	168
E. Séquençage de l'ADN.	170
<i>IV. Manipulation de protéines.</i>	171
A. Préparation d'extrait protéiques bruts.	171
B. Purification de protéines.	172
C. Séparation électrophorétique des protéines.	173
D. Coloration des protéines dans un gel de polyacrilamide-SDS.	173
E. Western blot.	174
F. Anticorps.	175
<i>V. Méthodes cytologiques appliquées à la levure.</i>	177
A. Test de sensibilité à la latrunculine A (LatA).	177
B. Fixation des cellules.	177
C. Marquage par des colorants.	177
D. Microscopie.	178
<i>VI. Trafic intracellulaire.</i>	179
A. Cargo sous promoteurs constitutifs.	179
B. Induction et endocytose de Fur4.	179
C. Pulse-Chase.	180
<b>Bibliographie</b>	<b>181</b>



## Liste des illustrations

Figure 1 : Processus de polymérisation de l'actine.	21
Figure 2 : Assemblage et cycle de l'actine.	22
Figure 3 : Les trois classes de nucléateurs.	24
Tableau 1 : Nomenclature des protéines du complexe Arp2/3.	24
Figure 4 : Structure et fonction du complexe Arp2/3.	25
Figure 5 : Les facteurs promouvant la nucléation et leurs domaines.	27
Tableau 2 : Les protéines WASP et SCAR dans différents organismes.	29
Figure 6 : Les domaines des protéines de la famille WASP/SCAR.	30
Figure 7 : Cycle de vie de la levure <i>S. cerevisiae</i> .	33
Figure 8 : Structure d'actine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durant le cycle cellulaire.	36
Figure 9. Les 5 NPFs chez <i>S. cerevisiae</i> .	39
Figure 10 : Lsb3 et ses homologues dans différents organismes.	44
Figure 11 : Alignement des domaines YAB de différents organismes (Johan De Craene).	46
Figure 12 : Ordre d'arrivée des protéines au site d'endocytose chez <i>S. cerevisiae</i> .	48
Figure 13 : Interaction protéine-protéines en utilisant Ent3 ou Ent5 comme appât.	49
Tableau 3 : Score-Z de Lsb3.	49
Figure 14 : Les grandes voies du trafic intracellulaire.	52
Figure 15 : Les étapes précoces de l'endocytose ou de l'internalisation.	56
Tableau 4 : Classification des mutants <i>vps</i> en fonction de la morphologie vacuolaire.	58
Figure 16 : Trafic de la protéine cytosoluble CPY empruntant la voie VPS.	60
Figure 17 : Trafic des protéines membranaire empruntant la voie VPS.	61
Figure 18 : Trafic des protéines membranaire empruntant la voie AP3.	62
Figure 19 : Rôle de l'ubiquitine dans le tri au MVB.	64
Figure 20 : Mutants <i>vps</i> de classe E.	66
Figure 21 : Les phosphoinositides.	67
Figure 22 : Complexe ESCRT-0.	70
Figure 23 : Complexe ESCRT-1.	71
Figure 24 : Complexe ESCRT-2.	72
Figure 25 : Complexe ESCRT-3 et protéines associées.	73
Figure 26 : Les deux modèles d'organisation des complexe ESCRTs.	75
Figure 27 : Localisation des cargos de la voie VPS chez le double mutant <i>ent3Δent5Δ</i> .	79
Figure 28 : Ent3 and Ent5 interact with Lsb3 in a protein-protein interaction screen.	101
Figure 29 : Lsb3 and Ent5 interact <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	103
Figure 30 : Lsb3 and Ysc84 are required for the sorting of biosynthetic cargos at the MVB.	107
Figure 31 : Lsb3 and Ysc84 are not required for cargo internalization at the MVB.	109
Figure 32 : Lsb3 and/or Ysc84 deletion do not show any defect in CPYp maturation.	111
Figure 33 : Subcellular fractionation of Ysc84-HA.	113
Tableau 5 : <i>S. cerevisiae</i> strains used in this study.	115
Tableau 6 : Oligonucléotides used in this study.	115
Figure 34 : Localisation de Fur4-GFP.	122



Figure 35 : Localisation de GFP-Cps1 et GFP-Phm5 dans des cellules <i>las17Δ</i> .	123
Figure 36 : Localisation de Lsb3 étiquetée avec Cherry ou GFP	126
Figure 37 : Diploïdes hétérozygotes exprimant Lsb3-Cherry et Lsb4-GFP.	126
Figure 38 : Lsb3 et les protéines des taches corticales d'actine.	128
Figure 39 : Localisation des Epsines Ent3 et Ent5.	129
Figure 40 : Localisation simultanée de Lsb3 et des epsines Ent3 et Ent5.	130
Figure 41 : Localisation des epsines Ent3 et Ent5 dans les mutants <i>lsb3Δ</i> et <i>lsb4Δ</i> .	132
Figure 42 : Effet de la Latrunculine A.	135
Figure 43 : Sensibilité à la Latrunculine A des souches <i>lsb3Δ</i> , <i>lsb4Δ</i> et <i>lsb3Δlsb4Δ</i> .	137
Figure 44 : Profil de bourgeonnement dans des souches diploïdes.	138
Figure 45. Organisation du cytosquelette d'actine.	139
Figure 46 : Modèle proposant un rôle de la polymérisation de l'actine au niveau du MVB.	149
Tableau 7 : Souches utilisées et génotype.	159
Tableau 8 : Oligonucléotides.	165
Tableau 9 : Plasmides spécifiques à E.coli.	166
Tableau 10 : Plasmide d'expression chez S.cerevisiae.	167
Tableau 11 : Plasmides utilisés pour les constructions chez la levure.	167
Tableau 12 : Anticorps.	175



## Abréviations

ADF :	<u>A</u> ctin- <u>d</u> epolymerizing <u>f</u> actor
ADFH :	<u>A</u> DE/ <u>c</u> ofilin <u>h</u> omology
ADN :	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADP :	<u>A</u> dénosine <u>d</u> iphosphate
ARN :	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARNm :	<u>A</u> RN <u>m</u> essenger
ATP :	<u>A</u> dénosine 5'- <u>t</u> riphosphate
BLAST :	<u>B</u> asic <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool
BSA :	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
BR :	<u>B</u> asic <u>r</u> egion
CC :	<u>C</u> oiled <u>c</u> oil
CORVET :	class <u>C</u> <u>c</u> ore <u>v</u> acuole/ <u>e</u> ndosome <u>t</u> ethering
DIC :	<u>D</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast
DMSO :	<u>D</u> iméthylsulfoxyde
DTT :	<u>D</u> ithio <u>t</u> réitol
DUF500 :	<u>D</u> omain of <u>u</u> nknown <u>f</u> unction <u>500</u>
EDTA :	<u>E</u> thylendioaminet <u>e</u> t <u>a</u> acetic acid
EEA1 :	<u>E</u> arly <u>e</u> ndosome <u>a</u> ssociated protein <u>1</u>
ENTH :	<u>E</u> psin <u>N</u> -terminal <u>h</u> omology
ESCRT :	<u>E</u> ndosomal <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport
FH1/2 :	<u>F</u> ormin <u>h</u> omology domain <u>1/2</u>
FYVE :	<u>F</u> ab1- <u>Y</u> OPB- <u>V</u> ps27- <u>E</u> EA1
GAE :	<u>G</u> amma <u>a</u> daptin <u>e</u> ar
GAPs :	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating proteins
GBD :	<u>G</u> TPase <u>b</u> inding <u>d</u> omain
GEF :	<u>G</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actors
GFP :	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GLUE :	<u>G</u> RAM-like <u>u</u> biquitin-binding in <u>E</u> AP45
GRAM :	<u>G</u> lycosyltransferases <u>R</u> ab-like GTPase <u>a</u> ctivators and <u>m</u> ytotubularins
GST :	<u>G</u> lutathione <u>s</u> -transferase
GTP :	<u>G</u> uanine <u>t</u> riphosphate
HEPES :	<u>N</u> -(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)piperazine- <u>N'</u> -(2- <u>e</u> thanesulfonic acid)
HOPS :	<u>H</u> omotypic vacuole fusion and <u>p</u> rotein <u>s</u> orting
IPTG :	<u>I</u> sopropyl $\beta$ - <u>D</u> - <u>t</u> hiogalactopyranoside
Lat A :	<u>L</u> atrunculine <u>A</u>
Lsb3/4 :	<u>L</u> as <u>s</u> eventeen <u>b</u> inding protein 3/4
LY :	<u>L</u> ucifer yellow
MATa/ $\alpha$ :	<u>M</u> ating type <u>a</u> / $\alpha$
MIM1/2 :	<u>M</u> IT- <u>i</u> nteracting <u>m</u> otif <u>1/2</u>
MIT :	<u>M</u> icrotubule- <u>i</u> nteracting and <u>t</u> rafficking
MVB :	<u>M</u> ultivesicular <u>b</u> ody
NHE :	<u>N</u> a <sup>+</sup> / <u>H</u> <sup>+</sup> <u>e</u> xchanger,
NPF :	<u>N</u> ucleation promoting <u>f</u> actor
NZF-C :	<u>N</u> p14-type <u>z</u> inc <u>f</u> inger <u>C</u>
NZF-N :	<u>N</u> p14-type <u>z</u> inc <u>f</u> inger <u>N</u>
ORF :	<u>O</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PBS :	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline
PCR :	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction



PH :	<u>P</u> leckstrin <u>h</u> omology
Pi :	<u>P</u> hosphate <u>i</u> norganique
PI :	<u>P</u> hospho <u>i</u> nositide
PI(3)P :	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>3</u> - <u>p</u> hosphate
PI(3,5)P <sub>2</sub> :	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol-( <u>3,5</u> )- <u>b</u> is <u>p</u> hosphate
PI(4,5)P <sub>2</sub> :	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol-( <u>4,5</u> )- <u>b</u> is <u>p</u> hosphate
PMSF :	<u>P</u> oly <u>m</u> éthyl- <u>s</u> ulfonyl- <u>f</u> luorure
PPI :	<u>P</u> rotein <u>p</u> rotein <u>i</u> nteraction
PX :	<u>P</u> ho <u>x</u> <u>h</u> omology
RE :	<u>R</u> éticulum <u>e</u> ndoplasmique
SDS-PAGE :	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate- <u>p</u> oly- <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
SH3 :	<u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>d</u> omain <u>3</u>
SNAP :	<u>S</u> NF <u>a</u> ttachment <u>p</u> rotein
SNAREs :	<u>S</u> NP <u>r</u> eceptors
SNF :	<u>S</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive <u>f</u> actor
SHD :	<u>S</u> car <u>h</u> omology <u>d</u> omain
TEMED :	<u>N,N,N',N'</u> - <u>t</u> étraméthyléthylènediamine
TGN :	<u>T</u> rans <u>G</u> olgi <u>n</u> etwork
Tris :	<u>t</u> ris-hydroxyméthylaminométhane
UIM :	<u>U</u> biquitine- <u>i</u> nteracting <u>m</u> otif
UEV :	<u>U</u> biquitine <u>E2</u> <u>v</u> ariant domain
VCA :	<u>V</u> erprolin- <u>c</u> ofilin- <u>a</u> cidic
VPS :	<u>V</u> acuolar <u>p</u> rotein <u>s</u> orting
WASP	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich <u>s</u> yndrom <u>p</u> rotein
WH1/2 :	<u>W</u> ASP <u>h</u> omology <u>1/2</u>
YAB :	<u>Y</u> sc84 <u>a</u> ctin <u>b</u> inding



## Liste des protéines de levure mentionnées

Abp1 :	NPF de classe II présent au niveau des taches corticales d'actine
Act1 :	Actine
Arp2 :	Actin related protein 2 membre du complexe nucléateur Arp2/3
Arp3 :	Actin related protein 3 membre du complexe nucléateur Arp2/3
Bzz1/Lsb7 :	Inhibiteur de Las17
Cps1 :	Carboxypeptidase S protéine membranaire empruntant la voie VPS
Cpy :	Carboxypeptidase Y protéine soluble empruntant la voie VPS
DPAP-B :	Diaminopeptidase B protéine membranaire empruntant la voie VPS
Ent1 :	Epsine de levure impliquée dans l'endocytose
Ent2 :	Epsine de levure impliquée dans l'endocytose
Ent3 :	Epsine de levure impliquée dans la voie VPS et dans le tri au MVB
Ent5 :	Epsine de levure impliquée dans la voie VPS et dans le tri au MVB
Fab1 :	Lipide kinase synthétisant le PI(3,5)P <sub>2</sub> à partir du PI(3)P
Fur4 :	perméase de l'uracile empruntant la voie d'endocytose
Las17/Bee1 :	Orthologue de WASP chez <i>S. cerevisiae</i> , NPF de classe I
Lsb3 :	Las seventeen binding protein 3
Lsb4/Ysc84 :	Las seventeen binding protein 4
Myo3 :	Myosine de type I, NPF de classe I
Myo5 :	Myosine de type I, NPF de classe I
Pan1 :	NPF de classe II présent au niveau des taches corticales d'actine
Phm5 :	Endopolyphosphatase, protéine membranaire empruntant la voie VPS
Rsp5 :	Ubiquitine ligase Rsp requise pour le tri et l'internalisation au MVB
Rvs167 :	Protéine impliquée dans la scission membranaire lors de l'endocytose
Sac2/Vps52 :	Suppresseur de la mutation <i>act-1</i> , composant du complexe rétrograde
Sla1 :	Inhibiteur de Las17, protéine membranaire empruntant la voie VPS
Sna3 :	Protéine localisant à la vacuole et interagissant avec Rsp5
Ste2 :	Récepteur de la phéromone $\alpha$
Ste3 :	Récepteur de la phéromone <b>a</b>
Vam3 :	Protéine (SNARE) empruntant la Voie AP-3
Vps4 :	ATPase permettant la dissociation des complexes ESCRTs
Vps28 :	Protéine Vps de classe E constituant de ESCRT-1



# Introduction

## I. Le cytosquelette d'actine.

Chez les cellules eucaryotes, il existe un réseau interne très complexe et hautement dynamique qui permet à la cellule d'organiser le trafic intracellulaire d'organites et de vésicules, de se mouvoir, de se diviser ou d'adopter différentes morphologies. Ce réseau, très structuré, est appelé cytosquelette. Il est formé de longs filaments protéiques constituant différentes structures qui s'étendent dans l'ensemble du cytoplasme de la cellule.

Trois types de filaments composent le cytosquelette : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. Chaque filament est constitué à partir d'un monomère protéique : la tubuline pour les microtubules, des protéines fibrillaires (kératine, vimentine, lamine,...) pour les filaments intermédiaires et l'actine pour les microfilaments. Les différents filaments sont impliqués dans des fonctions spécifiques mais sont capables de coopérer dans certains processus biologiques. Au sein du laboratoire de Barbara Winsor nous intéressons plus particulièrement au cytosquelette d'actine et au mécanisme de régulation de ce dernier.

### A. L'actine.

L'actine est présente chez tous les eucaryotes. Elle est très abondante : elle représente en moyenne 5% des protéines totales de la cellule mais cette valeur peut atteindre 20% dans les cellules musculaires. Certains organismes, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ne possèdent qu'un seul gène (*ACT1*) codant pour une protéine (Act1), alors que d'autres possèdent plusieurs paralogues, codés par une famille multigénique. Ainsi chez les mammifères, il existe sept paralogues :

- quatre actines alpha (exprimées dans les muscles lisses et dans les muscles striés squelettiques et cardiaques).
- deux actines gamma (exprimées dans le muscle lisse entérique et dans les tissus non musculaires).
- une actine bêta (exprimée dans les tissus non musculaires).

Par comparaison de séquences, il a été montré que l'actine est une protéine très conservée : en moyenne il y a de 80 à 90% d'identité entre l'actine de levure et les actines de mammifères (Sheterline and Sparrow, 1994).

Au sein de la cellule, l'actine existe sous deux formes : l'actine globulaire (actine G) correspondant à la forme monomérique et l'actine filamenteuse (actine F) correspondant à la forme polymérisée des monomères d'actine. L'actine F regroupée en faisceaux longitudinaux forme les câbles d'actine.

L'abondance de l'actine au sein de la cellule, mais surtout le fait qu'il s'agisse d'une protéine extrêmement bien conservée au sein des eucaryotes, indique que le cytosquelette d'actine est impliqué dans des fonctions cellulaires essentielles. En effet, il est requis, entre autre, pour la motilité cellulaire (Stossel, 1993) et le remodelage de la surface (Bretscher, 1993; Luna and Hitt, 1992). Il joue également un rôle dans les changements de forme cellulaire durant la mitose et est essentiel pour des activités contractiles telles que la contraction des muscles ou la séparation des cellules filles par l'anneau contractile durant la cytokinèse (Salmon, 1989). Le cytosquelette d'actine contrôle aussi des mouvements d'organelles (Bretscher, 2003) ainsi que des interactions cellule-cellule, cellule-substrat et participe à l'endocytose (Gottlieb et al., 1993; Toret and Drubin, 2006).

## **B. Dynamique de l'Actine.**

### **1. Structure de l'actine.**

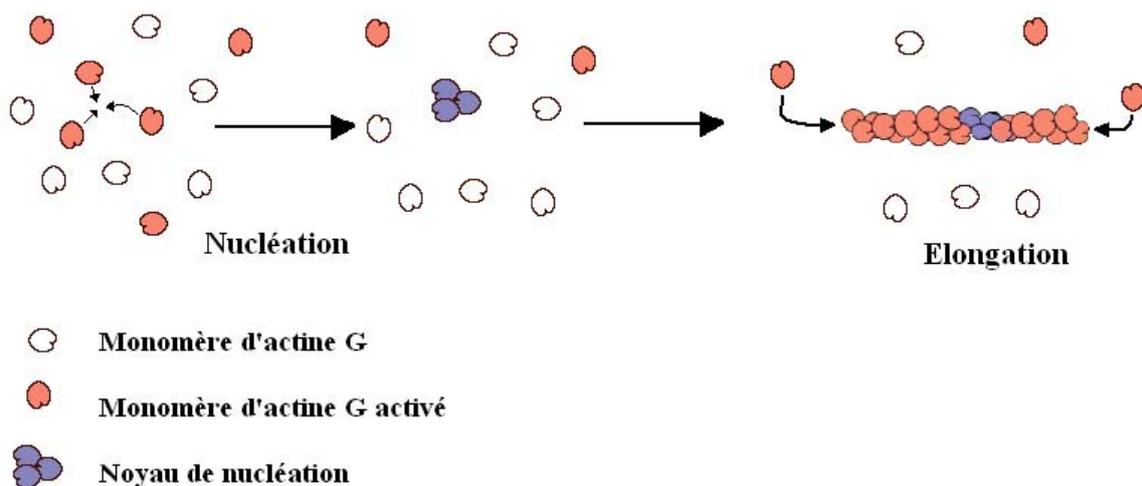
La résolution de la structure tridimensionnelle de l'actine G (complexée avec la DNaseI), a permis de mettre en évidence que cette protéine est repliée en deux domaines globulaires flexibles (I et II) (Kabsch et al., 1990). Les deux domaines forment une cavité centrale renfermant le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'un site de liaison à un cation divalent. Les ions  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  liés à ce site interagissent avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. La stabilité du complexe actine G-ion-ATP est assurée par la formation de liaisons hydrogènes et de ponts salins entre certains résidus et les phosphates de l'ATP (Kabsch and Holmes, 1995).

Dans les conditions physiologiques, l'actine G est capable de polymériser et de former les microfilaments (actine F). Un microfilament correspond à l'assemblage en tête à queue de

monomères d'actine autour d'un axe central formant une double hélice polaire d'environ 7-8nm de diamètre et de 37 nm de périodicité (Holmes et al., 1990).

## 2. Polymérisation de l'actine.

Le processus de polymérisation de l'actine (figure 1) peut être décomposé en trois étapes (Carlier, 1991). La première étape consiste en la fixation de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) au niveau de l'actine G, ce qui induit un changement de conformation de l'actine G et une activation du complexe actine G-ion-ATP. La seconde étape est l'étape de nucléation qui permet à trois monomères d'actine activés de s'assembler. Le trimère alors formé, appelé « noyau de polymérisation », est la structure nécessaire à la troisième étape : l'élongation du filament. L'élongation correspond à l'ajout de monomères d'actine sur le noyau de polymérisation.



**Figure 1 : Processus de polymérisation de l'actine.**

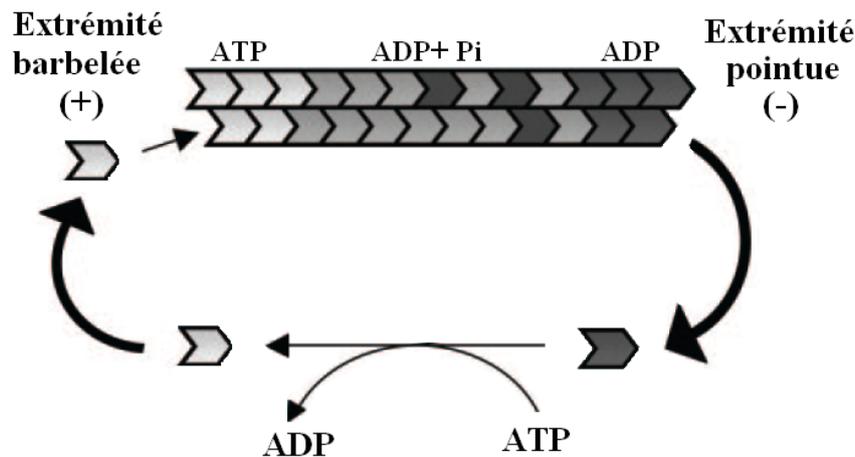
Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine qui formeront la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament.

Adaptée de Molecular Cell Biology, Lodish (5e édition).

Lorsque l'étape de la nucléation est dépassée et que le filament d'actine en est à l'étape d'élongation, on distingue les deux extrémités du filament en parlant d'extrémité pointue et d'extrémité barbelée (Pollard and Borisy, 2003). La croissance du filament d'actine après la nucléation se poursuit rapidement. Cependant cette croissance est polarisée (figure 2), les monomères s'ajoutant préférentiellement à l'extrémité barbelée (11,6 sous-unités/ $\mu\text{m/s}$  contre 1,3 sous-unités/ $\mu\text{m/s}$  à l'extrémité pointue) (Pollard, 1986). L'élongation se poursuit tant que la concentration en actine G ne chute pas en dessous d'une certaine concentration critique (Pollard and Mooseker, 1981). Lorsque cette concentration est atteinte, les filaments

d'actine formés se retrouvent dans un état dit « d'équilibre » entre polymérisation et dépolymérisation. Cependant, la concentration critique est différente pour chaque extrémité du filament d'actine (Wegner and Isenberg, 1983) : la concentration critique à l'extrémité barbelée (+) est plus basse que celle de l'extrémité pointue (-). Ainsi, c'est la polymérisation qui prédomine à l'extrémité barbelée et la dépolymérisation qui prédomine à l'extrémité pointue. A l'équilibre, la dissociation à l'extrémité (-) est compensée par l'ajout de monomères à l'extrémité (+) et la longueur du filament ne varie pas alors que l'actine se déplace d'une extrémité à l'autre : c'est le processus de « tapis-roulant » (treadmilling).

Des études *in vitro* ont montré que le monomère d'actine incorporé à l'extrémité barbelée hydrolyse son ATP et libère un phosphate inorganique (Pi) dans le milieu cellulaire (Carlier et al., 2003). Le long du filament, entre l'extrémité (+) et l'extrémité (-), chaque monomère passe par trois états différents : l'actine-ATP fixée à l'extrémité (+), l'actine-ADP-Pi (forme transitoire) et l'actine-ADP qui s'accumule à l'extrémité (-) avant d'être dissociée du filament (Nicholson-Dykstra et al., 2005).



**Figure 2 : Assemblage et cycle de l'actine.**

Les filaments d'actine sont polarisés avec une extrémité barbelée où la croissance est rapide et une extrémité pointue où la croissance est lente. L'ATP s'associe aux monomères d'actine qui vont préférentiellement s'ajouter au filament d'actine au niveau de l'extrémité barbelée. L'hydrolyse de l'ATP associée à une sous-unité d'actine débute avec cette association. Après l'hydrolyse de l'ATP, ADP et phosphate inorganique (Pi) restent associés à l'actine puis le phosphate est libéré et seul l'ADP reste associé à l'actine.

A l'état d'équilibre, des sous-unités d'actine associées à de l'ADP se séparent de l'extrémité pointue renouvelant le stock. Peu après leur dissociation de l'extrémité pointue, les monomères d'actine échangent rapidement leur ADP contre de l'ATP, recréant ainsi un stock de monomères d'actine G activés capable de venir s'associer à l'extrémité barbelée.

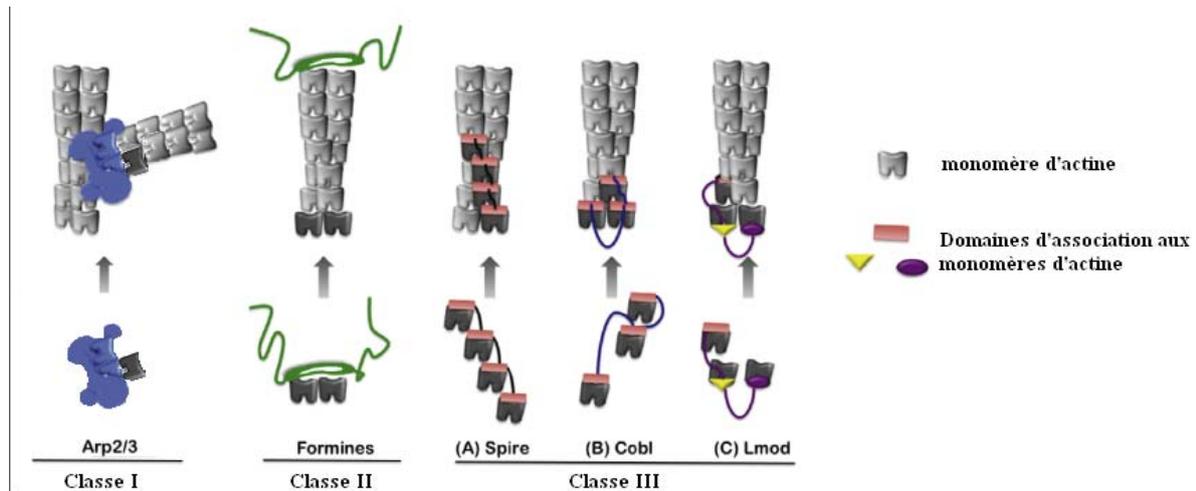
Adaptée de (Moseley and Goode, 2006).

## C. Nucléation de la polymérisation de l'actine.

Le cytosquelette d'actine assure de nombreuses fonctions biologiques et cela nécessite qu'il soit finement régulé. En effet, les signaux intracellulaires initiant la formation des filaments d'actine doivent permettre le recrutement de l'actine et sa polymérisation au niveau de sites particuliers de la cellule à des moments précis. Chacune des étapes de la polymérisation (la fixation du cation divalent ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) et de l'ATP à l'actine G, la nucléation et l'élongation) implique des protéines qui, tout comme le cytosquelette d'actine, peuvent être la cible de régulations. Nous nous intéresserons ici aux mécanismes de régulation de l'étape de nucléation. Cette étape est limitante en raison de l'instabilité des dimères et trimères d'actine.

### 1. Les Nucléateurs.

Un nucléateur est un facteur favorisant l'initiation de la polymérisation d'un filament d'actine et ce, pour différentes structures. A ce jour, trois grands systèmes de nucléation sont connus (figure 3). Le premier identifié est le complexe Arp2/3 : celui-ci mime un dimère d'actine et initie préférentiellement la polymérisation latérale d'un nouveau filament d'actine à partir d'un filament existant (Goley and Welch, 2006; Pollard, 2007). Le second identifié est le groupe des formines, qui initient la formation de filaments d'actine linéaire *in vitro* et permet, *in vivo*, l'assemblage de certaines structures telles que les fibres de stress, les câbles observés chez la levure ou l'anneau de cytokinèse (Faix and Grosse, 2006; Goode and Eck, 2007). Le troisième, récemment identifié, regroupe les protéines Spire (Quinlan et al., 2005), Cordon bleu (Cobl) (Ahuja et al., 2007) et Leiomodin (Lmod) (Chereau et al., 2008). Ces trois protéines possèdent des domaines capables de lier l'actine G et de former un noyau de nucléation. Dans le cadre de ma thèse, je m'intéresserai plus particulièrement aux protéines affectant la polymérisation dépendante du complexe Arp2/3.



**Figure 3 : Les trois classes de nucléateurs.**

Classe I : Arp2/3 s'associe à un monomère d'actine et mime un trimère d'actine.

Classe II : Les formines permettent la polymérisation de l'actine en stabilisant les dimères ou trimères d'actine formés spontanément. Les formines restent associées à l'extrémité barbelée.

Class III : Spire, Cobl, et Lmod contiennent des domaines leur permettant de générer un noyau d'actine.

Adaptée de (Chesarone and Goode, 2009).

## 2. Le complexe Arp2/3.

Le complexe Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3) est très conservé chez les eucaryotes. Il est constitué de sept sous-unités, deux de ces sous-unités étant toujours appelées Arp2 et Arp3, tandis que les noms des cinq autres varient en fonction de l'espèce (Tableau 1) (Mullins et al., 1997; Welch et al., 1997b; Winter et al., 1997).

Nom Standard	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Arp2	Arp2	Arp2
Arp3	Arp3, Arp3B*	Arp3
ARPC1A,B	p41-Arc, Sop2h*	Arc40
ARPC2	p34-Arc	Arc35
ARPC3	p21-Arc	Arc18
ARPC4	p20-Arc	Arc19
ARPC5	p16-Arc	Arc15

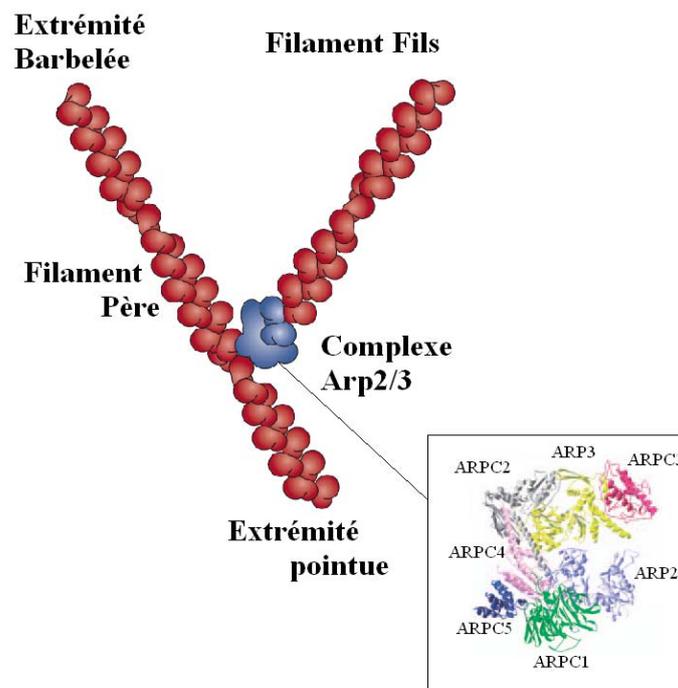
**Tableau 1 : Nomenclature des protéines du complexe Arp2/3.**

Le tableau indique le nom standardisé de chaque sous-unité du complexe Arp2/3, suivi de l'ancien nom correspondant chez l'humain et la levure *S. cerevisiae*.

\* représente les paralogues de ces sous-unités.

Adapté de (Higgs and Pollard, 2001a).

Les études menées chez *S. cerevisiae* ont montré que le complexe Arp2/3 est nécessaire à la mobilité et à l'intégrité des taches corticales d'actine (Winter et al., 1997) ainsi qu'à l'endocytose (Moreau et al., 1997). Par ailleurs, il a été mis en évidence que ce complexe est suffisant pour former la queue d'actine générant la motilité du pathogène *Listeria monocytogenes* (Welch et al., 1997a). Enfin, il a été montré que la présence du complexe Arp2/3 dans son intégralité est cruciale pour la survie cellulaire : la délétion d'un des gènes codant pour une sous-unité du complexe est létale tant chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Moreau et al., 1996) et *Schizosaccharomyces pombe* (Balasubramanian et al., 1996; McCollum et al., 1996), que chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Insall et al., 2001) ou dans les cellules humaines (Harborth et al., 2001).



**Figure 4 : Structure et fonction du complexe Arp2/3.**

Le complexe Arp2/3 (En bas à droite : structure du complexe Arp2/3 de bovin obtenu à partir d'un cristal ; Protein Data Bank code 1A8K) s'associe à un filament existant et change alors de conformation.

Le rapprochement de Arp2 et Arp3 mime l'extrémité barbelée (+) permettant la formation un nouveau filament. Le nouveau filament subit alors l'élongation en conservant un angle de 70° avec le filament existant.

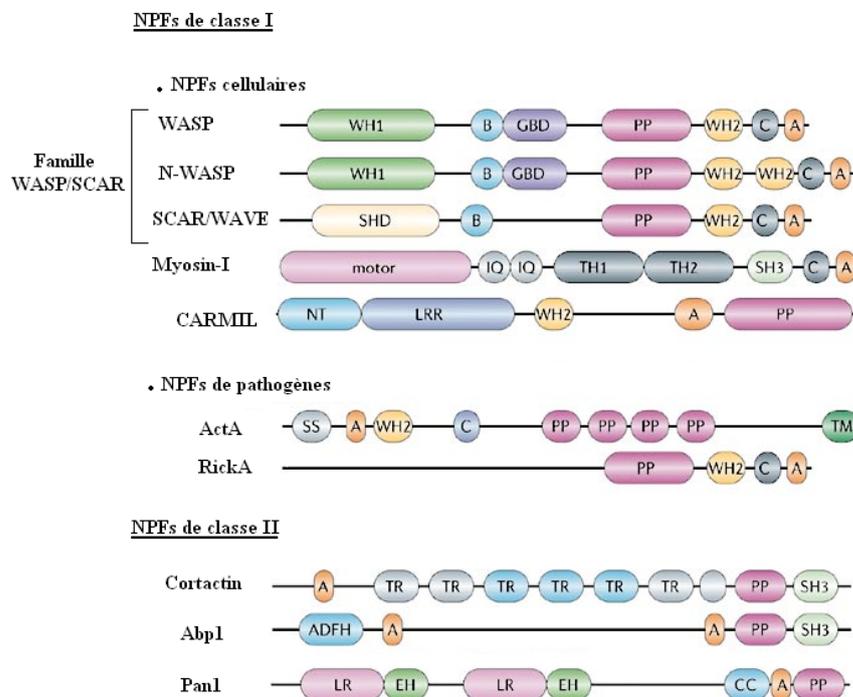
Adaptée de (Goley and Welch, 2006).

Le complexe Arp2/3 permet d'initier la polymérisation d'un nouveau filament d'actine en réponse à un signal interne ou externe (Mullins et al., 1997). L'initiation de la polymérisation par le complexe Arp2/3 conduit à la formation d'un réseau de filaments d'actine branchés en « Y » avec un angle de 70° (Mullins et al., 1998). Cette fonction explique l'observation en microscopie électronique du réseau d'actine présentant une organisation sous formes de branches, aussi nommé « réseau dendritique ».

Les protéines Arp2 et Arp3 possèdent une structure proche de celle d'un monomère d'actine et présentent 45% d'identité de séquence avec l'actine (Poch and Winsor, 1997). Le complexe Arp2/3 s'associe à un filament d'actine. Afin d'initier la polymérisation de l'actine, les protéines Arp2 et Arp3 placées côte à côte au sein du complexe miment l'extrémité (+) d'un dimère d'actine : un monomère d'actine peut alors venir s'associer à cette pseudo-extrémité (+) (figure 4). Le complexe trimérique ainsi formé par l'actine, Arp2 et Arp3, toujours associées aux autres protéines du complexe, équivaut à un noyau de polymérisation à partir duquel va pouvoir se dérouler l'élongation du nouveau filament. Ce processus permet de franchir l'étape cinétique non favorable de dimérisation de l'actine (Goley and Welch, 2006). La présence du complexe Arp2/3 à l'extrémité (-) bloque la dépolymérisation tandis que l'extrémité (+) peut croître.

L'activité du complexe Arp2/3 est régulée par plusieurs facteurs internes et externes. Ainsi les protéines de coiffe sont en compétition avec les protéines Arp2 et Arp3 et réduisent la capacité de ces dernières à promouvoir la nucléation de l'actine (Falet et al., 2002). L'ATP joue également un rôle important ; il doit être associé aux sous-unités Arp2 et Arp3 pour que le complexe puisse initier la nucléation (Dayel et al., 2001) et le processus d'hydrolyse est nécessaire pour le détachement des filaments (Martin et al., 2006).

L'activité de Arp2/3 est régulée positivement par des facteurs promouvant la nucléation appelés NPFs (Nucleation Promoting Factors). Ces protéines contiennent des domaines interagissant directement avec Arp2/3. Les NPFs sont séparés en deux classes (Figure 5). L'activation du complexe Arp2/3 par les protéines de classe I nécessite la fixation d'un monomère d'actine G au niveau de leur domaine WH2 (WASP Homology Domain 2) et du complexe Arp2/3 au niveau de leurs régions C et A. L'activation du complexe Arp2/3 par les NPFs de classe II nécessite la fixation du complexe Arp2/3 dans la région A et de l'actine F dans une région spécifique pour chaque NPF de classe II. Les autres régions des NPFs s'associent à des molécules de signalisation et à d'autres régulateurs du cytosquelette d'actine (Goley and Welch, 2006).



**Figure 5 : Les facteurs promouvant la nucléation et leurs domaines.**

Abp1 : Actin binding protein 1

CARMIL : Capping protein ARp2/3 and Myosin I Linker

SCAR: Supressor of Cyclic AMP Repressor

WASP : Wiskott-Aldrich Syndrom Protein

WAVE : Wasp-family VEerprolin-homologous protein

A : Acidic domain

B : Basic domain

CC : Coiled-coil

GBD : GTPase Binding Domain

LR : Long Repeat

NT : N-Terminal

SHD : Scar-Homology Domain

SS : Signal Sequence

TM : Trans Membrane

WH : WASP-Homology

ADFH : Actin-Depolymerizing-Factor-Homology

C : Central region

EH : Eps15 Homology

IQ : site de fixation de la calmoduline

LRR : Leu Rich Repeat

PP : Poly-Proline

SH3 : Src-Homology-3

TH : Tail Homology

TR : Tandem Repeat

Parmi les NPFs, se trouvent des protéines très différentes comme la myosine de type I, dont on retrouve différents homologues chez les champignons et les levures (Lee et al., 2000) ou la cortactine (chez les mammifères), qui a la capacité de stabiliser les filaments néosynthétisés par Arp2/3 (Weaver et al., 2001). Les bactéries pathogènes possèdent également des NPFs leur permettant de détourner la machinerie de l'hôte à leur profit : ainsi *Listeria monocytogenes* possède la protéine ActA qui est requise pour l'infection des cellules humaines (Welch et al., 1998). Cependant, les NPFs les mieux caractérisés, qui jouent un rôle important dans la régulation du complexe Arp2/3, sont les protéines de la famille WASP/SCAR (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein/Supressor of Cyclic AMP Repressor) (Millard et al., 2004).

Les NPFs de classe I fixent le complexe Arp2/3 au niveau des régions C et A et un monomère d'actine G directement au niveau du domaine WH2 ou indirectement (pour la myosine-I).

Les NPFs de classe II fixent le complexe Arp2/3 *via* la région A et l'actine F *via* des régions spécifiques à chacun des NPFs : la région centrale TR de la cortactine, le domaine ADFH de Abp1 ou le coiled-coil de Pan1. Les autres régions des NPFs s'associent à des molécules de signalisation et à d'autres régulateurs du cytosquelette d'actine.

Adaptée de (Goley and Welch, 2006).

### 3. Les protéines de la famille WASP/SCAR.

#### a. Les membres de la famille WASP/SCAR.

Le premier membre de cette famille de protéines identifié est la protéine WASP. Elle a été découverte lors de l'étude du syndrome de Wiskott-Aldrich, une maladie génétique liée au chromosome X. Les patients souffrant de ce syndrome présentent des problèmes immunitaires de coagulation dus à un défaut du cytosquelette d'actine dans les globules blancs et les plaquettes (Imai et al., 2003). Chez ces patients, le gène codant pour la protéine WASP est muté (Derry et al., 1994).

La protéine WASP est exclusivement présente dans les cellules hématopoïétiques mais un paralogue de cette protéine a été découverte : il s'agit de la protéine N-WASP (Neural WASP), ubiquitaire (Miki et al., 1996). La protéine SCAR a été identifiée chez *Dictyostelium discoideum* comme une protéine apparentée à WASP (Bear et al., 1998). Il existe trois paralogues de SCAR chez les mammifères et ces paralogues, également nommés WAVE (WASP-familly Verprolin homologous) (Miki et al., 1998; Suetsugu et al., 1999), présentent des similarités avec la protéine WASP, en particulier à l'extrémité C-terminale.

Organisme	WASP	SCAR
<i>S. cerevisiae</i>	Las17 (Bee1)	–
<i>S. pombe</i>	Wsp1	–
<i>A. thaliana</i>	–	AtSCAR1-4
<i>D. discoideum</i>	WasA	SCAR
<i>C. elegans</i>	WASP	SCAR/WAVE
<i>D. melanogaster</i>	WASP	SCAR
<i>M. musculus</i>	WASP homologous, WASP-like	WASP family1-3
<i>H. sapiens</i>	WASP, N-WASP	WAVE-1-3

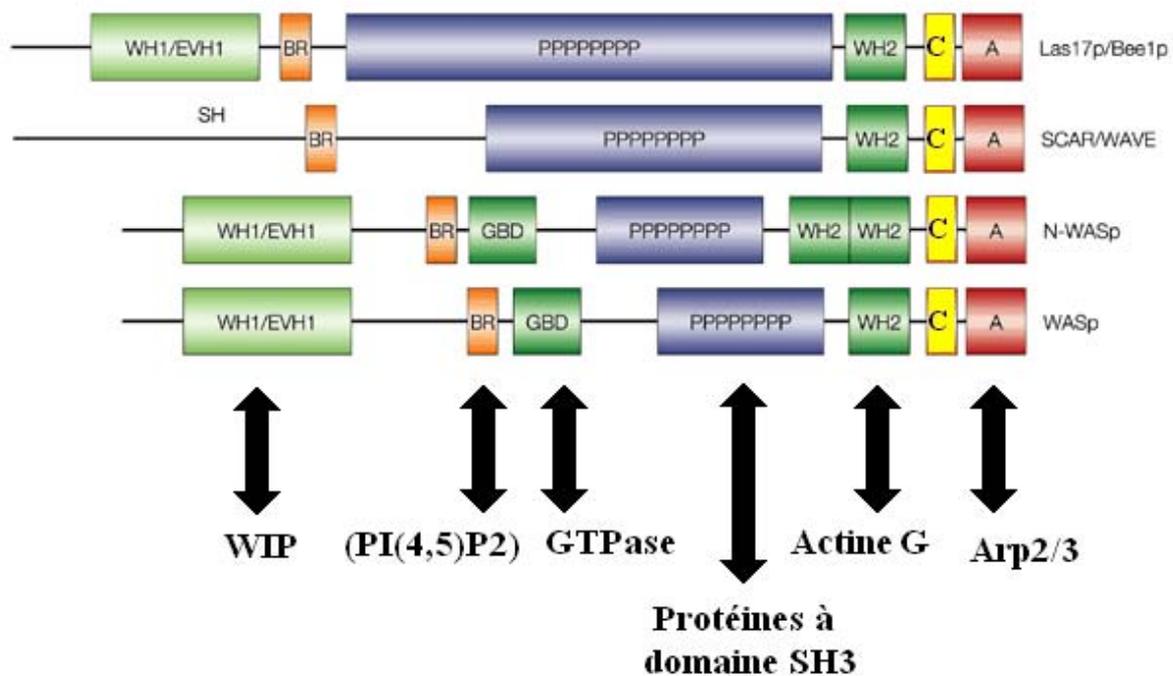
**Tableau 2 : Les protéines WASP et SCAR dans différents organismes.**

De multiples paralogues de WASP et/ou de SCAR/WAVE ont été découverts dans de nombreux organismes (Tableau 2). Le nombre et la diversité des paralogues varient d'un organisme à l'autre. Les invertébrés tels que *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* possèdent plusieurs paralogues de WASP et de SCAR/WAVE (Ben-Yaacov et al., 2001; Sawa et al., 2003; Zallen et al., 2002). Les plantes possèdent uniquement des paralogues (quatre chez *Arabidopsis Thaliana*) plus proches de SCAR/WAVE que de WASP (Brembu et al., 2004; Frank et al., 2004) alors que les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* ne possèdent qu'un seul membre de la famille qui s'avère être plus

proche de WASP que de SCAR/WAVE : Wsp1 chez *S. pombe* et Las17 (Bee1) chez *S. cerevisiae* (Lee et al., 2000; Li, 1997).

b. Structure et régulation.

Toutes les protéines de la famille WASP/SCAR présentent une organisation générale similaire (Figure 6). Elles se composent d'un module VCA (WH2 +C +A) à l'extrémité C-terminale qui lie les monomères d'actine et les met en contact avec le complexe Arp2/3, une région riche en proline au centre et une région N-terminale régulatrice qui diffère selon les protéines (Kim et al., 2000; Rohatgi et al., 2000). La régulation des protéines de la famille WASP/SCAR peut se faire soit par une auto-inhibition, dans laquelle les extrémités C- et N-terminales s'associent directement pour inhiber l'activité NPF de la protéine, soit par une trans-inhibition *via* des interactions avec d'autres protéines (Bompard and Caron, 2004).



**Figure 6 : Les domaines des protéines de la famille WASP/SCAR.**

WH1/EVH1 : WASP Homology domain 1/ ENA/VASP-homology 1 domains

BR : Basic region

GBD : GTPase-binding domain

PPP : Domaine riche en proline

WH2 : WASP Homology domain 2

C : Connector

A : Acidic Region

SH : SCAR Homology domain

Adaptée de (Thrasher, 2002).

La région C-terminale est une région très conservée. Le module VCA est constitué d'un domaine WH2 (pour WASP Homology 2), qui lie l'actine G, ainsi que d'un domaine C (Cofilin homology domain ou Connector) et d'une région A (Acidic Region) sur lesquels se fixe le complexe Arp2/3 (Marchand et al., 2001; Panchal et al., 2003). Les domaines C et A permettent les changements de conformations d'Arp2/3 nécessaires à la nucléation (Goley et al., 2004; Rodal et al., 2005b). Il a par ailleurs été montré que la phosphorylation des tyrosines Y483 et Y484, se trouvant dans ce module VCA, entraîne une augmentation de l'activité basale de WASP (Cory et al., 2003; Torres and Rosen, 2003).

Au centre de la protéine, il existe un autre motif très conservé chez l'ensemble des membres de la famille WASP/SCAR : le domaine polyproline. Il s'agit d'une région capable d'interagir avec les domaines SH3 (Src Homology 3) de nombreuses protéines (Higgs and Pollard, 2001a; Takenawa and Miki, 2001; Tong et al., 2002). Certaines de ces protéines peuvent agir, en synergie avec d'autres activateurs, comme régulateurs de l'activité des protéines WASP et N-WASP (Takenawa and Miki, 2001). Ainsi, Grb2 en se liant à N-WASP, augmente l'effet activateur de Cdc42 (Carlier et al., 2000).

Les régions N-terminales divergent d'une protéine à l'autre et cela permet de faire la distinction entre les paralogues de WASP et de SCAR/WAVE.

- Le domaine SHD (Scar Homology Domain) est présent chez les homologues de SCAR : il permet de fixer un complexe d'inactivation constitué des protéines Pir121, Nap125, Hspc300, Abi-1 et Ckd5 (Sloane and Vartanian, 2007).
- Le domaine WH1 (WASP Homology 1) est présent chez les homologues de WASP : il s'agit d'un domaine qui fixe les séquences riches en proline de certaines protéines telles WIP (Wiskott-Aldrich Interacting Protein) ou Vrp1 (Verproline) chez *S. cerevisiae*. WIP et WASP forment ainsi un complexe stable inhibant l'activité de WASP (Ho et al., 2004; Thanabalu and Munn, 2001). C'est dans ce domaine WH1 que se trouvent beaucoup de mutations responsables du syndrome de Wiskott-Aldrich (Imai et al., 2003).
- Le domaine BR (Basic Region) est présent aussi bien chez les homologues de WASP que chez ceux de SCAR. Il est capable de lier le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) chez WASP et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) chez WAVE 2. Ces deux phosphatidylinositols, enrichis à la membrane plasmique, sont des activateurs de protéines auxquelles ils s'associent (Brazil et al., 2004; Higgs and Pollard, 2000; Oikawa et al., 2004; Rohatgi et al., 2000).

- Le domaine GBD (GTPase Binding Domain) présent chez WASP et N-WASP permet l'interaction avec les GTPases de type Rho (Kolluri et al., 1996; Miki et al., 1998; Symons et al., 1996).

#### **4. La famille des Rho GTPases.**

Les GTPases de type Rho sont présentes chez l'ensemble des eucaryotes et l'on retrouve une vingtaine de protéines différentes chez les mammifères (Wennerberg and Der, 2004). Ces protéines se distinguent des autres membres de la superfamille des GTPases Ras par la présence d'un domaine supplémentaire impliqué dans la liaison aux effecteurs et aux régulateurs (Hofken and Schiebel, 2002; Ivey and Hoffman, 2005; Wang et al., 2006; Wild et al., 2004). Les GTPases de type Rho sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tel que la régulation du cytosquelette d'actine mais aussi la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhérence, la motilité, la transcription et le trafic vésiculaire (Bustelo et al., 2007; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005). Les GTPases fixent le GTP qu'elles hydrolysent en GDP, oscillant ainsi entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP, en association avec le facteur régulateur inhibiteur RhoGDI (Rho GDP Dissociation Inhibitor) (Del Pozo et al., 2002). Sous sa forme active, la GTPase acquiert une conformation qui lui permet de lier un ensemble d'effecteurs, responsables directement ou indirectement des effets cellulaires. Les protéines Rho possèdent des activités intrinsèques de chargement et d'hydrolyse du GTP relativement faibles et la présence de facteurs cellulaires régulateurs est donc nécessaire. L'activation est ainsi catalysée par les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), qui permettent le remplacement du GDP par le GTP, plus abondant dans la cellule, tandis que l'inactivation est catalysée par les GAPs (GTPase Activating Proteins) qui accélèrent l'activité GTPase intrinsèque et favorisent le retour à la forme liée au GDP (Moon and Zheng, 2003; Schmidt and Hall, 2002). Les GTPases Rho semblent provoquer un changement de conformation, qui démasque le site catalytique de leur cible, et activent ainsi leurs effecteurs (Buchwald et al., 2001). Concernant le cytosquelette d'actine, les GTPases Rho permettent l'activation indirecte du complexe Arp2/3 en s'associant aux domaines GBD des protéines de la famille WASP (figure 6). Cette association permet de lever aussi bien l'auto-inhibition que la trans-inhibition. Cdc42, en se liant au GBD de N-WASP, permet de lever l'auto-inhibition (Rohatgi et al., 2000) et Rac, en se fixant à un des composants du complexe trans-inhibiteur de WAVE1, permet de lever la trans-inhibition (Eden et al., 2002). Cdc42 permet également la dissociation du complexe WASP-WIP en présence de Toca-1 (transducer of Cdc42-dependant actin assembly) (Ho et al., 2004).

## D. Le cytosquelette d'actine chez la levure.

### 1. La levure *S. cerevisiae*.

La levure *S. cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote capable de respirer et fermenter. Elle est utilisée notamment pour la fabrication du pain et de la bière. En 1996, son génome constitué de 4462 gènes répartis sur seize chromosomes, fut le premier génome eucaryote à être entièrement séquencé. On estime qu'elle partage 23% de son génome avec l'Homme (Botstein et al., 1997). Il s'agit d'un modèle précieux pour l'étude du fonctionnement d'une cellule eucaryote. Elle est un outil que l'on peut utiliser dans des approches différentes : biologie moléculaire, biologie cellulaire, biochimie et génétique.

La levure est un organisme haplodiplobiontique, c'est à dire que son cycle de vie comporte les stades haploïde ( $1n = 16$  chromosomes) et diploïde ( $2n=32$  chromosomes) (figure 7).

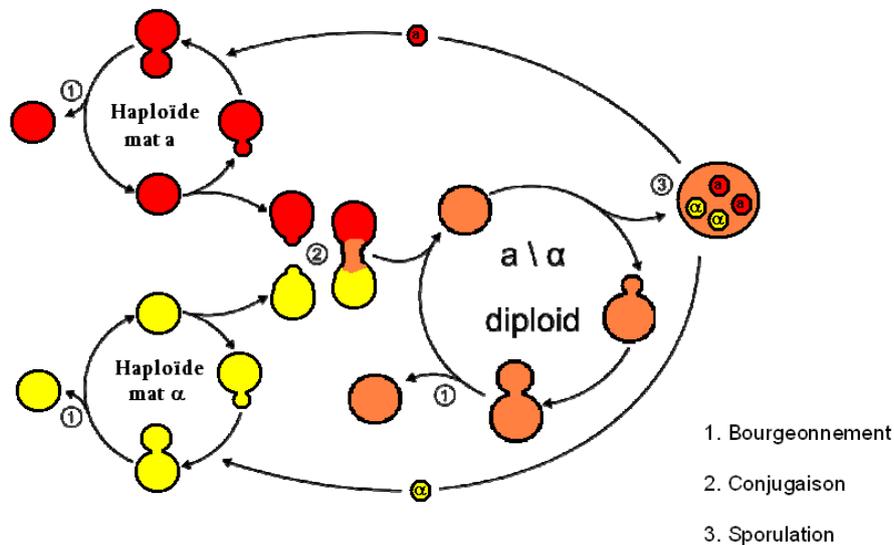


Figure 7 : Cycle de vie de la levure *S. cerevisiae*.

Dans des conditions normales, que ce soit sous forme diploïde ou haploïde, la levure se multiplie de façon végétative par bourgeonnement de la cellule mère. Le bourgeonnement correspond à une croissance cellulaire polarisée et à un partage des organites entre la cellule mère et le bourgeon. La mise en place de la polarité de la cellule, avec la formation du bourgeon, peut être divisée en plusieurs étapes (Pruyne and Bretscher, 2000). La cellule va tout d'abord "décider" de l'emplacement du site de formation du bourgeon ; ce site va ensuite être reconnu par différentes protéines nommées "protéines de la mise en place de la polarité", qui permettront le recrutement d'une machinerie d'organisation et de polymérisation de l'actine. Ce recrutement du cytosquelette d'actine assure l'acheminement des composants indispensables à la croissance du bourgeon (Pruyne and Bretscher, 2000). Dans un premier temps, cette croissance est polarisée (croissance apicale), puis s'effectue dans toutes les directions (croissance isotropique). Lorsqu'une taille critique est atteinte, la croissance du bourgeon redevient polarisée au niveau du col du bourgeon, permettant la cytokinèse et le détachement du bourgeon donnant naissance à la cellule fille. La cellule fille, issue d'une mitose, possède les mêmes caractères génétiques que la cellule mère. Le mode de bourgeonnement diffère cependant entre les haploïdes et les diploïdes. Les cellules haploïdes bourgeonnent toujours au même pôle (bourgeonnement axial) tandis que les cellules diploïdes bourgeonnent alternativement à chaque pôle de la cellule (bourgeonnement bipolaire) (Casamayor and Snyder, 2002; Chant and Herskowitz, 1991). Lorsque certaines protéines du cytosquelette d'actine sont absentes ou mutées, le processus de sélection du site de bourgeonnement devient aléatoire (Amberg et al., 1997; Chant and Herskowitz, 1991; Fujita et al., 1994).

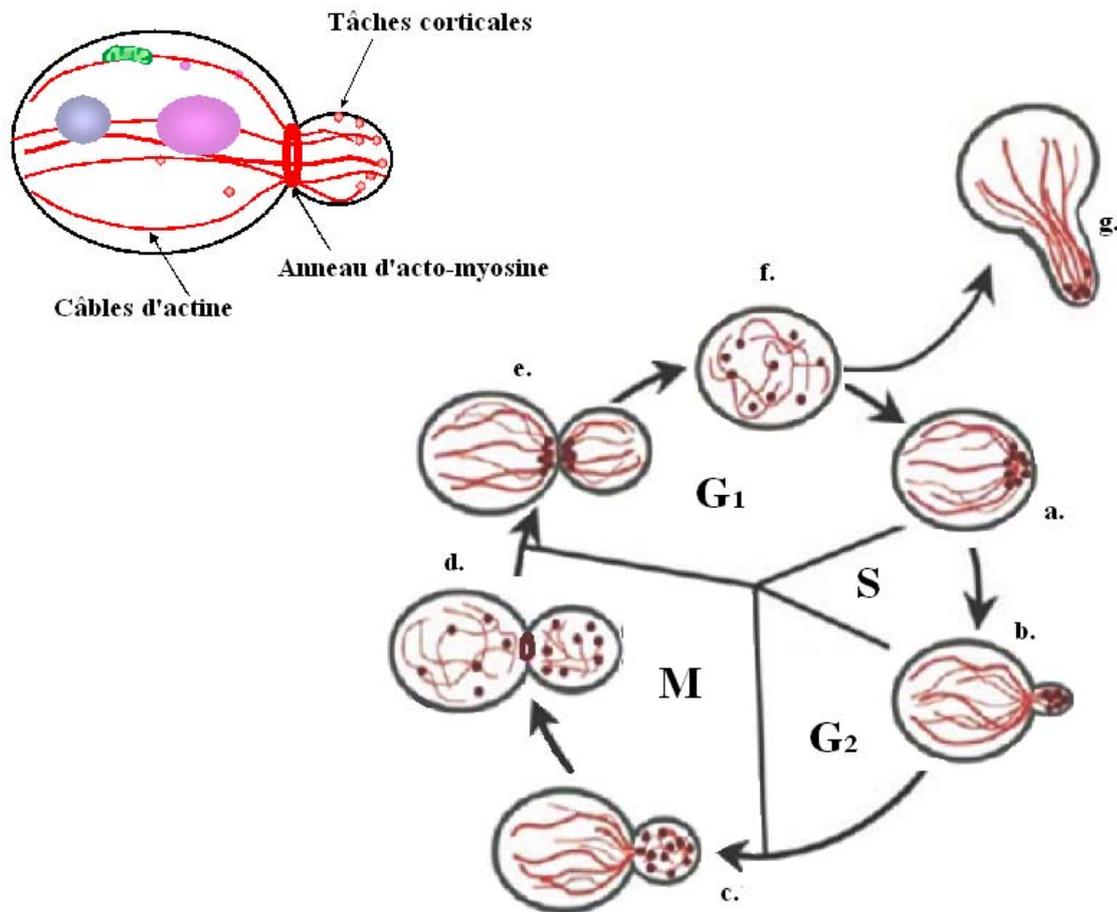
Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (dans un cas de carence en nutriments par exemple), les cellules diploïdes entrent en sporulation (méiose) et forment un asque contenant quatre spores haploïdes. Les spores sont extrêmement résistantes et permettent aux cellules de survivre en attendant le retour de meilleures conditions environnementales. Lorsque les nutriments sont de nouveau disponibles, les spores germent pour former des cellules haploïdes qui se multiplieront par bourgeonnement.

En plus de la multiplication végétative, les levures possèdent un système génique dit « sexuel ». Il existe deux signes sexuels différents, MAT $\alpha$  et MAT $\alpha$ , se caractérisant par la sécrétion de phéromones spécifiques et par la présence à la membrane cellulaire du récepteur de l'autre phéromone. Chez les cellules diploïdes les deux protéines à l'origine des phéromones forment un complexe répresseur de leurs activités. Les cellules haploïdes quant à elles ne possèdent qu'un seul signe sexuel. Lorsque deux cellules haploïdes de signes sexuels opposés sont mutuellement stimulées par les phéromones de l'autre signe sexuel, elles forment chacune une projection (« shmoo ») vers le partenaire de signe opposé et fusionnent pour donner une cellule diploïde. Ce processus s'appelle la conjugaison.

## **2. Structure et fonctions du cytosquelette d'actine chez la levure.**

### **a. Structure.**

Chez la levure il existe trois structures d'actine (Figure 8) : les câbles d'actine, l'anneau contractile d'acto-myosine et les taches corticales d'actine (Adams and Pringle, 1984). Ces trois structures sont constituées d'actine F en association avec un nombre important d'autres protéines. Ainsi, les câbles d'actine contiennent, entre autres, de la tropomyosine et de la fimbrine, les taches corticales sont associées au complexe Arp2/3 (Ayscough, 1998a; Pruyne and Bretscher, 2000) et l'anneau de cytokinèse, bien que constitué principalement d'actine F et de Myo1, contient également des septines et des formines (Bi, 2001). Les protéines associées à l'actine F sont étroitement impliquées dans l'assemblage, l'organisation et/ou la fonction des différentes structures qu'elles constituent.



**Figure 8 : Structure d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae* durant le cycle cellulaire.**

- a. Choix du site de bourgeonnement.
- b. Polarisation du cytosquelette d'actine vers le bourgeon et croissance apicale.
- c. Croissance du bourgeon de manière isotropique.
- d. Cytocinèse.
- e. Synthèse de la paroi.
- f. Croissance de la nouvelle cellule.
- g. Shmoo en formation

Adaptée de (Pruyne and Bretscher, 2000).

Les structures d'actine ont des localisations qui évoluent au cours du cycle cellulaire (Figure 8) (Kilmartin and Adams, 1984). Dans les cellules en phase G1, les taches corticales (aussi appelées patches d'actine) sont réparties dans toute la cellule et les câbles sont orientés au hasard. Une fois le site de bourgeonnement sélectionné, les taches corticales entourent le site d'émergence du bourgeon et les câbles convergent vers ce site en s'orientant parallèlement à l'axe cellule mère/bourgeon. Les câbles restent orientés parallèlement à l'axe cellule mère/bourgeon jusqu'au début de la mitose et les taches corticales restent à l'extrémité du bourgeon tant que dure la croissance apicale du bourgeon mais se redistribuent aléatoirement dans le bourgeon lors de la croissance isotropique.

En fin de phase M, les taches corticales d'actine et les câbles sont distribués aléatoirement entre la cellule mère et la cellule fille. L'anneau d'acto-myosine est visible au niveau de l'étranglement de la cellule fille : il s'assemble, se contracte puis se désassemble (Bi et al., 1998; Lippincott and Li, 1998). Suite à la cytokinèse, les taches corticales et les câbles des cellules mères et filles se repolarisent au site de division afin de permettre la synthèse de la paroi entre les deux nouvelles cellules.

Les taches corticales et les câbles d'actine sont également présents et polarisés lors d'un autre processus cellulaire. En effet, lors de la conjugaison, les taches corticales d'actine se concentrent à l'extrémité du « shmoo » et les câbles convergent vers cette extrémité. Lorsque les deux cellules haploïdes ont fusionné, le zygote formé peut bourgeonner à partir de la jonction. Les taches corticales et les câbles sont alors polarisés vers cette nouvelle cellule diploïde (Molk and Bloom, 2006; Read et al., 1992).

#### b. Fonctions.

La levure ayant l'avantage de posséder un unique homologue de l'actine (Act1) présentant un pourcentage d'identité important avec les actines de mammifères, elle a fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre les fonctions de l'actine. Une délétion du gène *ACT1* étant létale (Shortle et al., 1982), c'est avec des mutations ponctuelles thermosensibles (*act1-1* et *act1-2*) qu'ont été mises en évidence de nombreuses fonctions de l'actine. Ainsi, en étudiant ces mutants ainsi que d'autres affectant des protéines associées à l'actine, il a été montré que le cytosquelette est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels la synthèse de la paroi (Novick and Botstein, 1985), la sélection du site de bourgeonnement (Drubin et al., 1993; Lazzarino et al., 1994), la croissance polarisée (Dunn and Shortle, 1990; Novick and Botstein, 1985; Shortle et al., 1984), la cytokinèse (Palmer et al., 1992), l'endocytose (Benedetti et al., 1994; Holtzman et al., 1993; Kubler and Riezman, 1993), le transport des organites (Bretscher, 2003; Pruyne et al., 2004) ou le transport d'ARNm vers le bourgeon (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). De manière générale, on peut dire que le cytosquelette d'actine assure la polarisation de la croissance chez *S. cerevisiae*.

Chacune des trois structures d'actine F exerce des fonctions qui lui sont propres. Les câbles d'actines, assemblés par les formines, sont impliqués principalement dans le transport polarisé (vésicules, organelles et ARNm) vers le bourgeon (Bretscher, 2003; Pruyne and Bretscher, 2000; Takizawa et al., 1997). Les taches corticales d'actine sont impliquées dans l'endocytose ainsi que dans la synthèse de la paroi cellulaire (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Kubler and Riezman, 1993; Munn et al., 1995). L'anneau d'acto-myosine, localisé au col du bourgeon, assure la contraction nécessaire à la cytokinèse permettant la séparation de la cellule mère et de la cellule fille (Bi, 2001; Lippincott and Li, 1998).

### **3. L'Assemblage de l'actine dans les différentes structures.**

Le processus d'assemblage de l'actine est différent selon que l'on s'intéresse aux taches corticales ou aux autres structures d'actines. En effet des mutations affectant différentes sous-unités du complexe Arp2/3 empêchent l'assemblage des taches corticales mais n'affectent pas la formation des câbles et de l'anneau d'acto-myosine (Winter et al., 1999a).

#### **a. Câbles d'actines et anneau d'acto-myosine.**

Il a été démontré que les formines Bni1 et Bnr1 jouent un rôle important lors de l'assemblage des câbles d'actine (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002a; Yang and Pon, 2002) ainsi que dans l'assemblage de l'anneau d'acto-myosine (Tolliday et al., 2002). Bni1 et Bnr1 possèdent, dans leur extrémité C-terminale, des domaines propres à la famille des formines : FH1 et FH2 (formin homology domain 1 et 2). Le domaine FH1 contient une région riche en proline qui s'associe à la profiline, une protéine de liaison aux monomères d'actine (Moseley and Goode, 2005) tandis que le domaine FH2 permet la nucléation de l'actine (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b). Les formines sont activées par les GTPases de type Rho telle que Cdc42 (Evangelista et al., 1997).



Ces cinq NPFs ne sont cependant pas tous équivalents. En effet si leur fonction est d'activer l'assemblage de l'actine par le complexe Arp2/3, et s'ils co-localisent tous partiellement avec ce complexe, ils arrivent chacun à une étape différente dans le développement des taches corticales ce qui suggère qu'ils agissent séquentiellement et/ou à des sites différents (Kaksonen et al., 2003).

Chacun de ces NPFs est capable de lier le complexe Arp2/3 et l'actine. La liaison avec le complexe Arp2/3 est facilitée par la présence d'un domaine acide qui interagit avec les sous-unités Arp3 et Arc40 (Kelly et al., 2006; Pan et al., 2004; Weaver et al., 2002). La liaison à l'actine s'avère critique aussi bien pour Las17 que pour Pan1 ou Abp1, (Quintero-Monzon et al., 2005; Rodal et al., 2003; Toshima et al., 2005), mais Las17 est le seul NPF à lier directement l'actine G.

Pan1, NPF de classe II (Figure 5), est recruté aux taches corticales précoces, avant l'arrivée du complexe Arp2/3. Il serait recruté grâce à son interaction avec End3, Sla1 et/ou les adaptateurs de la clathrine (Tang et al., 1997; Tang et al., 2000; Wendland and Emr, 1998).

Abp1, également NPF de classe II, présente des similitude avec la cortactine de mammifères (Urano et al., 2001; Weaver et al., 2001). Son activité nécessite la présence de ses deux motifs acides ainsi que son domaine ADFH (ADF/cofilin homology) (Goode et al., 2001a). Ces propriétés permettent à Abp1 de recruter le complexe Arp2/3 sur le côté de filaments préexistants avec une modeste activité de NPF.

Les NPFs de classe I Myo3 et Myo5 sont des myosines redondantes de type I. Comme la Myosine I, elles ne possèdent pas de domaine WH2 et ne recrutent pas directement l'actine mais interagissent *via* leur domaine SH3 avec la protéine Vrp1 qui se lie à l'actine G (Anderson et al., 1998; Evangelista et al., 2000; Geli et al., 2000). Il est possible de séparer l'activité NPF et l'activité motrice de Myo5, cette dernière étant nécessaire pour induire les mouvements du manteau endocytique vers l'intérieur de la cellule (Sun et al., 2006).

Las17, également NPF de classe I, a été purifié et il a été montré *in vitro* qu'il peut promouvoir l'assemblage de l'actine, *via* le complexe Arp2/3, de manière constitutive (Rodal et al., 2003; Soulard et al., 2002). Il n'y a donc pas de mécanisme d'auto-inhibition et son

activité est contrôlée par une trans-inhibition (ce en quoi cette protéine s'avère être plus proche de la protéine SCAR/WAVE que de la protéine WASP). Deux protéines possédant des domaines SH3 -Sla1 et Bbc1- ont été purifiées et il a été montré qu'elles coopèrent pour inhiber l'activité de Las17 (Rodal et al., 2003). Chez les mammifères, la GTPase de type Rho Rac1 permet la levée de la trans-inhibition en se fixant à un des composants du complexe trans-inhibiteur de WAVE1 (Eden et al., 2002). Cependant il n'existe pas d'homologue de Rac1 chez la levure et Las17, contrairement aux protéines WASP et N-WASP, ne possède pas de domaine GBD et n'est pas capable de lier les GTPases Rho de levure:cdc42 et Rho1 à 5 (Li, 1997). La protéine Bzz1 pourrait interagir avec Sla1 afin de lever l'inhibition de Las17 (Sun et al., 2006), permettant alors de recruter le complexe Arp2/3. Malgré la caractérisation des protéines Sla1, Bbc1 et Bzz1, les mécanismes permettant l'inhibition et l'activation de la protéine Las17 ne sont pas encore bien établis et pourraient faire intervenir d'autres protéines interagissant avec Las17 (Goode and Rodal, 2001b). Parmi les protéines interagissant avec Las17 se trouvent Vrp1, Bzz1, Rvs167, Lsb1, Lsb2 ou encore Pin3/Lsb3 et Ysc84/Lsb4 (Madania et al., 1999; Tong et al., 2002).



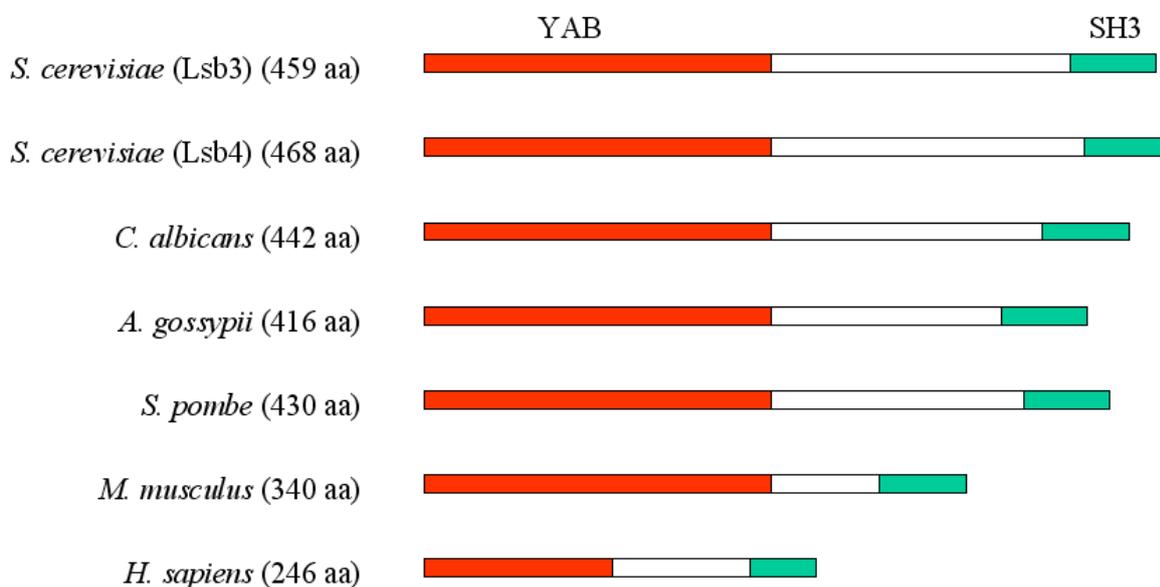
## II. Les protéines Lsb3/Lsb4.

### A. Découverte de Lsb3 et Lsb4 lors d'un crible double-hybride.

Lsb3 et Lsb4 (Las Seventeen Binding protein 3 et 4) sont des protéines d'environ 50kDa, constituées respectivement de 459 et 468 acides aminés (figure 10). Elles ont été nommées ainsi suite à un crible double hybride réalisé avec la protéine Las17 comme appât. L'interaction de Lsb3 ou Lsb4 avec Las17 se fait *via* le domaine SH3, situé à leur extrémité C-terminale, qui se lie au domaine polyproline de Las17 (Madania et al., 1999; Tong et al., 2002). La protéine Lsb4 est également connue sous le nom de Ysc84 et semble requise lors de la sporulation (Rocco et al., 1993). Lsb3, pour sa part, est de fonction inconnue. Un alignement des protéines Lsb3 et Lsb4 révèle une forte homologie entre leurs séquences : 62% d'identité et 70% de similarité entre les séquences en acide aminés des deux protéines. Cette homologie est encore plus prononcée pour les domaines présents aux extrémités. En effet, entre les acides aminés 1 et 210, il y a 90% d'identité et 97% de similarité tandis que les 55 derniers acides aminés présentent 82% d'identité et 91% de similarité. Il est par ailleurs intéressant de noter que les deux gènes codant pour ces protéines contiennent un intron, ce qui est relativement rare chez *S. cerevisiae*. Dans le cas de Lsb3 et Lsb4, les deux introns, bien que de tailles différentes, débutent au même niveau de la séquence nucléotidique (acide nucléique numéro 48) indiquant que cet intron était présent chez l'ancêtre des deux gènes de *S. cerevisiae* avant la duplication du génome (Kellis et al., 2004). Cependant on ne sait pas si ces introns jouent un rôle régulateur dans l'expression des deux gènes.

## B. Les homologues de Lsb3 et Lsb4.

Des analyses de séquences à l'aide du logiciel BLAST ont permis de montrer qu'il existe des homologues de Lsb3 et de Lsb4 chez d'autres levures, la souris et l'homme (Dewar et al., 2002) (figure 10). Le domaine SH3 (Src Homology domain 3) présent en C-terminal et le domaine YAB (Ysc84 actin binding domain) à l'extrémité N-terminale sont bien conservés pour l'ensemble des homologues des différentes espèces.



**Figure 10 : Lsb3 et ses homologues dans différents organismes.**

Les homologues de Lsb3 présentent un pourcentage d'identité en acide aminé important. Cette correspondance de séquence est encore plus importante pour les domaines DUF500 (ou YAB) en rouge et SH3 en vert.

Le domaine SH3, présent à l'extrémité C-terminale de tous les homologues de Lsb3 et Lsb4, est présent chez de nombreuses protéines (63 chez *D. melanogaster*, 55 chez *C. elegans*, 25 chez *S. cerevisiae*) (Rubin et al., 2000). Ces domaines ont d'abord été identifiés comme un motif conservé dans la partie non catalytique de plusieurs tyrosine kinases cytoplasmiques (Src) (Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988). Ces domaines s'associent à des régions riches en proline (PXXP) situées à la surface de protéines cibles (Ren et al., 1993), chaque proline se fixant dans une poche hydrophobe du domaine SH3 auquel elle s'associe *via* un résidu aliphatique (Kay et al., 2000; Zarrinpar and Lim, 2000). Les domaines SH3 jouent un rôle dans différents processus, tels l'activation de Ras impliquée dans la prolifération cellulaire (McCormick, 1993) ou le recrutement de la kinase Pak par l'adaptateur Dock chez *D. melanogaster* (Hing et al., 1999).

Le domaine N-terminal s'appelle YAB et a d'abord été identifié par bioinformatique sous le nom de DUF 500 (Domain of Unknown Function 500). Il a récemment été montré, par des travaux portant sur Lsb4, qu'il permet d'interagir avec l'actine (Robertson et al., 2009). Il s'agit d'un domaine de 184 acides aminés que l'on retrouve chez les plantes, les vertébrés, les champignons et même des procaryotes (figure 11), mais il n'a pas été retrouvé chez les invertébrés. Chez les vertébrés et les champignons il se trouve en N-terminal et est associé à un domaine SH3 en C-terminal (Lsb3 et ses homologues). Par contre chez les plantes, le domaine YAB se trouve en C-terminal et est associé à un domaine FYVE (Fab1-YOPB-Vps27-EEA1) qui interagit avec le PI(3)P mais n'est pas associé à un domaine SH3 (Burd and Emr, 1998; Stenmark et al., 2002). Le domaine YAB est également présent en tant que "protéine", sans autre domaine, chez certains procaryotes où l'on présume qu'il pourrait être associé à MreB. La protéine MreB contient des motifs conservés chez l'actine (Bork et al., 1992). Elle est impliquée dans la mise en place et la maintenance de la polarité cellulaire (Gitai et al., 2004; Nilsen et al., 2005) et est capable de former des filaments contrôlant la morphologie de la cellule (Jones et al., 2001). Il semble donc que le domaine YAB soit capable de s'associer, chez les procaryotes, avec une protéine présentant des similarités, structurelles et fonctionnelles, avec l'actine des eucaryotes (Graumann, 2007; van den Ent et al., 2001).

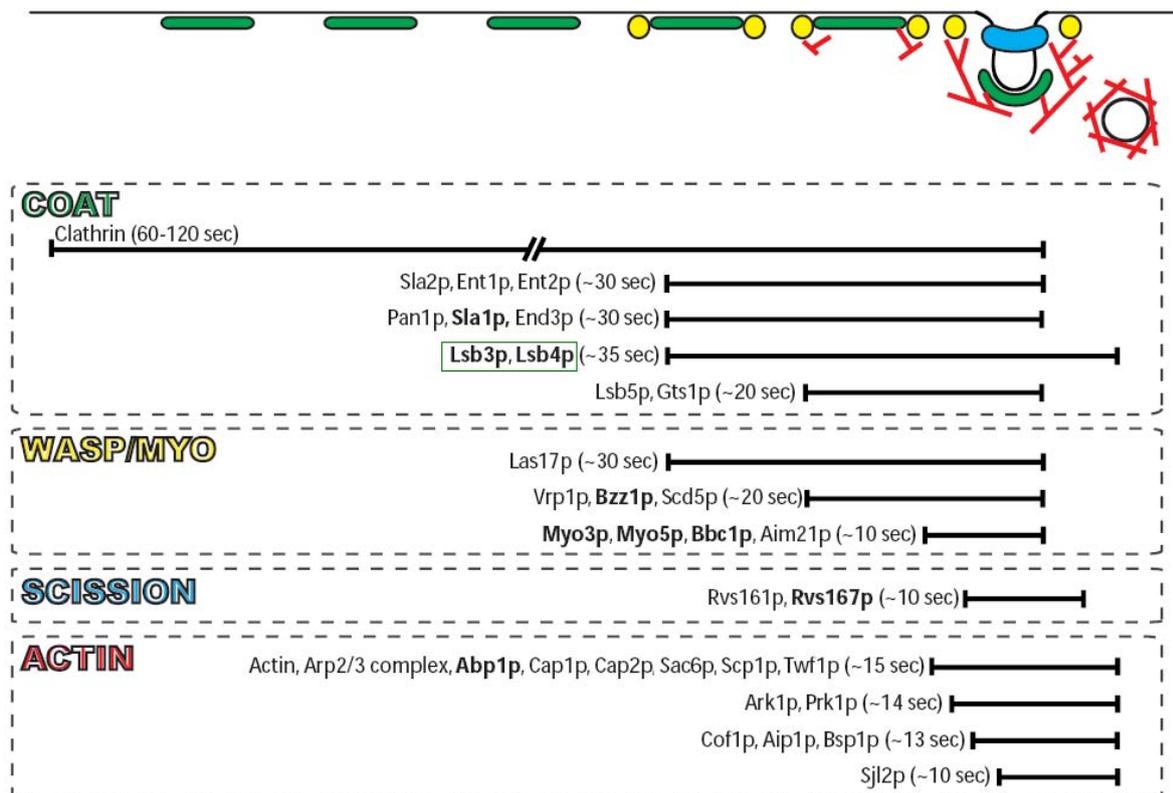


### C. Rôle de Lsb3 et Lsb4 au niveau des patchs corticaux d'actine.

Les deux protéines Lsb3 et Lsb4 interagissent *via* leurs domaines SH3 avec Las17 (Madania et al., 1999) et Sla1 (Dewar et al., 2002), deux protéines de l'assemblage du cytosquelette d'actine des taches corticales. Des travaux récents ont montré que Lsb4 interagit également, en présence de Las17, avec l'actine *via* son domaine YAB et permet d'induire l'assemblage des filaments d'actine en câbles en absence du complexe Arp2/3. (Robertson et al., 2009).

L'analyse de la localisation des protéines Lsb3 et Lsb4 fusionnées à la GFP (protéine fluorescente de la méduse *Aequorea Victoria*) a permis de constater que Lsb3 et Lsb4 (lorsqu'elles sont surproduites) sont associées aux taches corticales d'actine (Dewar et al., 2002). Malgré cette association, il a été rapporté que ni Lsb3 ni Lsb4 ne participent de façon visible à l'endocytose puisqu'aucun phénotype d'endocytose du Lucifer Yellow (un colorant fluorescent internalisé par endocytose) n'a été observé dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* ou *lsb3Δ lsb4Δ* (Dewar et al., 2002). Par contre, il a été montré que le double mutant *lsb4Δ lsb5Δ* présente des défauts au niveau du cytosquelette d'actine et au niveau de l'endocytose du Lucifer Yellow (Dewar et al., 2002). Lsb5 est une protéine de fonction inconnue qui a été identifiée comme interagissant avec Las17 lors du même crible qui a permis d'identifier Lsb3 et Lsb4 (Madania et al., 1999). Il a récemment été proposé que Lsb5 est recrutée tardivement au niveau des sites d'endocytose et pourrait être impliquée dans le démantèlement de la machinerie d'endocytose (Toret et al., 2008).

Cependant des études récentes cherchant à établir un modèle d'assemblage des protéines aux vésicules d'endocytose (Tonikian et al., 2009) (Figure 12) ou portant sur Lsb4 (Robertson et al., 2009) ont établi que Lsb3 est une protéine présente au niveau des taches corticales d'actine tout au long du processus d'endocytose. D'après l'étude portant sur le recrutement de nombreuses protéines impliquées dans la formation du cytosquelette d'actine, Lsb3 est une des premières protéines recrutées au futur site d'endocytose et elle ne disparaît que lors du déplacement rapide de la vésicule, après la scission membranaire (Tonikian et al., 2009).



**Figure 12 : Ordre d'arrivée des protéines au site d'endocytose chez *S.cerevisiae*.**

Les protéines ont été étiquetées avec la GFP ou la RFP, au niveau de leurs extrémités C-terminales.

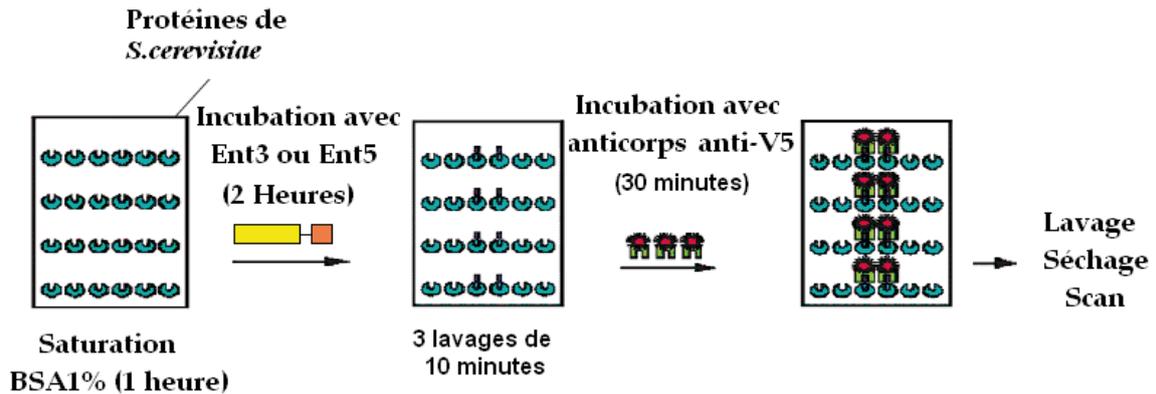
L'apparition et la disparition des signaux aux taches corticales ont été comparées deux à deux.

Les protéines impliquées dans les étapes précoces de l'endocytose sont regroupées en quatre modules : formation du manteau (coat), arrivée des activateurs (WASP/Myo), scission de la vésicule et polymérisation de l'actine.

Adaptée de (Tonikian et al., 2009).

#### **D. Lsb3 et Lsb4 interagissent avec les epsines Ent3 et Ent5.**

Lsb3 a été trouvée dans un crible cherchant à identifier des partenaires directs des protéines Ent3 et Ent5. Ce crible a été effectué par Vanessa Addis, doctorante dans le laboratoire de Sylvie Friant, en utilisant la technique de puces à protéines « Yeast ProtoArray® PPI (Protein-protein interactions) » commercialisées par Invitrogen (figure 13). Sur ces puces se trouvent la plupart des protéines solubles (les produits de 4088 ORFs (Open Reading frame)) de *S. cerevisiae*.



**Figure 13 : Interaction protéine-protéines en utilisant Ent3 ou Ent5 comme appât.**

Les protéines Ent3 et Ent5 sont étiquetées V5. L'anticorps anti-V5 est couplé au fluorochrome Alexa fluor 647 permettant d'observer les interactions avec un scanner à fluorescence.

Adaptée de invitrogen

De nombreux effecteurs potentiels ou avérés de Ent3 et Ent5 ont ainsi pu être identifiés parmi lesquels la sous-unité Apl4 de l'adaptateur à clathrine AP-1. Cette interaction ayant déjà été démontrée par la technique du double hybride (Duncan, Costaguta et al. 2003), elle permet de valider l'utilisation des protéines Ent3 et Ent5 étiquetées comme appât ainsi que les conditions d'incubation et de révélation de la puce. Lsb3 interagit avec la protéine Ent5 étiquetée en N- ou en C-terminal et avec la protéine Ent3 étiquetée en N-terminal. Ent3 et Ent5 sont des epsines impliquées dans la voie VPS et plus particulièrement au niveau de la formation du MVB, une autre voie du trafic intracellulaire que l'endocytose (Voir chapitre III-A-2). Ces interactions suggèrent l'existence d'un lien entre le cytosquelette d'actine et la formation du MVB (Voir chapitre III-C).

	V5-Ent3	Ent3-V5	V5-Ent5	Ent5-V5
Protéine				
Lsb3	3,14	1,79	3,61	3,17
Apl4	8,3	12,7	11,9	9,5

**Tableau 3 : Score-Z de Lsb3.**

Scores obtenus pour la protéine Lsb3 avec les protéines Ent3 et Ent5 étiquetées V5-6His en N- ou C-terminal. Le score-Z représente la quantité de protéines interagissant avec les protéines se trouvant sur la puce. Ces scores sont calculés en fonction de la fluorescence observée grâce à un logiciel d'exploitation (GenePix) tenant compte des contrôles positifs et négatifs de l'expérience. L'interaction entre Lsb3 et Ent3 possédant l'étiquette à l'extrémité C-terminale est considérée comme non significative (Score Z inférieur à 3).



### **III. Le trafic intracellulaire.**

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par la présence de compartiments : noyau, réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi, endosomes et lysosome/vacuole. Afin d'accomplir leurs fonctions, de subir des modifications ou d'être dégradées, les protéines circulent soit entre ces différents compartiments, soit entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Les protéines synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique ou présentes au niveau de la membrane plasmique sont acheminées vers le lysosome/vacuole pour y accomplir leur fonction ou être dégradées. Le transport des protéines s'effectue grâce à des vésicules qui naissent à partir de la membrane du compartiment donneur et qui fusionnent avec la membrane du compartiment accepteur.

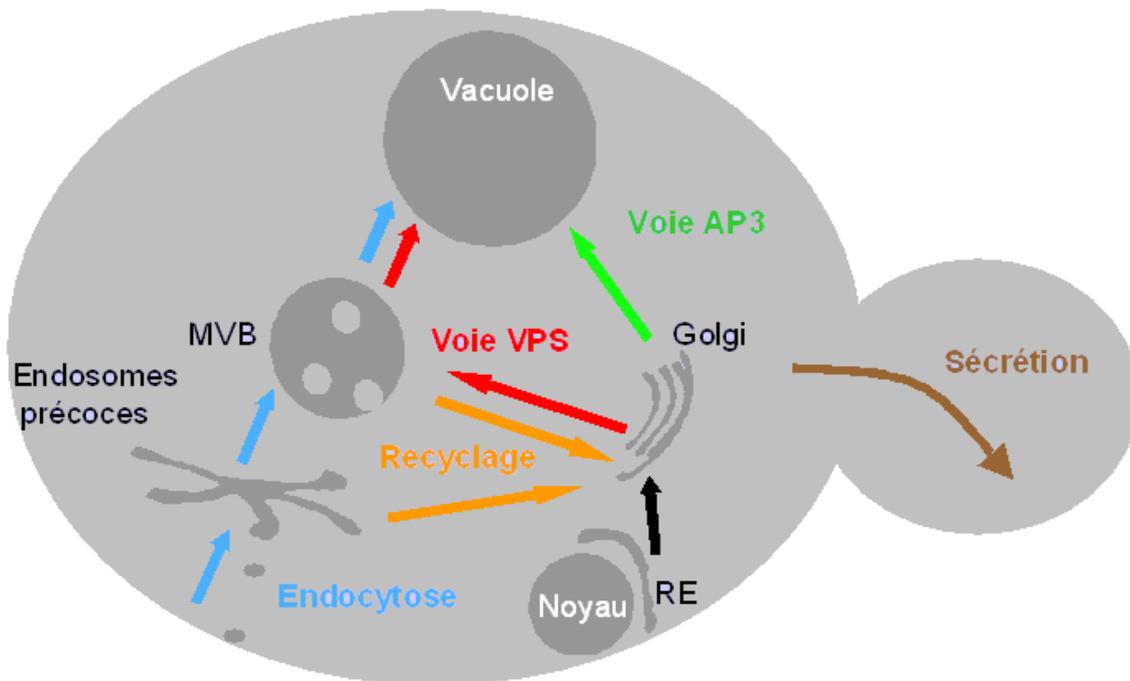
La levure *S. cerevisiae* présente une organisation compartimentée comparable à celle des cellules des eucaryotes supérieurs et s'avère être un bon outil pour étudier le trafic intracellulaire : en effet la majeure partie des acteurs et des mécanismes moléculaires du trafic mis en évidence chez la levure sont conservés dans tout le règne eucaryote.

#### **A. Les grandes voies du trafic intracellulaire.**

Il existe cinq voies principales de trafic intracellulaire (figure 14) : la voie de sécrétion, l'endocytose, la voie VPS, la voie AP3 et la voie de recyclage (ou voie rétrograde).

La voie de sécrétion permet aux protéines synthétisées dans le RE d'être envoyées vers la membrane plasmique ou exocytées dans le milieu extracellulaire en passant par l'appareil de Golgi. Les protéines impliquées dans cette voie sont, pour la plupart, essentielles à la viabilité cellulaire. L'endocytose permet à la cellule d'internaliser des molécules de la membrane plasmique et du milieu extracellulaire. La voie VPS (Vacuolar protein sorting) est la principale voie permettant d'amener les protéines néosynthétisées de l'appareil de Golgi vers la vacuole, en passant par les endosomes précoces et tardifs. La voie dépendant d'AP3 permet de transporter certaines protéines néosynthétisées depuis l'appareil de Golgi directement vers la vacuole. Finalement, la voie de recyclage permet de recycler des protéines internalisées vers la membrane plasmique ou faisant la navette entre l'appareil de Golgi et les endosomes.

Les mécanismes du trafic intracellulaires et les nombreuses voies existantes impliquent une régulation fine et un tri à chaque étape. Dans le cadre de cette introduction, je développerai plus particulièrement la voie d'endocytose et les voies Golgi-vacuole.



**Figure 14 : Les grandes voies du trafic intracellulaire.**

Les protéines néosynthétisées partent de l'appareil de Golgi pour être dirigées vers la vacuole, la membrane plasmique ou d'autres compartiments cellulaires. Les protéines situées à la membrane plasmique sont endocytées pour être soit dégradées dans la vacuole soit recyclées.

MVB : Multivesicular Body = Corps multivésiculaire = endosome tardif.

### 1. La voie d'endocytose.

La voie d'endocytose est la voie permettant aux cellules eucaryotes d'internaliser les protéines de la membrane plasmique, ainsi que le fluide extracellulaire contenant des nutriments, pour les dégrader dans la vacuole. Des cribles génétiques chez la levure ont permis d'identifier de nombreux gènes codant pour les protéines impliquées dans l'endocytose. Certains de ces gènes ont été identifiés en utilisant le Lucifer Yellow (Raths et al., 1993) tandis que d'autres (6 mutants *end*) ont été isolés en cherchant des mutants incapables de croître sur milieu acide lorsque l'ATPase vacuolaire est absente (Munn and Riezman, 1994). La levure est capable d'acidifier le compartiment vacuolaire grâce à l'ATPase vacuolaire ou grâce à l'endocytose de protons extracellulaire, les cellules incapables de pousser en absence de l'ATPase vacuolaire sur milieu acide présentent donc, en plus du défaut

de l'ATPase vacuolaire, des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'endocytose.

On peut étudier l'endocytose en suivant le trafic de molécules fluorescentes présentes dans le milieu extracellulaire (tel le Lucifer Yellow). Ce processus est constitutif et non saturable. On peut également suivre l'endocytose d'une protéine de la membrane plasmique, un processus contrôlable et saturable. Dans les deux cas, ces molécules sont endocytées selon une voie bien caractérisée. Pour cette voie, la chronologie des événements ainsi que les compartiments impliqués semblent bien conservés de la levure aux eucaryotes supérieurs. L'entrée dans la cellule se fait grâce à des vésicules s'invaginant à la membrane plasmique, les protéines traversent successivement par la suite les compartiments endosomaux précoces puis tardifs, avant d'atteindre la vacuole où elles sont dégradées.

#### a. Rôle de la clathrine.

La clathrine est une protéine qui intervient à différentes étapes du trafic intracellulaire. On la trouve au niveau de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi et, sous forme d'un manteau courbé. Elle se présente sous forme d'un triskèle dont chaque branche est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, associées par leurs domaines C-terminaux (Brodsky et al., 2001). Les triskèles s'auto-assemblent pour former une cage sphérique autour de la vésicule (Kirchhausen and Harrison, 1981). Elle est recrutée à la membrane plasmique par les adaptateurs à clathrine que sont les protéines AP2, yAB180-1 et yAB180-2. Les adaptateurs sont les premières protéines à arriver sur les sites d'endocytose où ils se lient à la membrane plasmique *via* le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) (Newpher et al., 2005; Toshima et al., 2006). Une fois les adaptateurs fixés à la membrane plasmique, ils recrutent la clathrine qui initie l'endocytose. Cependant, si l'endocytose dépendante de la clathrine et de AP2 est la voie majoritaire d'internalisation des protéines dans les cellules de mammifère, ce n'est pas le cas chez la levure où l'existence d'une voie d'endocytose dépendante de la clathrine a longtemps été controversée. En effet, aucun puits recouvert de clathrine n'avait pu être observé à la membrane plasmique chez la levure et la délétion des gènes codant la chaîne lourde ou la chaîne légère de la clathrine n'inhibe qu'à 50% l'internalisation des protéines Ste2 et Ste3 (Tan et al., 1993). Il a cependant été établi récemment l'existence de cette voie ; la clathrine, chez la levure, n'est pas essentielle mais permet de recruter d'autres protéines endocytiques qui engendrent la courbure membranaire (Kaksonen et al., 2005).

## b. Rôle de l'actine.

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'intégrité du cytosquelette d'actine est primordiale pour l'endocytose (Toret and Drubin, 2006). En effet, des défauts d'endocytose sont observés pour des mutants du complexe Arp2/3 ou en utilisant la latrunculine A, une drogue qui bloque la polymérisation de l'actine (Ayscough et al., 1997; Moreau et al., 1997). De plus, de nombreux composants du cytosquelette d'actine se trouvant au niveau des taches corticales ont été identifiés dans des cribles de mutants défectueux pour l'endocytose : Act1, Arc35, Rvs167, Sac6, Sla2 ou Vrp1 (Chvatchko et al., 1986; Dulic and Riezman, 1989; Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Kubler and Riezman, 1993; Munn et al., 1995; Raths et al., 1993; Riezman, 1985). Des observations au microscope électronique ont montré que les taches corticales d'actine sont associées à des invaginations à la membrane plasmique (Mulholland et al., 1994). Une étude tridimensionnelle de l'ultrastructure des taches corticales montre que ces structures ont une forme de cône, avec le complexe Arp2/3 positionné à l'apex et il semble qu'il y ait une relation entre ces cônes d'actine et les invaginations en forme de doigt (Rodal et al., 2005a). Enfin, il a été montré que les filaments d'actine des taches corticales d'actine partiellement purifiées forment un réseau ramifié où les filaments ont une polarité uniforme (Young et al., 2004).

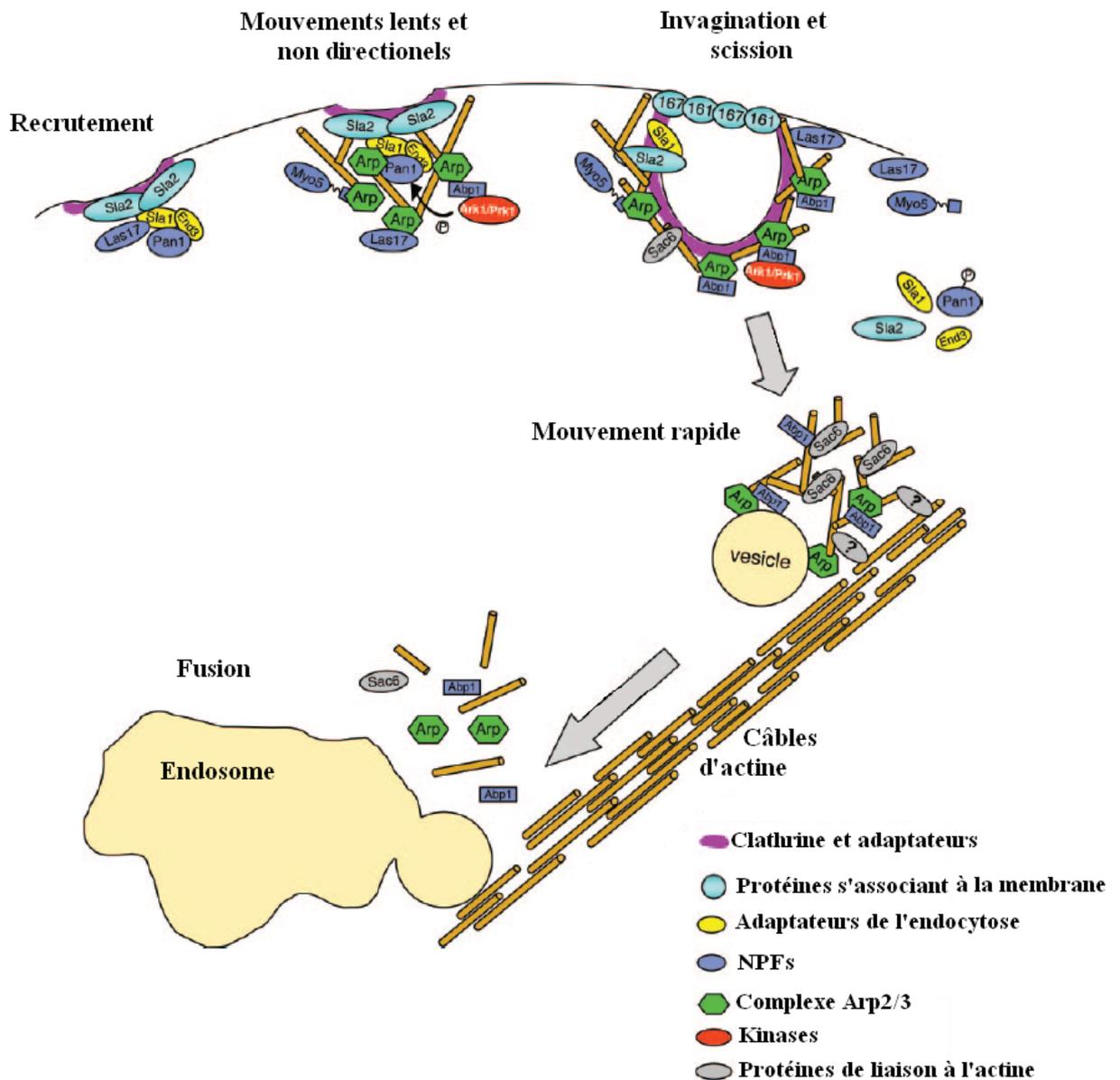
Les taches corticales d'actine sont donc bien impliquées dans l'endocytose et l'actine est directement requise pour l'étape d'internalisation (Kubler and Riezman, 1993), sa polymérisation ou dépolymérisation pouvant fournir la force requise pour la libération des vésicules issues de la membrane plasmique (Figure 12 page 46) (D'Hondt et al., 2000).

Le mécanisme d'endocytose peut être décomposé en plusieurs grandes étapes : l'internalisation à la membrane plasmique, la fusion de la vésicule avec les endosomes précoces, la formation de vésicules internes aux endosomes pour aboutir au MVB et finalement la libération dans la vacuole après fusion du MVB avec la vacuole. Je m'intéresserai ici plus particulièrement aux étapes précoces de l'endocytose conduisant à l'internalisation de la vésicule à la membrane plasmique (figure 15). Ces étapes sont déterminées en fonction de l'état d'avancement de la vésicule de transport au sein de la cellule et des protéines qui y sont associées (Galletta et al., 2008; Idrissi et al., 2008; Toret and Drubin, 2006).

### c. Les étapes précoces de l'endocytose.

La première étape consiste au recrutement de la machinerie d'endocytose. Tout d'abord la clathrine ainsi que la protéine Ede1 arrivent au site d'endocytose (Newpher et al., 2005; Toshima et al., 2006). On a longtemps pensé que les vésicules se formaient aléatoirement à la membrane plasmique après regroupement de protéines et de lipides mais il a été suggéré que le site d'endocytose est défini par la présence d'un large assemblage immobile composé de protéines (Pil1, Lsp1, Sur7) nommé eisosome (Walther et al., 2006). Cependant, à ce jour, aucun autre travail n'a lié cette structure à la formation des taches corticales. Le recrutement de l'actine au niveau des futurs sites d'endocytose se fait grâce aux protéines Ent1, Ent2, Yap1801, Yap1802 et AP-2 qui possèdent toutes des domaines d'interaction avec la clathrine et le PI(4,5)P<sub>2</sub> (Newpher et al., 2005). Une à deux minutes après que la clathrine soit arrivée au site d'endocytose, les taches corticales d'actine se forment avec l'arrivée de nombreuses protéines, parmi lesquelles Las17, End3, Sla1, Sla2 et Pan1 (Galletta et al., 2008; Howard et al., 2002; Kaksonen et al., 2003) (voir figure 12 page 46). Parallèlement Ede1 disparaît des sites d'endocytose. La mise en place des taches corticales continue avec le recrutement de nouvelles protéines : Vrp1 (orthologue de WIP) et Bzz1 (orthologue de la Syndapin). Bzz1 permettrait de lever l'inhibition exercée par Sla1 sur Las17 (Sun et al., 2006) qui pourrait alors recruter le complexe Arp2/3.

La seconde étape débute quand les taches corticales précoces (marquées par Las17, Pan1 et Sla2) recrutent la machinerie de nucléation de l'actine, c'est-à-dire le complexe Arp2/3 et trois nouveaux NPFs : Myo3, Myo5 et Abp1. La capacité de Myo5 à activer le complexe Arp2/3 est dépendante de Vrp1. L'assemblage de l'actine est ainsi initié pour démarrer l'internalisation (Sun et al., 2006) et continue avec l'action de Las17 sur le complexe Arp2/3. Lors de cette seconde étape, les taches corticales subissent des mouvements lents et non directionnels dans le plan du cortex cellulaire et la polymérisation de l'actine débute (Kaksonen et al., 2003; Kim et al., 2006). Il semblerait que les kinases Ark1 et Prk1 soient impliquées dans le processus de transition entre la seconde et la troisième étape. Elles sont des régulateurs majeurs du désassemblage des sites d'endocytose (Sekiya-Kawasaki et al., 2003; Zeng et al., 2001) et sont recrutées par Abp1 (Cope et al., 1999). Le complexe Pan1 est démantelé suite à la phosphorylation de Pan1 et Sla1 par ces kinases (Smythe and Ayscough, 2003; Toshima et al., 2005).



**Figure 15 : Les étapes précoces de l'endocytose ou de l'internalisation.**

Etape 1 : Recrutement au niveau du cortex cellulaire des composants précoces des taches, notamment la clathrine, les adaptateurs et les NPFs Pan1 et Las17.

Etape 2 : Pan1 et Las17 recrutent et activent le complexe Arp2/3 afin de permettre la polymérisation de l'actine. D'autres NPFs sont recrutés (Abp1, Myo3 et Myo5) et les taches corticales subissent des mouvements lents et non directionnels dans le plan du cortex cellulaire.

Etape 3 : La phosphorylation de Pan1 et/ou l'activité de Rvs161, Rvs167, Myo3 et Myo5 entraîne l'internalisation et la scission de la vésicule. Le complexe Arp2/3, Abp1, Sac6, Cap1/Cap2 et d'autres composants restent associés à la vésicule mais certains composants précoces des patches disparaissent : Las17, Pan1, Sla1, Sla2, Myo3 et Myo5.

Etape 4 : La vésicule endocytique associée à des câbles d'actine se déplace rapidement vers l'intérieur de la cellule où elle va fusionner avec les endosomes.

Adaptée de (Moseley and Goode, 2006).

La troisième étape consiste en l'invagination à proprement parler et en la scission entre la vésicule et la membrane plasmique. Au cours de cette étape, les taches/vésicules bougent vers l'intérieur de la cellule avec une vitesse rapide et directionnelle (Kaksonen et al., 2003; Kim et al., 2006). Lors de ce processus, les taches perdent de nombreux composants précoces : Sla1, Sla2, Las17, Pan1, Myo3 et Myo5. La disparition des différents composants au cours de la migration ne se fait pas de la même manière pour toutes les protéines. Ainsi, Las17 se dissocie en même temps que Myo5 de la membrane plasmique (Jonsdottir and Li, 2004; Kaksonen et al., 2003) tandis que Pan1 se dissocie au cours de la migration de la vésicule. Ceci suggère que Las17 et Pan1 ont des rôles différents dans l'internalisation des vésicules. Il a été montré que Bbc1, End3, Sla1 et Sla2 peuvent contribuer à la régulation négative de l'assemblage de l'actine à cette étape et/ou promouvoir la libération des vésicules (Kaksonen et al., 2005).

Lors de la quatrième étape, les vésicules quittent le cortex cellulaire et bougent rapidement vers l'intérieur de la cellule le long des câbles polarisés d'actine. Le flux des câbles semblent emmener les vésicules vers les compartiments de tri des endosomes (Huckaba et al., 2004). Les taches corticales d'actine étant majoritairement observées au niveau du bourgeon et les endosomes se trouvant majoritairement dans la cellule mère, le flux de câbles se fait du bourgeon vers la cellule mère. Il semblerait que ce transport soit passif, ce qui suggère qu'il y ait un lien physique entre les « taches » et les câbles. Les facteurs connus pour être associés aux taches bougeant rapidement sont Abp1, le complexe Arp2/3, Cap1/Cap2 et Sac6 (Huckaba et al., 2004; Kaksonen et al., 2003; Kim et al., 2006).

La voie d'endocytose se poursuit avec la fusion des vésicules avec les endosomes précoces. Ce processus est rendu plus efficace par l'association des vésicules et des endosomes précoces avec les câbles d'actine (Toshima et al., 2005). Les protéines passent ensuite par des endosomes multivésiculaires ou MVB (Multivesicular body) où certaines sont internalisées pour finalement être libérées dans le lumen de la vacuole lors de la fusion du MVB avec la vacuole. Au MVB une redirection des protéines vers la membrane plasmique est possible. Le tri effectué sera plus amplement détaillé dans le chapitre B.

## 2. Les voies Golgi-vacuole.

Le transport de protéines de l'appareil de Golgi vers la vacuole s'effectue grâce à des vésicules issues du TGN (Trans Golgi Network). La fission de ces vésicules dépend de la protéine Vps1 (dynamamin-like protein GTPase) (Gurunathan et al., 2002). Certaines des protéines transportées sont destinées au lumen de la vacuole tandis que d'autres sont destinées à la membrane vacuolaire. Deux voies interviennent dans ce transport : la voie VPS (Vacuolar Protein Sorting) passant par le MVB avant d'arriver à la vacuole (Cowles et al., 1997) et la voie AP3 qui est directe (Piper et al., 1997). Les deux voies sont présentes chez la levure et les eucaryotes supérieurs.

### a. La voie VPS.

La voie VPS a été caractérisée grâce à différents cribles génétiques chez la levure. Certains de ces cribles ont utilisé la morphologie vacuolaire (mutants *vam*), la sécrétion de protéases vacuolaires dans le milieu extracellulaire (mutants *vps* et *pep*), la ségrégation de la vacuole (mutants *vac*) ou encore la rétention de protéines au Golgi (mutants *grd*) (Bankaitis et al., 1986; Jones, 1977; Nothwehr et al., 1996; Rothman and Stevens, 1986; Wada et al., 1992; Weisman et al., 1990). Les différents cribles se chevauchant, nous retiendrons ici le nom de mutants *vps* ; ces mutants sont regroupés en six classes en fonction de certaines caractéristiques parmi lesquelles la morphologie de la vacuole (Tableau 4). Les mutants d'une même classe sont souvent bloqués au même stade de la voie VPS.

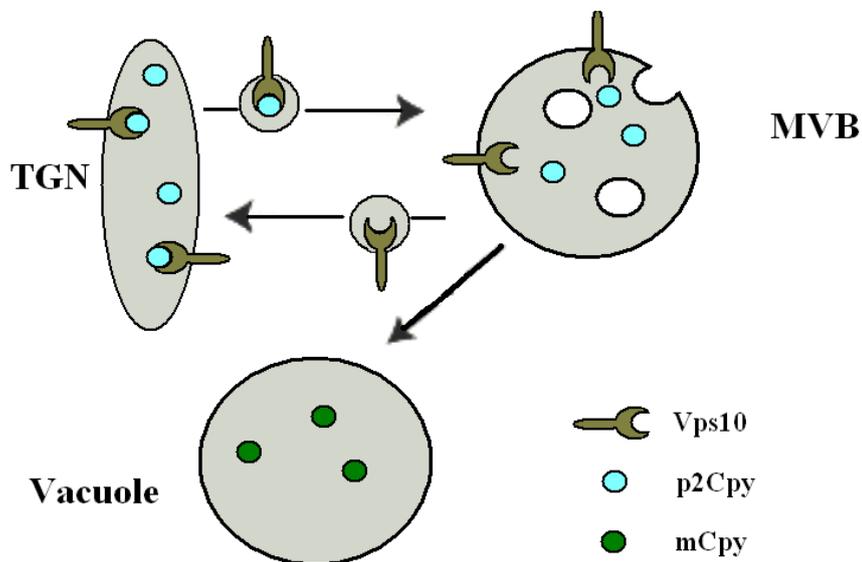
Groupe	Morphologie vacuolaire
A	3-10 vacuoles rassemblées
B	Vacuoles fragmentées (>20)
C	Hyperfragmentation vacuolaire
D	Large vacuole unique
E	Vacuoles plus larges que chez les sauvages avec un compartiment endosomal tardif aberrant associé
F	Une large vacuole entourée de vacuoles très fragmentées

**Tableau 4 : Classification des mutants *vps* en fonction de la morphologie vacuolaire.**  
Adapté de (Bowers and Stevens, 2005).

La voie VPS est empruntée par la carboxypeptidase Y (CPY) (figure 16) dont le trafic a été bien étudié. Cette hydrolase vacuolaire passe du RE à la vacuole en transitant par l'appareil de Golgi et le MVB (ou endosome tardif) afin d'aller assurer sa fonction à la vacuole (Cowles et al., 1997). A différentes étapes de son trajet, elle subit des modifications post-traductionnelles permettant de déterminer à quel niveau de son parcours elle est bloquée dans les différents mutants. La CPY est synthétisée sous forme de précurseur (proCPY) puis transportée à travers la membrane du réticulum endoplasmique où elle subit un clivage de son signal d'adressage. Deux formes p1 et p2 de proCPY sont observées chez *S. cerevisiae*. La forme p1, présente au niveau du RE et du *cis*-Golgi, est N-glycosylée. Lors de son passage par le *médial-trans* Golgi, elle est O-glycosylée en une forme hyperglycosylée p2 qui est transportée du TGN (Trans Golgi Network) vers le MVB. Au MVB, la forme p2 est libérée dans le lumen de l'endosome, puis dans le lumen de la vacuole lors de la fusion MVB-Vacuole. La forme p2 est finalement maturée dans la vacuole par clivages protéolytiques pour générer la forme mature active de l'enzyme : mCPY.

Au niveau de l'appareil de Golgi, le précurseur p2 se lie à un récepteur trans-membranaire Vps10 (Marcusson et al., 1994). Vps10 est le récepteur membranaire de CPY et d'autres d'hydrolases vacuolaires (PrA, APY) empruntant la même voie que CPY (Cooper and Stevens, 1996; Jorgensen et al., 1999). La formation, au niveau du TGN, de la vésicule et l'incorporation des cargos nécessitent la clathrine (Deloche, Yeung et al. 2001) et sa fission du TGN est médiée par Vps1, une protéine similaire à la dynamine (Gurunathan et al., 2002). Une fois que Vps10 a amené la CPY au MVB, elle est recyclée vers l'appareil de Golgi *via* une voie de transport rétrograde requérant le complexe Rétromère (Deloche and Schekman, 2002; Seaman et al., 1997). Le transport de Vps10, du Golgi vers le MVB puis du MVB vers le Golgi s'effectue grâce à un domaine cytosolique contenant deux motifs aromatiques : YSSL et FYVF (Cereghino et al., 1995; Cooper and Stevens, 1996).

Des mutants *vps10* sécrètent plus de 90% de proCPY dans le milieu extracellulaire (Marcusson et al., 1994). Cependant il existe un homologue de Vps10, nommé Vth2 (Vps ten homologous 2). Cette protéine, codée par deux gènes paralogues *VTH1* et *VTH2*, est capable de compléter partiellement la délétion de *VPS10* lorsqu'il est surproduit (Cooper and Stevens, 1996).



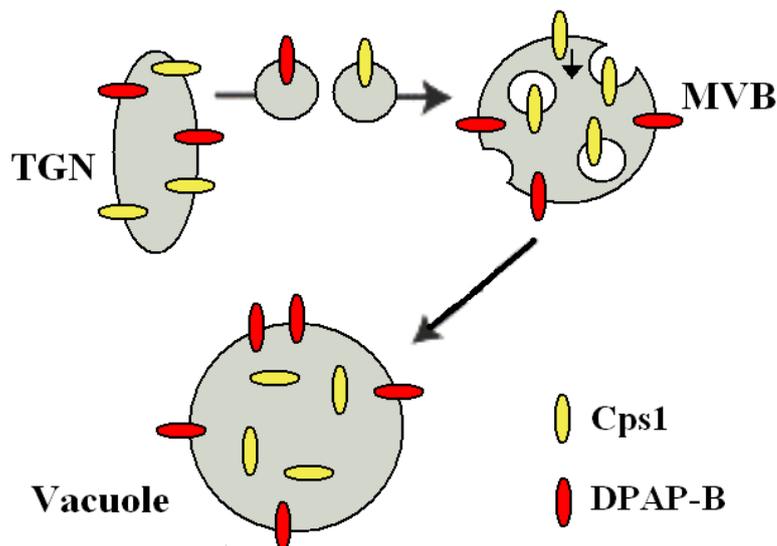
**Figure 16 : Trafic de la protéine cytosoluble CPY empruntant la voie VPS.**

La carboxypeptidase Y est dirigée du TGN à la vacuole en transitant par l'appareil de Golgi et le MVB. Elle subit des modifications post-traductionnelles à différentes étapes de son trajet. Ainsi lors de son passage par le *médial-trans* Golgi, une forme p1 est O-glycosylée donnant la forme p2. Cette forme p2 se lie ensuite à un récepteur trans-membranaire Vps10 la libérant dans le lumen du MVB vacuole. Finalement dans la vacuole elle est maturée par clivages protéolytiques pour générer la forme mature active de l'enzyme : mCPY.

Il est important de noter que CPY est une protéine soluble ; or la voie VPS est également empruntée par des protéines membranaires. Ceci implique que le transport de ces dernières par la voie VPS doit différer de celui de la protéine CPY en plusieurs points. Tout d'abord, le passage du TGN vers le MVB pour ces protéines ne nécessite pas la présence de Vps10. Ensuite, une fois arrivées au MVB, il faut distinguer deux destinations finales pour ces protéines (figure 17).

- Les protéines devant rejoindre le lumen de la vacuole pour y être maturées, telle la carboxypeptidase S (Cps1) et l'endopolyphosphatase (Phm5), sont internalisées dans les vésicules internes du MVB (Epple et al., 2003; Odorizzi et al., 1998; Reggiori and Pelham, 2001). La fusion entre le MVB et la vacuole permet de libérer ces vésicules dans le lumen de la vacuole. Les protéines contenues dans ces vésicules peuvent alors, après dégradation des vésicules, être dégradées ou maturées par des hydrolases de la vacuole (Lemmon and Traub, 2000; Odorizzi et al., 1998).

- Les protéines devant rejoindre la membrane vacuolaire, telle la diaminopeptidase B (DPAP-B), n'ont pas à être internalisées au MVB et, lors de la fusion entre le MVB et la vacuole, se retrouvent à la membrane vacuolaire.



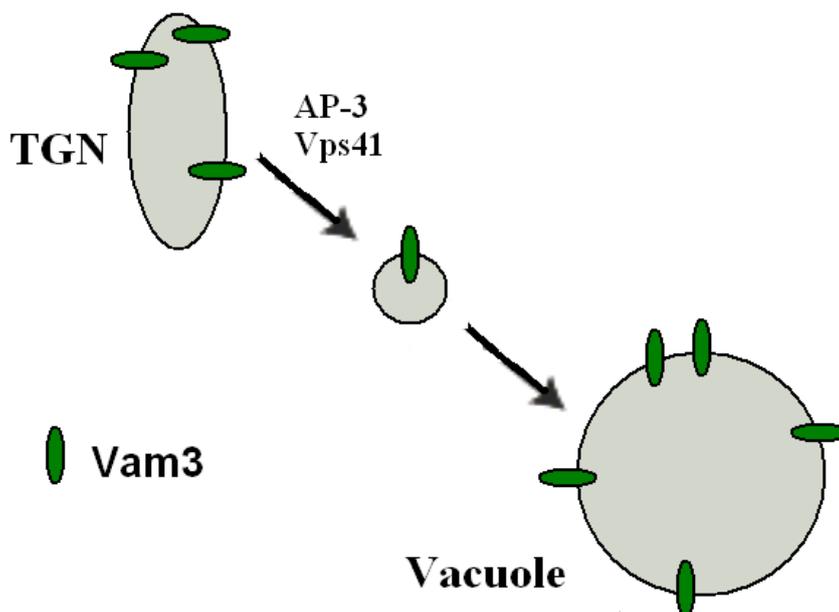
**Figure 17 : Trafic des protéines membranaire empruntant la voie VPS.**

Cps1 est dirigée vers le lumen de la vacuole où elle doit être maturée.

DPAP-B rejoint la membrane vacuolaire et ne nécessite pas d'internalisation au niveau du MVB.

b. La voie AP3.

La voie AP3 est une voie directe entre l'appareil de Golgi et la vacuole (figure 18). Son existence a été mise évidence par des études portant sur la phosphatase alcaline (ALP), une enzyme vacuolaire synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire inactif et qui est maturée par les protéases une fois dans la vacuole (Piper et al., 1997). Il s'est avéré que cette protéine est normalement délivrée à la vacuole dans les mutants *vps* de classe D (les protéines de la classe D étant requises pour la fusion des vésicules émanant de l'appareil de Golgi avec les endosomes) (Raymond et al., 1992). La machinerie spécifique de cette voie à été mise en évidence (Stepp et al., 1997) et il a été montré qu'un complexe adaptateur AP-3 (Apl6, Apl5, Apm3 et Aps3) est requis pour le ciblage à la vacuole. Les protéines Vam3 et Vps41 sont impliquées dans cette voie : Vam3 intervient dans le processus de fusion avec la vacuole et Vps41 s'associe à AP-3 pour permettre la formation de la vésicule (Cowles et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Par ailleurs, un motif di-leucine semble essentiel au tri des cargos vers la voie AP-3 (Darsow et al., 1998).



**Figure 18 : Trafic des protéines membranaire empruntant la voie AP3.**

La voie AP-3 est directe entre TGN et vacuole. Cette voie nécessite le complexe AP-3.

## **B. Le corps multivésiculaire ou endosomes tardifs**

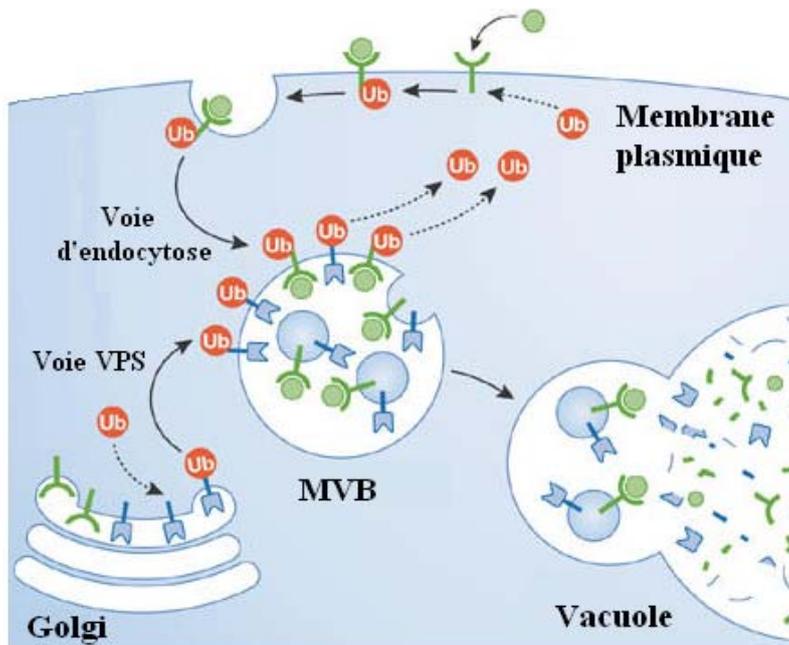
Les endosomes appartiennent au système endocytique qui est composé d'un ensemble de vésicules et de vacuoles. La distinction entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (ou MVB) se fait notamment par le temps que mettent les protéines internalisées de la membrane plasmique à atteindre ces structures. Le MVB présente des différences de morphologie et de composition protéique et lipidique par rapport aux endosomes précoces. Au niveau des endosomes tardifs se produit un processus d'invagination de la membrane qui va conduire à l'émergence du corps multivésiculaire. Ce corps multivésiculaire, qui contient de nombreuses vésicules (d'une dizaine à une centaine), est plus sphérique et présente, chez les mammifères, un pH inférieur à celui des endosomes précoces (5 contre 6.5). Le diamètre du MVB est approximativement de 400 à 500 nm et celui des vésicules qu'il contient varie entre 40 et 90 nm (Katzmann et al., 2002). Le MVB est un compartiment central de la cellule. C'est au MVB que se fait le tri des protéines recyclées vers l'appareil de Golgi ou vers la membrane plasmique, et celles destinées à la vacuole. Les vésicules issues de l'invagination de la membrane externe du MVB jouent un rôle majeur dans ce processus de tri protéique.

### **1. Les composants du tri au niveau du MVB.**

Le bourgeonnement vésiculaire, qui s'effectue vers l'intérieur du MVB, est nécessaire pour les protéines membranaires dirigées vers le lumen de la vacuole telle Cps1 ou Phm5, mais pas pour celles dirigées vers la membrane de la vacuole telle DPAP-B. De nombreux composants sont impliqués dans la formation des vésicules internes du MVB, dans le tri des protéines au niveau de ce MVB et lors du passage des protéines de la membrane externe du MVB vers les vésicules internes.

#### **a. L'ubiquitine.**

L'internalisation au MVB des protéines venant de l'endocytose (comme la perméase de l'uracile Fur4 (Blondel et al., 2004) ou la perméase générale des acides aminés Gap1 (Helliwell et al., 2001; Soetens et al., 2001)) ou de la voie VPS (Phm5, Cps1) requiert que ces dernières soient mono- ou multi-ubiquitinées (figure 19) (Hicke and Dunn, 2003; Katzmann et al., 2001; Odorizzi et al., 1998; Reggiori and Pelham, 2001; Urbanowski and Piper, 2001).



**Figure 19 : Rôle de l'ubiquitine dans le tri au MVB.**

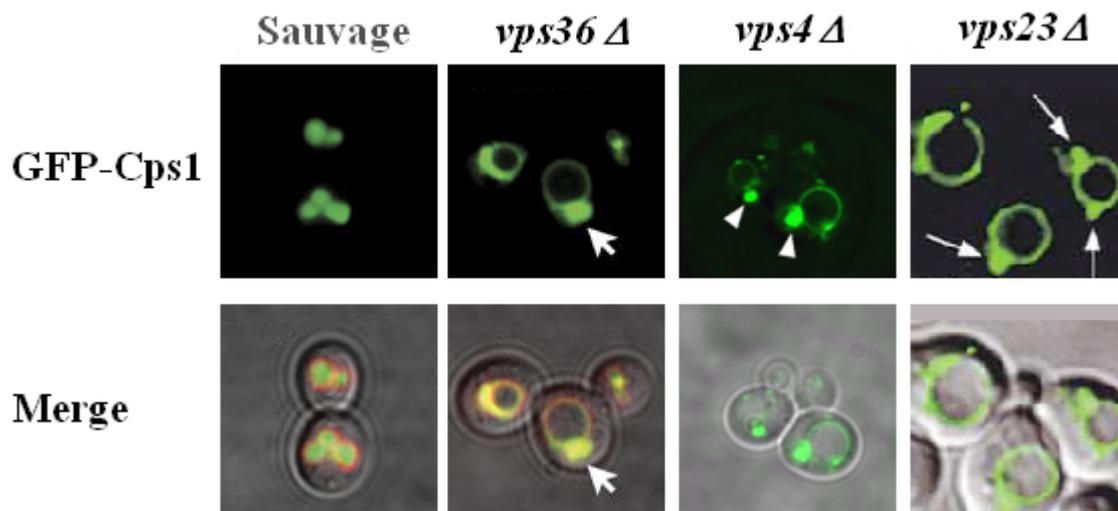
Les protéines empruntant les voies VPS ou d'endocytose sont ubiquitinées avant leur arrivée au niveau du MVB afin d'être internalisées dans les vésicules internes du MVB puis dégradées ou maturées dans la vacuole. Avant l'entrée dans la vésicule interne, il y a déubiquitination et l'ubiquitine est recyclée. Adaptée de (Nickerson et al., 2007).

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle établissant une liaison covalente isopeptidique entre un résidu lysine d'une protéine et le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine. L'ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés, se retrouve, chez l'ensemble des eucaryotes, majoritairement en association avec des protéines et minoritairement sous forme libre (Ciechanover, 1998). L'ubiquitination nécessite l'intervention d'une cascade de réactions enzymatiques. L'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme E1 (ubiquitin activating enzyme), pour ensuite être transférée à une enzyme E2 (ubiquitin conjugating enzyme). L'enzyme E2 lie l'ubiquitine à la protéine cible soit en combinaison avec l'ubiquitine ligase E3 soit après transfert de l'ubiquitine à cette dernière. Dans le cas d'un transfert à E3, celle-ci reconnaît spécifiquement les protéines cibles (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). L'ubiquitination est une modification réversible ; la déubiquitination nécessite des isopeptidases catalysant le clivage entre l'ubiquitine et la protéine cible (Nijman et al., 2005). La séquence en acides aminés située autour du site d'ubiquitination est importante pour la reconnaissance de la protéine par l'ubiquitine ligase, puisque l'ajout de cette séquence (résidus 5-11 de Cps-1) à la protéine DPAP-B suffit à induire son internalisation dans les vésicules interne du MVB (Katzmann et al., 2001). L'ubiquitine ligase E3 Rsp5 (NEDD4) est requise pour le tri et l'internalisation au MVB (Katzmann et al., 2004; Morvan et al., 2004; Wang et al., 2001). En effet, dans des souches

déficientes pour l'activité de Rsp5, les protéines Cps1 et Phm5 se retrouvent délocalisées à la membrane vacuolaire. De plus, les cofacteurs Bul1 et Bul2 aident Rsp5 à ubiquitiner la perméase Gap1 pour son adressage vacuolaire (Helliwell et al., 2001) et les adaptateurs Ear1 et Ssh4 aident Rsp5 dans le tri au MVB (Leon et al., 2008). Enfin, Rsp5 n'est pas la seule ubiquitine ligase à jouer un rôle dans le tri des protéines au MVB. Une autre ubiquitine ligase a été impliquée, Tul1, localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Reggiori and Pelham, 2002). Avant d'entrer dans la vésicule les protéines sont déubiquitinées par les isopeptidases DUBs (deubiquitinating enzyme) (Wilkinson, 1997). Cela n'est pas essentiel pour le tri au niveau du MVB (Dupre and Haguenaer-Tsapis, 2001a; Katzmann et al., 2001; Raiborg et al., 2002; Reggiori and Pelham, 2001; Urbanowski and Piper, 2001) mais un défaut de déubiquitination entraîne un défaut de concentration en ubiquitine libre et ainsi un défaut d'ubiquitination (Papa and Hochstrasser, 1993).

#### b. Les protéines Vps de classe E.

Les protéines Vps sont nécessaires au transport de protéines vers la vacuole et ont été regroupées en six classes, établies en fonction de l'étape où les protéines codées interviennent (étude en fonction de la maturation de la CPY et de la morphologie vacuolaire, (voir tableau 2)) (Raymond et al., 1992). Certaines sont nécessaires au transport de protéines vers la vacuole, parmi lesquelles les Vps de classe E (figure 20), requises pour le tri protéique et la formation des vésicules internes du MVB. La majorité des protéines constituant cette machinerie sont localisées dans le cytoplasme et recrutées à la membrane endosomale de façon transitoire par des interactions protéiques et/ou lipidiques. Les mutants de classe E sont caractérisés par la présence d'un compartiment prévacuolaire aberrant nommé « compartiment de classe E ». Au niveau de ce compartiment aberrant, les protéines empruntant les voies VPS (figure 20) et d'endocytose s'accumulent ainsi que les constituants de la machinerie du tri protéique au MVB qui s'associent en complexes (voir partie 2) (Bowers and Stevens, 2005).

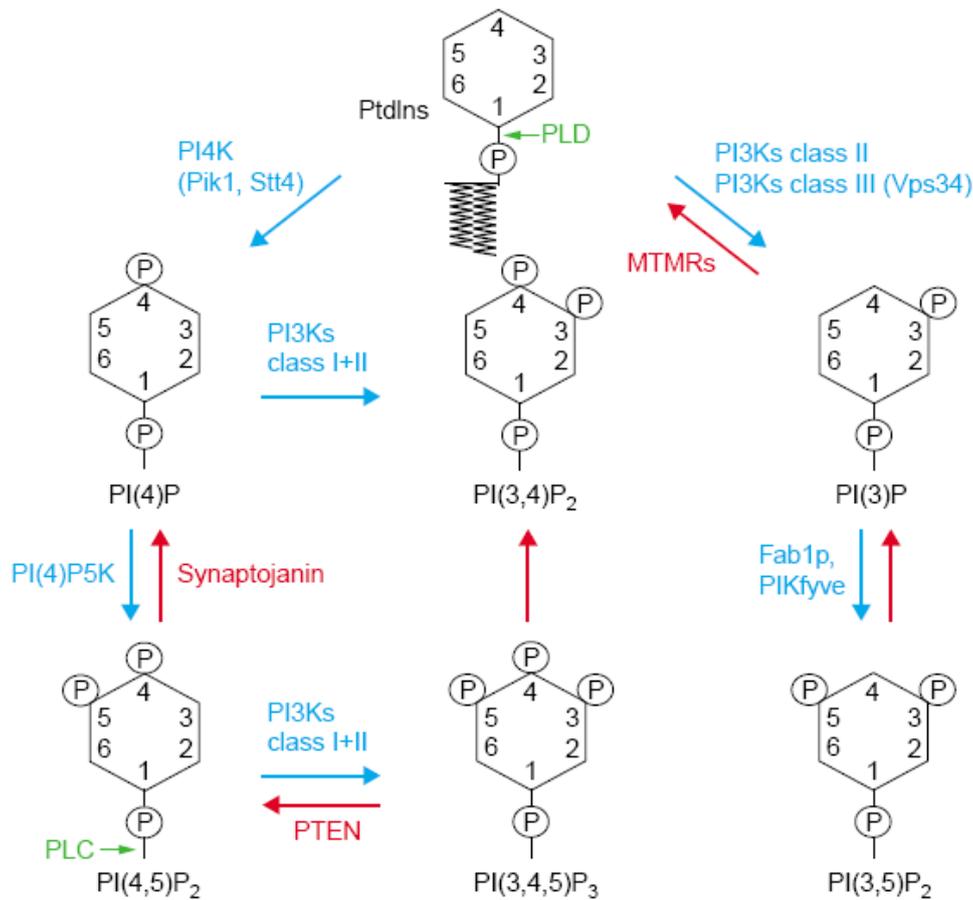


**Figure 20 : Mutants *vps* de classe E.**

La souche de levure sauvage et les mutants de délétion de classe E, transformés avec le cargo GFP-Cps1, sont observés au microscope à fluorescence. La délétion d'un gène codant pour une protéine de classe E (ici *VPS36*, *VPS4* et *VPS23*) provoque un élargissement de la vacuole et une forme aberrante du compartiment endosomal prévacuolaire (indiqué par une flèche) où s'accumule le cargo. Adaptée de (Azmi et al., 2006; Babst et al., 2002a; Gill et al., 2007).

### c. Les phosphoinositides.

A l'instar des autres membranes, la membrane du MVB a une composition lipidique spécifique. Cette composition spécifique est d'ailleurs utilisée pour différencier endosomes précoces et tardifs. Le MVB est enrichi en triglycérides (Kobayashi et al., 1998) par rapport aux endosomes précoces ou à la membrane plasmique et contient des lipides différents entre sa membrane externe et les membranes de ses vésicules internes. Les phosphoinositides (PI) membranaires jouent un rôle important dans la régulation des protéines intervenant dans le tri au MVB. Les PI sont des dérivés du phosphatidylinositol et diffèrent les uns des autres par la ou les phosphorylations de leur groupe inositol en position 3, 4 et 5. Ces phosphorylations/déphosphorylations sont le fait de lipides kinases et phosphatases présentes dans le cytoplasme. Les PI sont présents sur les faces cytoplasmiques des différents compartiments et leurs groupements phosphorylés sont orientés vers le cytoplasme ; ils fonctionnent comme des ligands pour les protéines possédant des domaines de liaison aux phosphoinositides, tels que les domaines PH (Pleckstrin Homology), PX (Phox Homology) (Ellson et al., 2002), FYVE (Fab1-YOPB-Vps27-EEA1) et ENTH (epsin N-terminal homology) (Burd and Emr, 1998; Stenmark et al., 2002), que l'on retrouve dans certaines protéines appartenant à la machinerie de tri protéique au MVB.



### Figure 21 : Les phosphoinositides.

Le groupe inositol des phosphatidylinositols peut être phosphorylé en position 3, 4 et 5. Les principales voies de phosphorylation et déphosphorylation sont ici indiquées. Les kinases sont indiquées en bleu, phosphatases en rouge et les phospholipases en vert. Adaptée de (Simonsen et al., 2001).

Le PI(3)P est présent au niveau des endosomes, des vésicules internes du MVB et à la vacuole (Gillooly et al., 2000). Le PI(3)P est synthétisé à partir du PI par la lipide kinase Vps34 chez la levure (Herman et al., 1991; Schu et al., 1993) ou par déphosphorylation du PI(3,5)P<sub>2</sub> par les lipide phosphatases de la famille Mtm1. Vps34 est recrutée à la membrane endosomale par Vps15 (Stack et al., 1995). Il a été montré que le PI(3)P joue un rôle direct au MVB en recrutant les protéines indispensables au tri, qui participent à l'invagination de la membrane externe du MVB ainsi qu'à la formation des vésicules internes. Les mutants *vps34* et *vps15* présentent ainsi un défaut de tri protéique au MVB et une absence de vésicules dans le compartiment endosomal tardif (Stack et al., 1995).

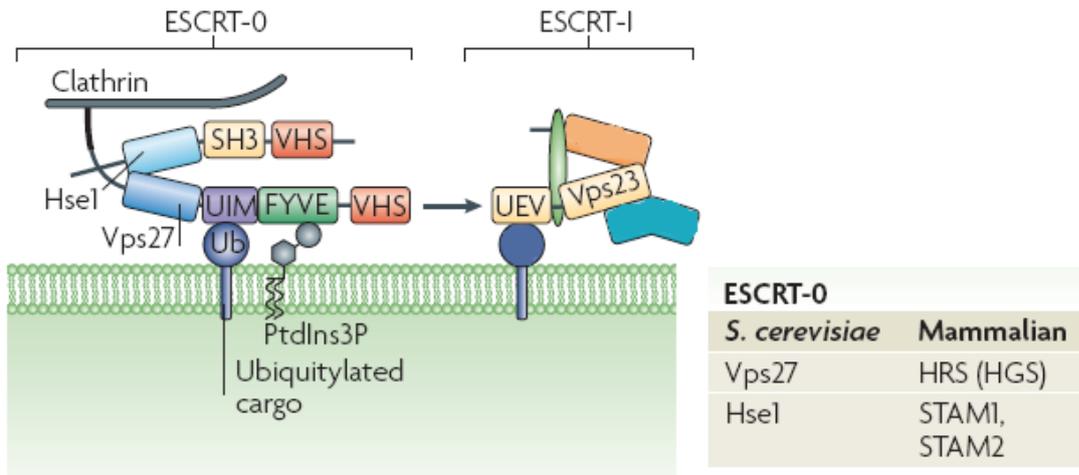
Le PI(3,5)P<sub>2</sub> est présent en faible proportion dans la cellule. Néanmoins, en cas de choc osmotique, sa concentration est multipliée par 50 en l'espace de 10 minutes (Dove et al., 1997). Ce phosphoinositide, présent essentiellement au niveau de la membrane de MVB, est synthétisé à partir du PI(3)P par la lipide kinase Fab1 chez la levure (Gary et al., 1998) et par PIKfyve chez les mammifères (Sbrissa et al., 2002a). Fab1 est régulée par les activateurs Vac7 et Vac14 ainsi que par le régulateur négatif Atg18 (Dove and Johnson, 2007; Dove et al., 2004; Efe et al., 2007). Le PI(3,5)P<sub>2</sub> module le trafic membranaire et la dynamique de la vacuole. Une délétion du gène *FAB1* chez la levure entraîne une incapacité à acidifier la vacuole, une augmentation de sa taille (Cooke et al., 1998; Gary et al., 1998; Odorizzi et al., 1998; Yamamoto et al., 1995b) ainsi qu'un blocage du tri au MVB des protéines ubiquitinées de la voie VPS (Cps1 et Phm5) (Odorizzi et al., 1998; Reggiori and Pelham, 2002). Concernant les protéines ubiquitinées de la voie d'endocytose, deux équipes n'ont pas les mêmes conclusions pour des souches délétées pour *FAB1*. Alors que pour Odorizzi *et al.* (1998), Ste2 (récepteur de la phéromone  $\alpha$ ) est correctement localisé dans le lumen de la vacuole, pour Shaw *et al.* (2003), Ste3 (récepteur de la phéromone **a**) est bloqué à la membrane vacuolaire. Cela pourrait s'expliquer par le niveau d'expression des cargos utilisés ; Shaw *et al.* utilisent un vecteur d'expression avec un promoteur moins fort que Odorizzi *et al.* et reconnaissent voir un niveau faible mais détectable de GFP dans le lumen : le blocage de l'internalisation des protéines de la voie d'endocytose ne serait donc pas complet et ne serait pas détectable avec une forte surexpression. L'expansion de la vacuole pourrait être due à un défaut de recyclage de la membrane vacuolaire. Des études faites sur les orthologues de Fab1 chez *Caenorhabditis elegans* et chez *Drosophila melanogaster* tendent à valider cette hypothèse (Nicot et al., 2006; Rutherford et al., 2006).

## 2. Les complexes ESCRTs.

Les protéines de classe E sont associées en complexes conservés chez tous les eucaryotes : il s'agit des complexes ESCRT-0 à 3 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Ces complexes sont responsables du tri des protéines ainsi que de la formation des vésicules internes du MVB.

### a. Le complexe ESCRT-0.

Le complexe ESCRT-0 (figure 22) est constitué de Vps27 (HRS chez les mammifères) et de l'adaptateur Hse1 (STAM), deux protéines de classe E qui interagissent *via* des régions coiled-coil (Asao et al., 1997). La localisation de Hse1 à la membrane du MVB dépend de Vps27 (Mizuno et al., 2004) qui est recrutée à la membrane *via* l'interaction de son domaine FYVE avec le PI(3)P (Raiborg et al., 2001a). Vps27 et Hse1 possèdent des domaines UIM (Ubiquitin-Interacting motif) et VHS (Vps27/Hrs/STAM), permettant au complexe ESCRT-0 d'interagir avec l'ubiquitine des protéines devant être internalisées (Bilodeau et al., 2002; Mizuno et al., 2003). ESCRT-0 permet également le recrutement de l'ubiquitine ligase Rsp5 et de l'enzyme de déubiquitination Ubp7. Cette enzyme de déubiquitination pourrait intervenir dans la régulation du complexe qui est lui même ubiquitiné (Polo et al., 2002; Ren et al., 2007). Chez les mammifères les deux protéines du complexe sont également capables de s'associer au manteau de clathrine (McCullough et al., 2006; Raiborg et al., 2002; Sachse et al., 2002). Ce manteau est requis pour le transport des protéines devant être dégradées dans la vacuole (Raiborg et al., 2006) et pourrait être le premier facteur permettant le rapprochement entre les protéines ubiquitinées et de la machinerie des ESCRTs. Dans sa région C-terminale, Vps27 possède un motif PSDP qui interagit avec le domaine UEV (Ubiquitin E2 variant domain) de la protéine Vps23 (TSG101) du complexe ESCRT-1 (Bache et al., 2003; Bilodeau et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Lu et al., 2003; Pornillos et al., 2003). ESCRT-0 a donc pour fonction de trier les cargos et de recruter à la membrane la machinerie ESCRT permettant l'invagination.



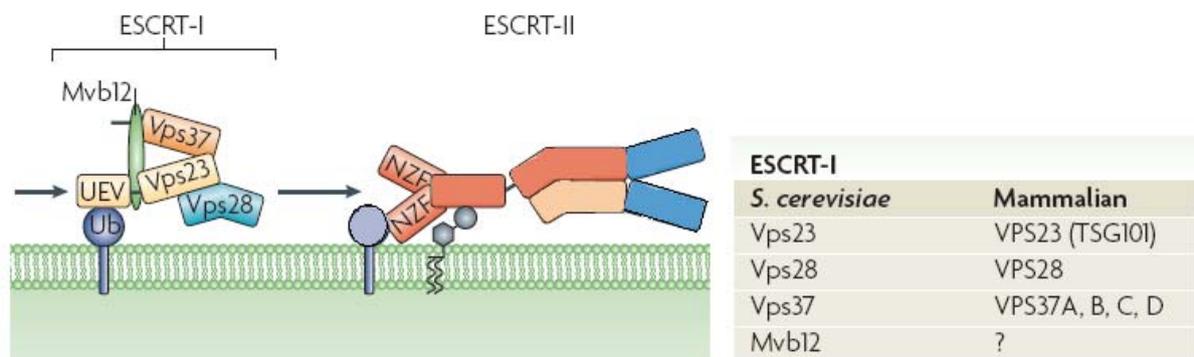
**Figure 22 : Complexe ESCRT-0.**  
Adaptée de (Williams and Urbe, 2007).

De manière intéressante la perte de l'interaction entre Vps27 et Vps23 n'entraîne pas de défaut d'internalisation des cargos ubiquitinés ni de défaut de formation de MVB comme c'est le cas lors d'une perte de l'interaction entre Vps27 et Hse1 (Bilodeau et al., 2003). Le recrutement de ESCRT-1 par ESCRT-0 n'est donc pas indispensable pour l'internalisation des cargos et la formation du MVB ; cependant l'association des deux protéines de ESCRT-0 est nécessaire pour ces mêmes processus.

#### b. Le complexe ESCRT-1.

Le complexe ESCRT-1 (figure 23) fut d'abord considéré comme un hétérotrimère composé des protéines de classe E Vps23, Vps28 (VPS28) et Vps37 (dont il existe quatre paralogues chez les mammifères : VPS37A-B-C-D) (Katzmann et al., 2001; Toret et al., 2008). Mais, récemment, la protéine Mvb12 a été identifiée, chez la levure, comme appartenant également à ce complexe (Chu et al., 2006; Curtiss et al., 2007; Gill et al., 2007; Katzmann et al., 2001; Oestreich et al., 2007b). Il n'existe pas d'homologue mammifère connu pour Mvb12. La délétion de *MVB12* ne présente pas de phénotype de classe E mais un défaut de tri spécifique aux cargos de la voie VPS ; la protéine Mvb12 aurait donc plutôt un rôle de liaison du complexe avec certains cargos (Chu et al., 2006; Oestreich et al., 2007b). Une fois recruté à la membrane endosomale, le complexe ESCRT-1 se lie au cargo ubiquitiné *via* le domaine UEV de Vps23 (Sundquist et al., 2004; Teo et al., 2004a). Des mutations dans le domaine UEV induisent un phénotype de classe E, suggérant que des composants de la machinerie ESCRT situés en aval sont activés par la reconnaissance de cargos ubiquitinés *via*

ce domaine (Katzmann et al., 2001). Chez la levure, le complexe ESCRT-1 recrute le complexe ESCRT-2 *via* le domaine C-terminal de Vps28 (Gill et al., 2007; Pineda-Molina et al., 2006) et un domaine en doigts de zinc de Vps36 (EAP45) de ESCRT-2 (Gill et al., 2007; Teo et al., 2006). Chez les mammifères, VPS36 ne possède pas le domaine en doigts de zinc et aucune interaction n'a été montrée entre les complexes ESCRT-1 et ESCRT-2. Cependant, des interactions ont été montrées par double-hybride chez la levure, entre hVps23 pour ESCRT-1 et les protéines Vps22 (EAP30/SNF8) et hVps36 du complexe ESCRT-2 (Langelier et al., 2006).



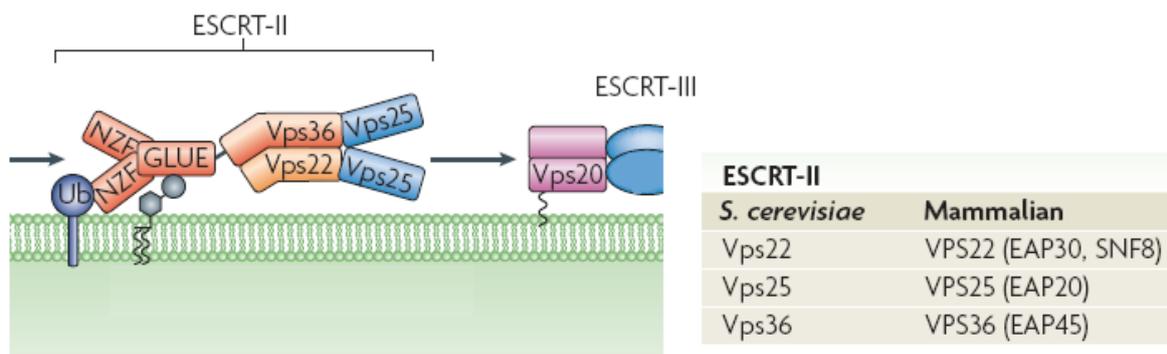
**Figure 23 : Complexe ESCRT-1.**

Adaptée de (Williams and Urbe, 2007).

### c. Le complexe ESCRT-2.

Le complexe ESCRT-2 (figure 24) est composé des protéines de classe E Vps22 (EAP30), Vps36 (EAP45) et de deux exemplaires de Vps25 (EAP20) (Hierro et al., 2004; Teo et al., 2004b). La région N-terminale de Vps36 contient un domaine GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45) qui lie le PI(3)P (Slagsvold et al., 2005). Chez la levure, il existe une insertion de deux structures en doigt de zinc au niveau du domaine GLUE. Ces deux doigts de zinc sont les domaines NZF-C et -N (Npl4-type zinc-finger C et N) : le NZF-N lie Vps28 (Gill et al., 2007) et le NZF-C lie l'ubiquitine (Alam, Sun et al. 2004). Chez les mammifères, le domaine GLUE de EAP45, qui ne possède pas de domaine NZF, est tout de même capable de lier l'ubiquitine *in vitro* (Slagsvold et al., 2005). Chez la levure, l'absence de composants de ESCRT-2 perturbe le tri des protéines ubiquitinées et entraîne leur accumulation dans le compartiment de classe E. Mais dans les cellules de mammifère, la réduction d'expression de protéines de ESCRT-2 par siRNA n'a aucun effet sur la dégradation du récepteur de l'hormone de croissance (EGFR) (Bowers and Stevens, 2005). Le fait qu'il existe des cargos capables d'être internalisés en absence de ESCRT-2 pourrait s'expliquer par le fait qu'une des protéines de ESCRT-3 chez les mammifères est capable de lier le PI(3,5)P<sub>2</sub>

(Vps24) (Whitley et al., 2003) ; le recrutement de ESCRT-3 par ESCRT-2 ne serait alors plus nécessaire. Ce recrutement de ESCRT3 par ESCRT2 se déroule différemment des recrutements précédents car ESCRT-3 ne s'assemble pas dans le cytosol mais uniquement à la membrane endosomale. Le domaine C-terminal de Vps25 se lie à la protéine Vps20 (CHMP26) du complexe ESCRT-3 qui va permettre le recrutement des autres composants de ESCRT-3 (Babst et al., 2002a; Teo et al., 2004b; Yorikawa et al., 2005).

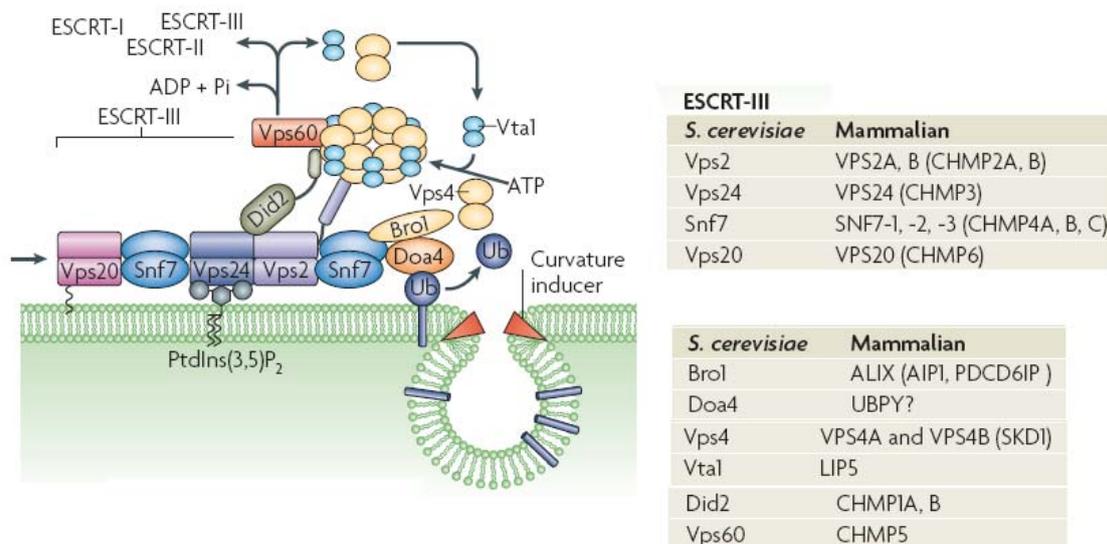


**Figure 24 : Complexe ESCRT-2.**  
Adaptée de (Williams and Urbe, 2007).

#### d. Le complexe ESCRT-3.

Les protéines constituant le complexe ESCRT-3 (figure 25) sont, avec Vps4 (SKD1), les protéines de la machinerie ESCRT les plus conservées. Les quatre composants principaux du complexe ESCRT-3 sont les protéines de classe E qui arrivent à la membrane endosomale dans l'ordre suivant : Vps20 (CHMP6), Vps32/Snf7 (CHMP4A-C), Vps24 (CHMP3) et Vps2 (CHMP2A-B) (Babst et al., 2002b; Teis et al., 2008). Ces protéines présentent toutes une organisation similaire, avec une région N-terminale acide et une région C-terminale basique (Muziol et al., 2006). Elles sont présentes sous forme de monomère dans le cytoplasme où elles sont inactivées par un repliement de leur domaine C-terminal acide qui interagit avec l'extrémité N-terminale (Lata et al., 2008; Muziol et al., 2006; Zamborlini et al., 2006). Les facteurs responsables de leur activation ne sont pas encore identifiés car ces protéines interagissent avec un grand nombre de partenaires. Leur arrivée à la membrane endosomale, où elles sont activées, est médiée par Vps25 de ESCRT-2 (Teo et al., 2004b; Yorikawa et al., 2005). Aucune des protéines du complexe ESCRT-3 ne possède de site de liaison à l'ubiquitine. L'ancrage à la membrane du complexe se fait *via* Vps24 qui peut fixer le PI(3,5)P<sub>2</sub> (Whitley et al., 2003) et *via* la myristoylation de l'extrémité N-terminale de Vps20 (Babst et al., 2002b; Yorikawa et al., 2005). Lorsqu'elles sont activées, les quatre principales protéines de ESCRT-3 sont regroupées en deux sous-complexes Vps2/Vps24 et Vps20/Snf7

(Babst et al., 2002b), associés à la membrane endosomale (Saksena et al., 2009). Leurs motifs présents à l'extrémité C-terminale sont alors exposés, leur permettant de s'associer à des domaines MIT (Microtubule-interacting and transport) que possèdent des protéines intervenant dans les étapes tardives du tri au MVB telles Vps4 et Vta1 (Hurley and Yang, 2008). Les protéines du complexe ESCRT-3 sont capables de s'associer en filaments capables de déformer les membranes et ainsi contribuer à l'invagination des vésicules du MVB (Muziol et al., 2006; Wollert et al., 2009).



**Figure 25 : Complexe ESCRT-3 et protéines associées.**  
Adaptée de (Williams and Urbe, 2007).

e. Les protéines de classe E associées au complexe ESCRT-3.

Les protéines de classe E qui sont recrutées à la membrane externe du MVB par ESCRT-3 sont Vps60 (CHMP5), Vps4, Vta1 (LIP5), Bro1 (ALIX) et Did2 (CHMP1A-B) (figure 25).

-Bro1 interagit avec le complexe ESCRT-3 *via* Snf7 (Bowers et al., 2004) mais également avec ESCRT-1 *via* Vps23 (Nikko and Andre, 2007) et avec Vps4. Il semble que son rôle soit d'activer l'ubiquitine hydrolase Doa4 pour médier la déubiquitination des cargos.

-Vps4 est une enzyme AAA-ATPase (ATPase associated with a variety of cellular activities) (Babst et al., 1997). En l'absence d'ATP, elle existe sous forme de dimère dans le cytoplasme (Babst et al., 1998). Lorsque le dimère est activé par la présence d'ATP, un multimère constitué de 12 à 14 copies de Vps4 se forme. Ce multimère peut s'associer *via* ses nombreux domaines MIT (douze à quatorze) aux domaines MIM1 (MIT-interacting motif 1) de Vps2 (Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007), au domaine MIM2 de Vps20 (Yeo

et al., 2003) ainsi qu'à la plupart des régions C-terminales des sous-unités du complexe ESCRT-3, avec une affinité moins forte (Kieffer et al., 2008). Le multimère Vps4 est associé en complexe avec la sous-unité non catalytique Vta1, qui, en plus de permettre une augmentation de l'hydrolyse de l'ATP (Azmi et al., 2008; Yeo et al., 2003), possède également deux domaines MIT qui s'associent aux protéines intervenant dans les étapes tardives du tri au MVB (Azmi et al., 2008; Shim et al., 2008; Xiao et al., 2008). L'activité ATPase de Vps4, associée à la multiplicité des interactions, permet le désassemblage du complexe ESCRT-3 et entraîne le recyclage des sous-unités du complexe qui retournent à leur forme cytosolique inactive (Wollert et al., 2009). Ce désassemblage semble essentiel pour la formation des vésicules (Odorizzi et al., 1998); cela pourrait s'expliquer par le fait que lorsque le désassemblage n'a pas lieu, les protéines du complexe ESCRT-3 ne sont pas recyclées et ne peuvent être à nouveau recrutées pour la formation d'une nouvelle vésicule.

-Did2 et Ist1 sont recrutées au niveau de la membrane endosomale *via* le domaine C-terminal de Vps4 et *via* le domaine N-terminal de Vps24. Tout comme Vta1 ces protéines s'associent à Vps4 et fonctionnent comme des adaptateurs importants pour cette dernière puisqu'elles semblent avoir un rôle positif sur l'internalisation des cargos au MVB (Azmi et al., 2006; Bowers et al., 2004; Nickerson et al., 2006; Rue et al., 2008; Shiflett et al., 2004).

-Vps44/ Nhx1 est la seule protéine de classe E à être trans-membranaire. Il s'agit d'un échangeur de sodium/proton (de la famille NHE (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger)) localisé au MVB. Sa fonction dans la formation des vésicules reste inconnue mais des expériences ont montré que le transport d'ions *via* Nhx1p est requis pour leur formation (Bowers et al., 2000).

Deux modèles (figure 26) ont été proposés pour l'organisation des protéines Vps de classe E lors du tri des cargos ubiquitinés dans les vésicules internes du MVB. Le modèle séquentiel (Hurley and Emr, 2006) propose que le cargo ubiquitiné soit d'abord pris en charge par ESCRT-0 puis par les autres complexes qui agissent en aval. Les complexes ESCRT-1-2 et -3 sont activés et recrutés et se transmettent successivement le cargo ubiquitiné afin qu'il soit internalisé dans les vésicules internes du MVB. Le modèle en cercle concentrique (Nickerson et al., 2007) propose que ESCRT-0 joue un rôle central. Les complexes ESCRT-1 et -2 viendraient se concentrer autour de ESCRT-0 et, en périphérie, ESCRT-3 recruterait les protéines de classe E monomérique permettant la dissociation de ESCRT-0, 1 et 2 puis finalement de ESCRT-3.



### 3. Fusion avec la vacuole.

La vacuole est le compartiment final d'adressage de nombreuses voies du trafic intracellulaire (Weisman, 2006). Elle est impliquée dans des processus de fusion avec différents compartiments, parmi lesquels d'autres vacuoles (fusions homo-typique), des vésicules de la voie AP3 et les MVBs (fusions hétéro-typique). La fusion permet aux protéines d'atteindre soit le lumen, soit la membrane de la vacuole. Quel que soit le type de compartiment, la fusion avec la vacuole se fait en plusieurs étapes successives : l'amorçage, l'attachement, l'arrimage et la fusion (Conradt et al., 1994; Haas et al., 1994) et dépend d'une machinerie qui est conservée de la levure à l'homme. Les principaux facteurs de fusion sont les SNAREs (SNAP (SNF (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein) receptors), la Rab GTPase Ypt7 et Vps21 ainsi que les complexes HOPS (Homotypic vacuole fusion and protein sorting) et CORVET (class C core vacuole/endosome tethering).

Les SNAREs sont des protéines ancrées à la membrane qui possèdent un domaine coiled-coil conservé, nécessaire à la régulation de la fusion. En fonction de la nature du résidu conservé (glutamine ou arginine) on distingue les Q-SNAREs et les R-SNAREs et en fonction de la localisation membranaire on distingue les v-SNAREs (Vesicles) et les t-SNAREs (target) (Fasshauer et al., 1998; Rothman, 1994). Lors de l'étape d'arrimage, les SNAREs du compartiment à fusionner et de la vacuole s'associent. Ce complexe, en trans, crée des contraintes physiques conduisant à la fusion des deux membranes (Collins and Wickner, 2007; Pobbati et al., 2006). Après la fusion, toutes les SNAREs sont localisées sur la même membrane et forment un complexe en cis qui est désassemblé par Sec17 ( $\alpha$ -SNAP) et Sec18 (NSF) pour permettre le recyclage des SNAREs (Schwartz and Merz, 2009).

Les complexes HOPS et CORVET, également impliqués dans l'association et la fusion des membranes, sont capable de s'associer au protéines SNAREs et aux phospholipides des membranes (Collins et al., 2005; Stroupe et al., 2006). Le complexe HOPS intervient dans la fusion homo-typique et le complexe CORVET dans la fusion hétéro-typique (Nickerson et al., 2009; Ostrowicz et al., 2008). Ces deux complexes sont constitués d'un même noyau de quatre Vps de classe C (Vps11/Pep5, Vps16, Vps18/Pep3 et Vps33) et de deux autres protéines : Vps39/Vam6 et Vps41/Vam2 (Classe B) pour HOPS ou Vps3 et Vps8 (Classe D) pour CORVET (Nickerson et al., 2009; Peplowska et al., 2007; Price et al., 2000; Sato et al., 2000; Seals et al., 2000). Les protéines Vam6/Vps39 et Vps3 possèdent une activité GEF

permettant respectivement l'activation Ypt7 (homologue chez la levure de Rab7) et Vps21 (homologue chez la levure de Rab5) (Hickey et al., 2009; Peplowska et al., 2007; Seals et al., 2000; Wurmser et al., 2000).

Parmi les autres protéines impliquées dans la fusion avec les vacuoles (ATPase vacuolaire, calmoduline...) on retrouve l'actine. En effet, des travaux ont montré que des mutants d'actine, ainsi que des anticorps dirigés contre Arp2/3 ou Las17, inhibent la fusion vacuolaire homo-typique entraînant chez la levure un phénotype de vacuoles fragmentées (Eitzen, 2003; Eitzen et al., 2002).

### **C. Les epsines.**

La famille des epsines possède des membres chez l'ensemble des eucaryotes. Chez la levure, les représentants de cette famille sont les protéines Ent1 à 5. La première epsine a été découverte chez les mammifères, comme une protéine pouvant interagir avec la protéine EPS15, impliquée dans l'endocytose médiée par la clathrine (Benmerah et al., 1999). Les epsines sont des protéines cytoplasmiques caractérisées par un domaine ENTH (Epsin N-terminal homology). Ce domaine d'environ 150 acides aminés permet aux epsines d'être recrutées aux membranes *via* leur interaction avec les phosphoinositides membranaires (De Camilli et al., 2002). Les epsines peuvent être classées selon leur spécificité lipidique et leur fonction car elles interviennent à des étapes différentes du trafic intracellulaire. Ent1 et Ent2, qui interagissent avec le PI(4,5)P<sub>2</sub>, sont impliquées dans l'internalisation à la membrane plasmique lors de l'endocytose (Wendland et al., 1999). Ent3 et Ent5, qui interagissent avec le PI(3,5)P<sub>2</sub>, sont impliquées au niveau de l'appareil de Golgi (Duncan et al., 2003) et du tri protéique au MVB (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). Le rôle de Ent4 est encore inconnu.

#### **1. Fonction des epsines Ent3 et Ent5 au niveau de l'appareil de Golgi.**

Si les délétions de *ENT3* ou de *ENT5* ne présentent aucun phénotype, la double délétion provoque un retard de croissance des levures ainsi que des défauts dans le trafic membranaire entre l'appareil de Golgi et le MVB, ainsi que dans le tri protéique au MVB (Eugster et al., 2004).

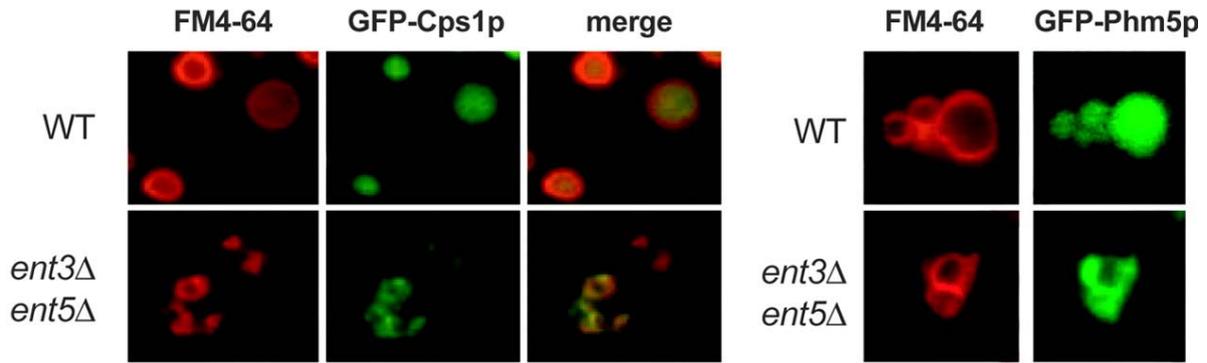
Les vésicules impliquées dans le passage du TGN vers le MVB sont entourées d'un manteau de clathrine. La clathrine participe à la formation de la vésicule en exerçant une force

qui va déformer la membrane du TGN. Le recrutement de la clathrine au TGN se fait *via* des adaptateurs de deux types : les GGAs (1 et 2) (golgi localizing  $\gamma$  adaptin ear domain homology ARF-binding proteins) et AP-1 (Adaptor-protein-1) (Panek et al., 1997; Yeung et al., 1999). Ces adaptateurs sont eux même recrutés à la membrane du TGN par l'intermédiaire des GTPases ARF (ADP ribosylation factor) (Meyer et al., 2005; Puertollano et al., 2001).

Les epsines Ent3 et Ent5 contiennent deux motifs acides, que ne possèdent pas les autres epsines de levure, permettant de lier le domaine GAE (Gamma adaptin ear) des GGAs. Ent5 est par ailleurs capable d'interagir *in vivo* avec AP-1 (Duncan et al., 2003). La localisation de Ent3 à la membrane du TGN dépend de GGA2, mais celle de Ent5 ne dépend ni des GGAs ni de AP-1 (Costaguta et al., 2006). Les deux protéines sont par ailleurs capable d'interagir *in vitro* avec la clathrine (Duncan et al., 2003; Friant et al., 2003; Wendland et al., 1999). Toutes ces données montrent bien que Ent3 et Ent5 contribuent à l'assemblage de la clathrine au niveau du TGN en coopérant avec AP-1 et les GGAs. Cette fonction est conservée chez les mammifères où l'Epsine R possède deux motifs acides d'interaction avec les GGAs et un site de liaison à la clathrine (Hirst et al., 2003; Kalthoff et al., 2002; Mills et al., 2003; Wasiak et al., 2002). Le domaine ENTH de l'Epsine R est par ailleurs capable de lier le PI(4)P qui se trouve en abondance au Golgi (Hirst et al., 2003; Mills et al., 2003). Epsine R est également impliquée dans le transport rétrograde entre l'endosome précoce et le TGN (Saint-Pol et al., 2004).

## **2. Fonction des epsines Ent3 et Ent5 au niveau du MVB.**

D'autres études ont montré que Ent3 et Ent5 sont localisées à la membrane externe du MVB par liaison spécifique du domaine ENTH avec le PI(3,5)P<sub>2</sub> (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). La lipide kinase Fab1, qui synthétise le PI(3,5)P<sub>2</sub> à partir du PI(3)P, est localisée au niveau des endosomes et de la membrane vacuolaire (Odorizzi et al., 1998). Il a été montré, grâce à des études de microscopie à fluorescence et de fractionnement subcellulaire, que dans le mutant *fab1 $\Delta$* , Ent3 n'est plus localisée aux endosomes (Friant et al., 2003). Dans les mutants *fab1 $\Delta$* , *ent3-1* (une mutation dominante dans le domaine ENTH) ou *ent3 $\Delta$ ent5 $\Delta$* , les cargos ubiquitinés Cps1 et Phm5 sont localisés à la membrane et non au lumen de la vacuole (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003; Odorizzi et al., 1998; Shaw et al., 2003).



**Figure 27 : Localisation des cargos de la voie VPS chez le double mutant *ent3Δent5Δ*.**

Les protéines Cps1 et Phm5 empruntant la voie VPS sont étiquetées GFP et leur localisation est observée ; Elles ne sont plus localisées dans le lumen de la vacuole dans le double mutant mais à la membrane de cette dernière (visualisée en rouge à l'aide du colorant lipophile FM4-64). Adaptée de (Eugster, Pecheur et al. 2004).

Cependant, contrairement au mutant *fab1Δ*, l'absence des deux epsines ne provoque ni une incapacité à acidifier la vacuole ni l'élargissement de cette dernière ; au contraire, les vacuoles sont fragmentées (Eugster et al., 2004). Ent3 et Ent5 ne sont pas capables d'interagir avec l'ubiquitine et ne semblent pas intervenir dans le processus d'ubiquitination. Des expériences de chromatographie d'exclusion sur colonne et de co-immunoprécipitation ont montré que Ent3 et Ent5 co-fractionnent avec Vps27 dans des complexes de haut poids moléculaire (500 à 750 kDa) (Eugster et al., 2004). Comme le montrent des expériences de GST pull-down dans les levures sauvages ou dans des levures *hse1Δ*, les trois protéines interagissent dans ces complexes indépendamment de Hse1 (Hse1 et Vps27 forment le complexe ESCRT-0). La délétion de *VPS27* provoque un changement dans la distribution de Ent3 et de Ent5. Ent3 se retrouve dans des fractions de très haut poids moléculaire tandis que Ent5 se retrouve dans des fractions de bas poids moléculaire. Par contre la délétion de *ENT5* ne change pas le profil d'élution de Vps27 et de Ent3. Cela nous indique que c'est Vps27 qui permet le recrutement des deux epsines dans les fractions de 500 à 750 kDa et que le recrutement de Ent3 est indépendant de celui de Ent5 (Eugster et al., 2004). Chez les mammifères, la fonction de tri des epsines au MVB n'est pas conservée. En effet, un traitement par interférence à ARN des epsines n'inhibe pas l'internalisation de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) au niveau du MVB et son adressage au lysosome (Saint-Pol et al., 2004).

## D. Objectifs.

Lorsque j'ai débuté ma thèse les études effectuées sur les protéines Lsb3 et Lsb4 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* indiquaient que ces deux protéines jouaient un rôle au niveau des patches corticaux d'actine. Mais les résultats des puces protéiques que venait d'obtenir Vanessa Addis et Sylvie Friant montraient une interaction tout à fait inattendue de Lsb3 avec les epsines Ent3 et Ent5. Ces epsines, contrairement à d'autres protéines de la famille des epsines, ne sont pas présentes à la membrane plasmique et aux sites de formation de l'endocytose. Ces données impliquent un rôle putatif de l'actine dans les mécanismes de formation de vésicules au niveau du Golgi ou des MVBs.

Mon travail de thèse a donc consisté dans un premier temps à confirmer l'interaction entre Lsb3 et les epsines *in vitro* et *in vivo*. Je me suis également intéressé aux interactions possibles entre Lsb4 et les epsines car Lsb4 est très similaire à Lsb3, mais n'était pas présente sur les puces protéiques du fait de son faible taux d'expression.

Je me suis également intéressé à la localisation des protéines Lsb3 et Lsb4 et des epsines les unes par rapport aux autres. J'ai ainsi regardé si elles co-localisaient ou si la délétion de *LSB3* et *LSB4* pouvait entraîner un changement de localisation des epsines, ceci afin de voir si ces protéines pouvaient se trouver au sein de complexes communs.

Les protéines Ent3 et Ent5 sont localisées à l'appareil de Golgi et au MVB et sont indispensables pour l'internalisation ubiquitine-dépendante des protéines dans le MVB. Ent3 et Ent5 semblent impliquées dans le processus d'invagination à la membrane du MVB. Le fait que ces deux protéines interagissent avec Lsb3 qui elle-même interagit avec Las17, pourrait indiquer un rôle de l'actine dans ce processus. Aussi j'ai cherché à déterminer si Lsb3 était également impliqué dans le trafic intracellulaire au niveau du MVB en étudiant la localisation de différents cargos dans les mutants *lsb3* et *lsb4*.

## Résultats

Lors de mon arrivée au laboratoire, Vanessa Addis, doctorante dans le laboratoire de Sylvie Friant, avait réalisé des expériences de puces protéiques utilisant les protéines Ent3 et Ent5 comme appâts. Sur les puces se trouvaient les produits de 4088 ORFs (Open Reading Frame : Phase Ouverte de Lecture) de *S. cerevisiae* - représentant la majorité des protéines solubles. Parmi tous les interactants obtenus se trouvait la protéine Lsb3. L'état des connaissances lors de mon arrivée au laboratoire était que Ent3 et Ent5 sont localisées aux endosomes (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003) tandis que Lsb3 est localisée dans des taches corticales d'actine, à la membrane plasmique (Dewar et al., 2002) ; il n'était donc pas intuitif de voir ces protéines interagir ensemble.

Dans un premier temps, mon travail de thèse a consisté à confirmer les interactions obtenues lors de l'expérience des puces protéiques, tout d'abord par GST pull-down *in vitro* puis par co-immunoprécipitation *in vivo*. Ensuite, afin de déterminer à quel niveau ces interactions pouvaient se faire, je me suis intéressé à la localisation des différentes protéines ainsi qu'à différentes voies du trafic intracellulaire. Etant donné que le double mutant *ent3Δ ent5Δ* affecte la voie VPS, je me suis plus particulièrement concentré sur l'effet de délétion de *LSB3* et de son homologue *LSB4* au niveau de cette voie.

Dans le premier chapitre de cette partie je présenterai les résultats obtenus au cours de ma thèse sous forme d'article qui sera prochainement soumis dans une revue scientifique. Ces résultats mettent en avant le rôle de Lsb3 dans le processus d'internalisation des protéines ubiquitinées dans le MVB. Ils portent essentiellement sur les interactions entre Lsb3 et Ent5 ainsi que sur l'étude du trafic intracellulaire entre l'appareil de Golgi et la vacuole dans des cellules pour lesquelles les gènes *LSB3* et *LSB4* ont été délétés.

Dans le chapitre suivant, je présenterai les expériences complémentaires de trafic intracellulaire ne figurant pas dans l'article.

Dans le troisième chapitre je présenterai, les résultats portant sur la localisation cellulaire des différentes protéines ainsi que des expériences de localisation de Ent3 et Ent5 lorsque *LSB3* et *LSB4* sont délétés.

Dans le quatrième chapitre je présenterai, les résultats que j'ai obtenu concernant le rôle de Lsb3 et Lsb4 au niveau du cytosquelette d'actine.



## I Article

Nous présentons ici une partie de nos résultats, sous forme d'article. Mon travail a contribué à montrer une interconnexion entre la machinerie de l'actine et le tri aux corps multi-vésiculaires, *via* l'interaction entre les protéines Lsb3 et Ent5.

Il est connu que la polymérisation de l'actine branchée est initiée par le complexe Arp2/3. Ce nucléateur est lui même activé par les protéines de la famille WASP. Chez la levure, le seul homologue de la famille WASP est la protéine Las17. Un crible double hybride, effectué au laboratoire entre la protéine Las17 et une banque génomique (Madania et al., 1999) a permis d'identifier deux protéines présentant un fort taux d'identité : Lsb3 et Lsb4 (Ysc84). Ces protéines possèdent à leur extrémité C-terminale un domaine SH3 qui interagit avec les domaines polyproline (présents chez Las17) et à leur extrémité N-terminale un domaine YAB qui interagit avec l'actine lorsque le domaine SH3 interagit avec le domaine polyproline de Las17 (Robertson et al., 2009). Jusqu'à présent les études faites sur ces protéines ont montré qu'elles étaient localisées au niveau des sites d'endocytose dans les taches corticales d'actine. Il a par ailleurs été montré que Lsb4 a été impliquée dans l'assemblage des filaments d'actine en câbles.

Pour résumer, nous montrons dans notre étude que Lsb3 interagit avec l'epsine Ent5. Les epsines, au nombre de cinq chez la levure jouent des rôles spécifiques dans le trafic intracellulaire. Les epsines Ent3 et Ent5 sont impliquées, chez la levure *S. cerevisiae* dans le transport des protéines de la voie VPS entre l'appareil de Golgi et les endosomes. Elles sont de plus requises pour l'internalisation des protéines ubiquitinées au MVB. Notre travail montre, grâce à l'étude de cargos spécifiques dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δlsb4Δ*, que Lsb3 et Lsb4 sont également requises dans ce processus d'internalisation.

En conséquence, nous proposons l'existence d'un complexe contenant Lsb3 et Ent5, impliqué dans l'invagination de la membrane endosomale. L'actine pourrait alors être la force permettant l'internalisation des protéines au MVB.



## **Lsb3 and Ent5 protein interaction connect the actin machinery with the Multivesicular body sorting**

Vincent Dalibard<sup>1</sup>, Vanessa Addis<sup>2</sup>, Johan de Craene<sup>2</sup>, Sylvie Friant<sup>2</sup>, Barbara Winsor<sup>1</sup>, Gladys Mirey<sup>1</sup>

1. UMR7156 CNRS - Université de Strasbourg, Actin cytoskeleton and trafficking,  
21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

2. UMR7156 CNRS - Université de Strasbourg, Membrane trafficking and lipid signaling,  
21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

Running title: Actin and Multivesicular body sorting



## **Abstract :**

Actin polymerization of branched actin is initiated by the Arp2/3 complex. This nucleation factor is activated by Las17, the *S. cerevisiae* orthologue of WASP. Among the Las17 binding proteins (Lsb) identified in a two-hybrid screen, we focused on Lsb3 and Ysc84 (Lsb4). These proteins, highly homologous to each other, present a C-terminal SH3 domain that interacts with proline-rich regions and a N-terminal domain named YAB (Ysc84 Actin Binding) that interacts with actin in presence of Las17. Different studies have shown that Lsb3 and Ysc84 localize to actin patches at the plasma membrane during endocytosis.

Here, we show that Lsb3 interacts with the Epsin Ent5, both *in vitro* and *in vivo*. Epsins play specific roles in intracellular trafficking, Ent3 and Ent5 being required for protein trafficking between the Golgi and the endosomes and involved in the MVB sorting of ubiquitinated cargos. By studying the Golgi-vacuole trafficking with GFP tagged cargos in strains deleted for *LSB3*, *YSC84* or both genes, we found a sorting defect specific for cargos internalization at the MVB. We propose that a complex containing Lsb3 and Ent5 exist at the endosomal membrane, playing a role in endosomal membrane invagination. This also suggests that actin would be a new player in MVB sorting in yeast.

Keywords: Actin, Epsin, Multivesicular body (MVB), Lsb3, Ysc84, yeast



## **Introduction :**

The actin cytoskeleton plays a key role in a variety of cellular processes such as intracellular trafficking, cell morphology and migration. Actin polymerization is tightly regulated and is initiated by nucleation factors such as the Arp2/3 complex. Las17, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* orthologue of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASP), is a Nucleation Promoting Factor (NPF) that activates the Arp2/3 complex (4, 6, 7). Different Las17 binding proteins (Lsb) were identified in a two-hybrid interaction screen (4). Among them, Lsb3 and its homologue Ysc84/Lsb4 present a C-terminal SH3 (Src Homology 3) and a N-terminal YAB (Ysc84 Actin Binding domain) domain. It is well known that SH3 domains interact with proline-rich regions (8) and Las17 display nine poly-proline motifs. The Ysc84 YAB domain interacts with actin in presence of a proline-rich fragment of Las17 (5). Lsb3 and Ysc84 are localized to actin patches, at the plasma membrane, and they are detected on endocytic vesicles during their movement inward from the membrane (3, 5, 9). Nevertheless these two proteins are not essential for endocytosis since Lucifer Yellow is internalized in yeast strains deleted for *LSB3*, *YSC84* or both genes (3), whereas Arp2, Arp3, Las17 and others NPF as well as actin are essential for yeast endocytosis (10-14).

Thus, despite the good conservation of Lsb3 and Ysc84 from yeast to human (3), their *in vivo* function remains unclear. Here, we show that Lsb3 and Ysc84 are required for the sorting of ubiquitinated cargos at the late endosome or Multivesicular body (MVB) in *S. cerevisiae*. The endosomal system is a key sorting station in membrane trafficking including endocytic, biosynthetic and exocytic pathways. At the MVB, membrane proteins destined to the vacuolar/lysosomal lumen are internalized into vesicles formed by inward invagination of the outer endosomal membrane and subsequently delivered to the vacuolar lumen upon MVB/vacuole fusion (15). Ubiquitination is a specific signal triggering cargos internalization into the MVB vesicles (16-20). MVB sorting requires the coordinated function of protein complexes, termed endosomal sorting complex required for transport or ESCRT (17). MVB sorting of ubiquitinated cargos is also regulated by the lipid phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) produced by the Fab1 kinase (18, 21).

Two yeast Epsins, Ent3 and Ent5, have been identified as PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> effectors required for ubiquitin-dependent MVB sorting (1, 2). Epsins are cytoplasmic proteins recruited to membranes *via* their ENTH (Epsin N-Terminal Homology) domain, allowing the binding to

PtdIns (22, 23). In yeast there are five Epsins named Ent1 to Ent5 (24, 25). Ent1 and Ent2 are involved in endocytosis (24). Ent3 and Ent5 are required for Golgi and endosome sorting (25). At the Golgi, their ENTH domain binds to SNAREs like Vti1 and Pep12, while their C-terminus interacts with the clathrin adaptors Gga and AP-1 (25-28). At the MVB, Ent3 and Ent5 are required for ubiquitinated cargos sorting, like carboxypeptidase S Cps1 or the polyphosphatase Phm5 (1, 2). Here, we show that Lsb3 interacts with Ent5, both *in vitro* and *in vivo*. Analysis of the intracellular trafficking of different cargos in *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δ ysc84Δ* mutant cells shows that they display a specific defect in MVB sorting of ubiquitinated cargos. Our results link the actin cytoskeleton machinery to the late endosomal MVB sorting.

## **Results and discussion**

### **Ent5 and Lsb3 proteins interact *in vitro***

A protein-protein interaction screen was performed to identify new direct partners of Ent3 and Ent5, using yeast protein microarrays (Yeast ProtoArray® Invitrogen) (29) (Fig 1). Ent3 and Ent5 were tagged with V5-6XHis at their N- or C-terminus to avoid positional tag-effect on interactions. The fusion proteins were produced in *E. coli* and purified on Ni-NTA-agarose beads. The purified V5-6XHis tagged Ent3/5 proteins were incubated on the Yeast ProtoArray® chips containing a large portion of the yeast proteome. The interactions were detected using anti-V5 antibody. This allowed the identification of 42 direct partners for N- and C-tagged Ent3 and 31 for N- and C-tagged Ent5. Among them, we found Apl4 subunit of AP-1 adaptor complex, previously characterized by two-hybrid as an Ent3 and Ent5 binding partner, validating this approach (25). However, not all known Ent3 or Ent5 partners were found in the screen, certainly because not all *S. cerevisiae* proteins are present on the proteomic ship. For example, the membrane SNARES Vti1 or Pep12 were not present on the protein chips due to troubles in protein purification.

Among the new partners found in this screen, the Lsb3 protein was found to interact with N- and C-terminally tagged Ent5 with a Z-score of 3.61 and 3.17 respectively. Moreover, Lsb3 was interacting with N-terminally tagged Ent3, with a Z-score of 3.14 but not with the C-terminally tagged Ent3. Z-scores represent the amount of the bait present on the spots, interacting with the spotted protein, and they were calculated by the GenePix software based on the positive and negative controls of the array (29). Ysc84, the close homologue of Lsb3 which may have a redundant function, was not present on the array. Thus, we set out to confirm the Ent3 and Ent5 interactions with Lsb3 and determine whether or not Ysc84 interacts with Ent3 or Ent5 by *in vitro* and *in vivo* assays.

Glutathione-S-transferase (GST) pull-down experiments were performed with GST, GST-Ent3 and GST-Ent5 fusion proteins. The recombinant proteins were produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography on glutathion-Sepharose beads. GST, GST-Ent3 and GST-Ent5 proteins bound to the beads were then incubated with yeast protein extracts expressing HA-tagged Lsb3 or Ysc84 proteins. After extensive wash, the proteins bound to the beads were denatured, resolved by SDS-PAGE and revealed by anti-HA Western blotting. These GST pull-down experiments confirmed that GST-Ent5 interacts with Lsb3-HA, but not

with Ysc84-HA. However, we did not confirm the binding between GST-Ent3 and Lsb3-HA or show an interaction to Ysc84-HA. These results show that, in these conditions, Lsb3 interacts with Ent5 but not with Ent3 (Fig 2A). This is consistent with results obtained on the proteomic arrays that suggested a better binding of Lsb3 to Ent5 than to Ent3. The tagging of Ysc84 at its C-terminus with the HA-tag could alter its potential interaction with the Ent3/5 epsins. However, this seems very unlikely as a similar tagging of Lsb3 did not affect Ent5 binding, and Ysc84 is highly homologous to Lsb3. Another explanation for the absence of interaction between Ysc84 and Ent3/5 is the low level of Ysc84 expression in yeast cells, compared to Lsb3 (30).

### **Ent5 is co-immunoprecipitated with Lsb3**

Then we performed a co-immunoprecipitation assay with Myc-tagged Lsb3 and endogenous Ent5 proteins on yeast total extracts. A whole protein extract from yeast cells expressing both Lsb3-Myc and Las17-GFP was immunoprecipitated with anti-Myc monoclonal antibodies linked to proteinA/G-Sepharose beads. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by anti-Ent5, anti-GFP and anti-Pgk1 Western-blot. The phosphoglycerate kinase Pgk1 is an abundant soluble protein that was used as negative control whereas the Las17-GFP fusion protein was used as a positive control. The results show that Las17 and Ent5, but not Pgk1, were co-immunoprecipitated with Lsb3 (Fig 2B). Altogether, these results show that Lsb3 is interacting *in vitro* and *in vivo* with Ent5 and may be involved in the same membrane trafficking pathways as this yeast epsin.

### **Lsb3 and Ysc84 are required for the sorting of biosynthetic cargos at the MVB**

Ent3 and Ent5 are required for the MVB sorting of ubiquitinated cargos (1, 2, 31). To determine whether Lsb3 and/or Ysc84 were also implicated in this process, we tested the MVB sorting of different proteins in the *lsb3Δ* and/or *ysc84Δ* mutants. We used GFP-tagged Cps1 (Carboxypeptidase S) and Phm5 (a polyphosphatase), two cargos ubiquitinated by the Rsp5 ubiquitin ligase (32-34). Cps1 and Phm5 sorting is also PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-dependent. In wild-type cells, GFP-Cps1 and GFP-Phm5 localize into the vacuolar lumen whereas in *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δysc84Δ* cells, these cargos were localized at the vacuolar membrane (Fig 3A and 3B). A similar mis-localization at the vacuolar membrane is observed in *ent3-1 ent3Δent5Δ* and *fab1Δ* mutant cells (1, 2, 18, 35). These observations indicate that, in *lsb3Δ* and *ysc84Δ* mutant cells, these cargos do not incorporate into the MVB vesicles and

accumulate at the MVB limiting membrane. After fusion of the MVB with the vacuole, they stay at the vacuolar membrane. Moreover, even though Ysc84 was not found to interact with Ent5, *YSC84* deleted cells present a MVB sorting defect.

We also tested the MVB sorting of Sna3, a membrane protein of unknown function that is ubiquitinated by Rsp5 *via* direct interaction, but does not depend on the Fab1 PtdIns kinase for its MVB sorting (18, 19, 36, 37). In contrast to GFP-Cps1 and GFP-Phm5, the GFP-Sna3 cargo is properly localized to the vacuolar lumen in wild-type, *lsb3Δ* and *ysc84Δ* mutants cells (Fig.3C).

This shows that Lsb3 and Ysc84 are required for MVB sorting of biosynthetic ubiquitinated cargos like Cps1 and Phm5 which is dependent on Fab1, but not for the sorting of Sna3 which does not depend on PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> synthesis by Fab1. Thus Lsb3 and/or Ysc84 are not required for the formation of the MVB compartment *per se*, like the ESCRT subunits, but rather for the specific sorting of some cargos.

To test whether the Lsb3 and/or Ysc84 proteins are required for the biosynthetic trafficking of cargos that are not internalized into MVB internal vesicles, we analyzed the localization of DPAP-B (dipeptidyl aminopeptidase B) and Vam3 (vacuolar SNARE) fused to GFP, in wild-type, *lsb3Δ*, *ysc84Δ* or *lsb3Δ ysc84Δ* mutants cells. The sorting of DPAP-B at the Golgi is mediated by the AP-1 and GGA clathrin adaptors that interact with epsins Ent3 and Ent5 (18). Vam3 uses the AP-3 clathrin adaptor pathway from the Golgi to the vacuole (38). In wild-type cells, DPAP-B and Vam3 localize at the vacuolar membrane. The deletion of *LSB3* and/or *YSC84* did not affect the intracellular trafficking of these proteins, as GFP-DPAP-B and GFP-Vam3 are localized to the vacuolar membrane (Fig.4A and 4B).

The different analyses that were undergone with GFP-tagged cargos suggest that Lsb3, a new Ent5 binding partner, is rather implicated in MVB sorting than in AP-1/GGA dependent Golgi sorting. It was previously shown that the alteration of the clathrin adaptors function only results in a Golgi sorting delay and not in a complete trafficking block, and such a delay is difficult to detect by fluorescent cargos localization. Therefore, we monitored by radioactive pulse-chase the Golgi sorting and vacuolar delivery of CPY (carboxypeptidase Y) in the wild-type as well as in *lsb3Δ*, *ysc84Δ* or *lsb3Δ ysc84Δ* mutants cells. At t<sub>0</sub> after the <sup>35</sup>S labeled Met/Cys pulse, wild-type cells displayed two precursor forms of CPY, representing the endoplasmic reticulum ER (P1) and the Golgi-modified form (P2) of the protein. Upon

delivery to the vacuole, the Golgi precursor form is proteolytically processed, resulting in the mature form (M) of lower molecular weight (39). At t0, in *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δ ysc84Δ* cells, P1 and P2 forms of CPY were detected showing no general defects in Golgi functions. Moreover, at the different times of CPY transport and maturation in the vacuole, the protein pattern is similar to the one observed for the wild-type cells (Fig.5). Therefore, the CPY transport appeared to be unaffected in *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δ ysc84Δ* mutants cells. This is in contrast to results obtained for CPY pulse-chase experiments performed with *ent3-1* and *ent3Δ ent5Δ* cells which show a maturation delay (2), due to the function of these epsins as clathrin adaptors interactors.

We also monitored by radioactive pulse-chase the ER to Golgi vesicle mediated transport and the plasma membrane delivery of the GPI-anchored protein, Gas1, in wild-type, *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δ ysc84Δ* mutants cells (Fig 5). *GAS1* encodes a plasma membrane anchored 1,3-beta-glucanosyltransferase involved in the formation and maintenance of 1,3-beta-glucan of the cell wall. The Gas1 precursor is modified by removal of the C-terminal hydrophobic domain and covalent attachment of the glycosylphosphatidylinositol (GPI), which serves as a membrane anchor. The GPI is essential for the transport of Gas1 through the ER and Golgi towards the cell surface (40). After the pulse with <sup>35</sup>S labeled Met/Cys, wild-type cells show two different forms of Gas1, representing the ER Gas1 precursor and the GPI-modified higher molecular weight form. In *lsb3Δ*, *ysc84Δ* and *lsb3Δ ysc84Δ* cells, like for the wild-type after 10 minutes chase only the mature form remains, indicating that the Gas1 transport is unaffected in these mutants.

These membrane trafficking analyses show that Lsb3 and Ysc84 are not involved in the vacuolar protein sorting of all biosynthetic cargos, but rather in the specific MVB sorting of ubiquitinated cargos requiring Ent3, Ent5 and Fab1 PtdIns kinase for their sorting.

## **Lsb3 and Ysc84 proteins are found in membrane fraction**

We have shown that Lsb3 interacts with Ent5 and is also required for MVB sorting of some proteins. Lsb3 could be recruited by Ent5, at the PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-enriched sites of MVB sorting on the endosomal membrane. Despite its critical function for some cargos sorting at the MVB, Lsb3 is localized to actin patches and no clear endosomal localization could be observed by fluorescence microscopy (our unpublished data). Therefore subcellular fractionation experiments were performed, from yeast producing Lsb3-HA or Lsb4-HA at endogenous level. These experiments (Fig6) show that Lsb3 and Ysc84 are predominantly present in the P13 membrane fraction (plasma membrane, endoplasmic reticulum and vacuole) and P100 (Golgi and endosomes). This indicates that Lsb3 and Ysc84 are associated, as expected, with cell compartments like plasma membrane but also with Golgi and/or endosomes. Ent3 and Ent5 proteins are predominantly present in P13 but also slightly appear in P100 and S100 (1, 2). We suppose that Lsb3 and Ysc84 present in the P13 membrane fraction correspond to proteins associated with the plasma membrane in actin patches. The fraction present in P100 could correspond to Lsb3 and Ysc84 associated with Ent3 and Ent5 at endosomal membranes.

It was recently shown that Ysc84 acts as a factor promoting actin bundling *via* its YAB and SH3 domains, allowing interaction with Actin and Las17 respectively (5). Our personal results indicate that Lsb3 display the same activity (data not shown). Here we show that Lsb3 also interacts with Ent5, which binds PI(3,5)P<sub>2</sub> at the endosomal membrane *via* its ENTH domain (1). In conclusion, these results support a requirement of Lsb3 and Ysc84 at the endosomal level and suggest that actin could also be a key player in this trafficking step. Supporting a model of Lsb3 and Ysc84, in association with Ent3 and Ent5, at the endosomal level YAB domains of plant proteins are directly associated with FYVE (Fab1, YOTB, Vac 1, EEA1) domains (5). FYVE domains are specific PtdIns(3)P binding domains and PtdIns(3)P is enriched at endosomal membranes, where it recruits the ESCRT-0 MVB sorting complex (41-43).

An interaction between actin and the MVB sorting machinery was previously suggested in yeast (44) and in *Drosophila*. Several *S. cerevisiae* mutants (*las17-16* or *arp2Δ*) presenting defects in actin cortical patches also show a fragmented vacuolar phenotype (44). Moreover, Vps52 (Sac2), a protein involved in Golgi to vacuole pathway (45), has been found as a

suppressor of the *act1-1* mutation (46). Finally, in *D. Melanogaster*, a mutant of dVps28, an ESCRT-1 subunit, presents defects in actin cytoskeleton organization (47).

In conclusion, these results show a clear requirement for Lsb3, a Las17 binding protein, in MVB sorting of specific cargos and demonstrate that actin could also be a key player in this trafficking step. Endosomal membrane curvature would be initiated by Ent5 ENTH domain. We propose that, in parallel with the ESCRT machinery, a complex mediating actin polymerization is formed at the endosomal membrane. Ent5 ENTH domain binds PI(3,5)P<sub>2</sub> and, *via* Lsb3, would recruit an actin polymerization network. This would allow the invagination of endosomal membrane by pushing it in the endosomal lumen. This complex would then be disassembled and vesicle can be internalized.

## **Materials and methods**

### **Strain and media**

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1.

### **Protein array assay**

The Yeast ProtoArray® PPI membrane from Invitrogen were used. These chips contain 4088 Open Reading frame products from *S.cerevisiae*, tagged with a GST-6xHis Tag at the N-terminus (48). *ENT3* and *ENT5* were cloned in pET101/D-TOPO® and pET151/D-TOPO® bacterial expression vector which allow fusion of proteins with a 6xHis-V5 Tag at the C- or N-terminus. Ent3 and Ent5 proteins were expressed in *E.coli* and purified on Ni-NTA beads before the ProtoArray experiment.

The chips were first incubated with Bovine Serum Albumin 1% and then for 2h with 6µg purified N- or C-terminal V5-6xHis tagged Ent3 or Ent5. After several steps of washing, chips were incubated with 800µg of Alexa Fluor 647-streptavidin antibodies for 30 min. Fluorescent scans of each protein microarrays were obtained using an Axon GenePix scanner and analyzed using the GenPix program (Molecular devices).

### **Plasmids and DNA**

To obtain Ent3-6His-V5, 6His-V5-Ent3, Ent5-6His-V5 and 6His-V5-Ent5 constructs, yeast genes were amplified from the genomic DNA by PCR and cloned into pET101/D-TOPO® and pET151/D-TOPO® vectors. To obtain Ent3-GST and Ent5-GST yeast, genes were amplified from yeast genome by PCR. Vectors were then transformed in DH5a *E. coli* and BL21-DE3 cells, according to standard protocols.

Oligonucleotides used in this study are listed in Table 2.

### **Yeast transformation**

Strains containing GFP, MYC or HA tagged proteins were obtained using plasmids and oligonucleotides previously described (49). The double mutant strain yVD130 (lsb3Δ/Ysc84Δ) was obtained by disrupting the *LSB3* gene in the *ysc84Δ* strain. Double

mutant strain yVD335 (*lsb3-Myc/las17-GFP*) was generated by crossing yVD209 with yVD271, followed by sporulation and isolation of the [His<sup>+</sup> ; Geneticine resistant] haploids.

### **Fluorescence microscopy**

Living cells expressing GFP-fusion proteins were harvested at an OD<sub>600</sub> of 0.3 and resuspended in PBS for visualization. In vivo, labeling of yeast vacuoles with FM4-64 was done as described (50). Visualization of cells was performed on a axiovert200 (Zeiss) microscope equipped with DIC, GFP and rhodamine filters. The 100X objective was used (Zeiss, ∞ 0,17). Pictures were taken with a Hammamatsu CoolSnap HSQ2 camera.

### **Co-immunoprecipitation and Western-blot analysis**

For co-immunoprecipitation, cells expressing Lsb3-Myc and Las17-GFP were grown over night in YPD to an OD<sub>600</sub> = 0.5. Cells were centrifuged, washed and resuspended in lysis buffer (100mM Tris 7.5, 200 mM NaCl, 0.5% Tween, 1X protease inhibitor cocktail). Then cells were lysed with glass beads using a fastprep (MP). Broken cells were centrifuged for 15 min at 13,000 rpm and supernatant was subjected to immunoprecipitation with anti-Myc monoclonal antibody (Roche) linked to proteinA/G-Sepharose beads. The immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using ECL protocols (Amersham Biosciences). Mouse monoclonal anti-Pgk1 (Molecular probes diluted to 1/500), anti-GFP (Roche Diagnostics diluted to 1/1000) antibodies and rabbit anti-Ent5 antibodies (Produced at IGBMC, Strasbourg diluted to 1/500) were used.

### **Pulse chase**

Cells were grown over night in YPD. For OD<sub>600</sub> = 0.5, 3 ml/Time point were taken, washed twice and resuspended in 0.5 ml with YNB supplemented with all amino acids except Methionine and Cysteine. Cells were incubated at 30°C for 15 minutes and pulsed with 110 µCi Pro-Mix <sup>35</sup>S-Met/Cys for 10 minutes. The chase was then initiated by adding 1/100 volume of chase cocktail (mix 0.9% Met + 0.9% Cys + 0.9% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). For each time point (0, 10 and 30 minutes) 0.5ml were taken and added in a tube containing 5 µl of 1M NaF + 5 µl of 1M NaN<sub>3</sub> placed on ice, to end the chase. Cells were pelleted and resuspended in 100 µl Lysis buffer (100mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.5% Tween, 1X protease inhibitor

cocktail). 50  $\mu$ l glass beads were added and cells were lysed by vortexing 4 x 1 minute (1 minute on ice in between). Cells were incubated 5 minutes at 90°C, cooled on ice and vortexed. Then 900  $\mu$ l of IP buffer (50 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Tween, 1 mM EDTA, 1X protease inhibitor cocktail and 1mg/ml BSA) were added. Protein extract was centrifuged 15 minutes at 13000 rpm and 900  $\mu$ l of supernatant was incubated overnight at 4°C with rabbit Anti-Cpy antibody and sepharose beads to perform immunoprecipitation. The post-CPY-IP supernatant was incubated at 4°C with rabbit Anti-Gas1 antibody and sepharose beads to do an other immunoprecipitation. Beads (with anti-Cpy or anti-Gas1) were washed, resuspended in Laemmli buffer, boiled 5 minutes at 90°C and loaded on SDS-PAGE. The SDS-PAGE is then dried and analyzed with PhosphorImager (Fuji, Bas2000). Polyclonal Anti-Cpy and anti-Gas1 antibodies were a kind gift from Howard Riezman and used at 3  $\mu$ l/ml.

### **Subcellular fractionation experiment**

The equivalent of 20 units OD<sub>600</sub> of cells were lysed in 1 ml of PBS, 0.25 M sorbitol and protease inhibitors (Roche) using the fast prep (MP) : 5 runs of 30 seconds separated by 5 min incubation on ice. Cell lysates were centrifuged at 500 x g for 5 min to eliminate cell debris. Lysate was then centrifuged for 10 min at 13 000 x g and the supernatant was transferred in a new tube to be centrifuged at 100 000 x g for one hour. Pellets were resuspended in 1 ml of Laemmli buffer and supernatant mixed with 200  $\mu$ L of 5x loading buffer. 50  $\mu$ L were loaded on a 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane. Nitrocellulose membrane was blotted with mouse anti Pgk1 (Molecular Probes 1/500), anti Pep12 (Molecular Probes 1/1000), anti Vph1 (Molecular Probes 1/1000), anti HA (Molecular Probes 1/2000) and rabbit anti Kar2 (Gift from R. Duben 1/6000) antibodies.



**Figure 1** : Ent3 and Ent5 interact with Lsb3 in a protein-protein interaction screen.

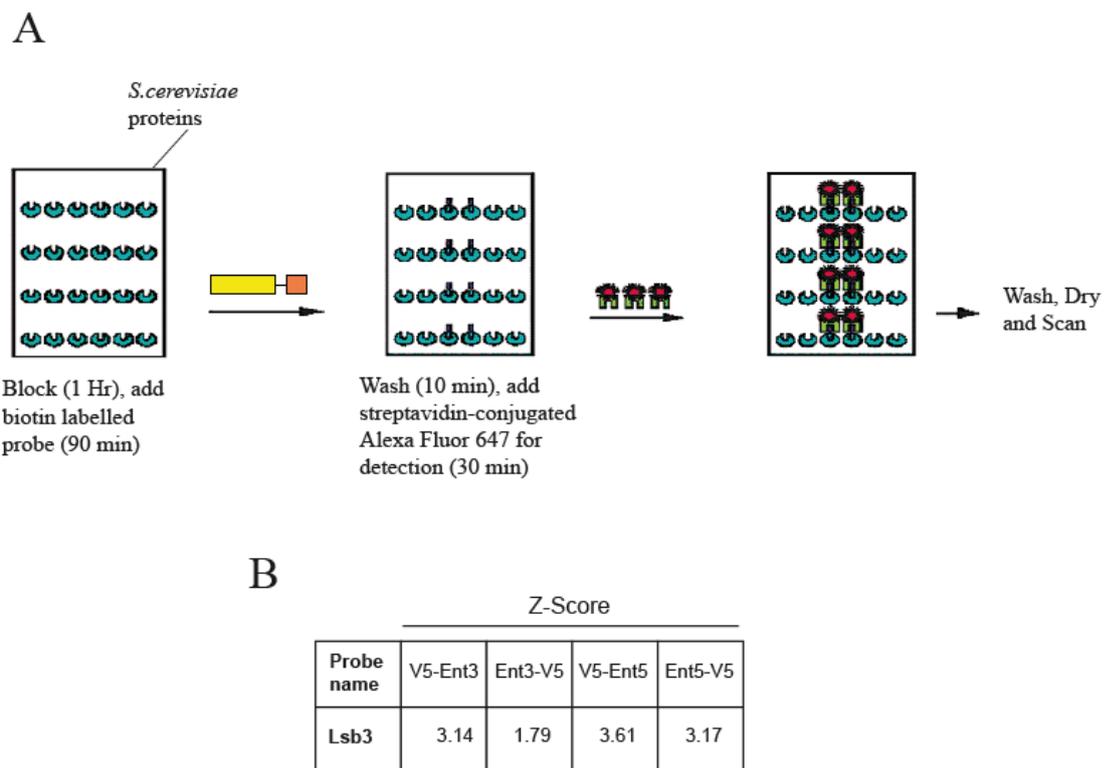
(A) Principle of the yeast proteins microarrays.

Ent3 and Ent5 tagged with V5-6XHis at their N- or C-terminus are produced in *E. coli*, purified and incubated on the Yeast ProtoArray® chips which contain a large part of the yeast proteome. V5 antibody is coupled with a fluorochrome and image acquisition was made using a fluorescence scanner (Molecular devices).

(B) Z-scores.

Z-scores for interaction of Lsb3 with N- and C-tagged Ent5 and Ent3 were calculated using the Prospector 3.1 software.

Figure 1



**Figure 28** : Ent3 and Ent5 interact with Lsb3 in a protein-protein interaction screen.

**Figure 2** : Lsb3 and Ent5 interact *in vitro* and *in vivo*.

(A) GST pull-down assays.

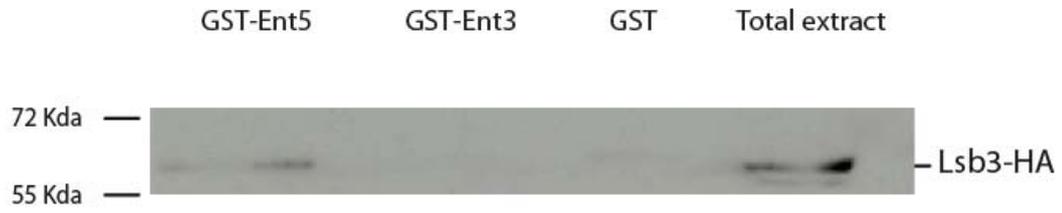
GST control, GST-Ent3 and GST-Ent5 fusion proteins were expressed in *E. coli*. GST fusion proteins were bound on glutathion-Sepharose beads and incubated with a total yeast extract expressing a C-terminal HA-tagged Lsb3 protein. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred and revealed by a monoclonal anti-HA, in a Western blot experiment. This experiment shows that Lsb3 interacts with Ent5 but not with Ent3.

(B) Co-immunoprecipitation experiments.

Lsb3-Myc and Las17-GFP proteins were co-expressed in yeast. The whole-cell extract was immunoprecipitated with an anti-Myc monoclonal antibody linked to proteinA/G-Sepharose beads. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by western-blot (anti-Ent5 polyclonal antibody, anti-GFP monoclonal antibody and anti-Pgk1 polyclonal antibody). Las17-GFP fusion is an internal positive control whereas Pgk1 is used as a negative control. Las17 and Ent5, but not Pgk1, are interacting *in vivo* with Lsb3.

## Figure 2

A



B

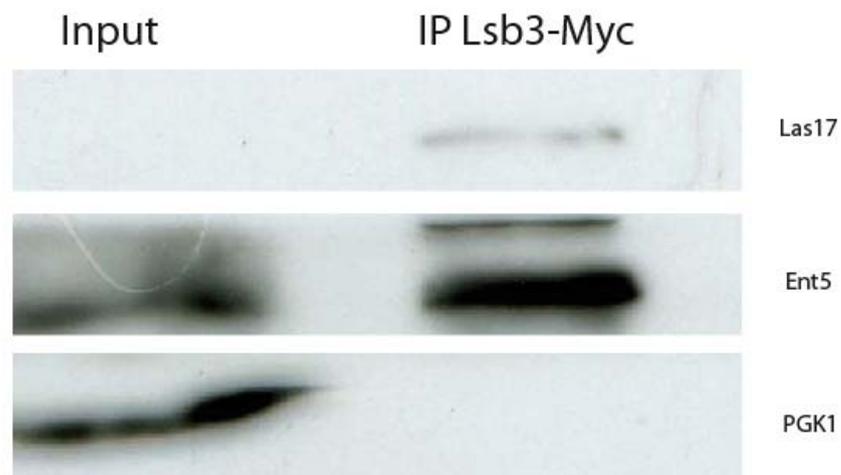


Figure 29 : Lsb3 and Ent5 interact *in vitro* and *in vivo*.

**Figure 3** : Lsb3 and Ysc84 are required for the sorting of biosynthetic cargos at the MVB.

Living cells expressing proteins fused with GFP : GFP-Cps1 (A), GFP-Phm5 (B) and GFP-Sna3 (C) were grown at an OD<sub>600</sub> of 0.3 and labeled with FM4-64 during 20 minutes before visualization. Cargos are visualized in green and the FM4-64 staining the vacuolar membrane is viewed in red.

(A) Localization of the GFP-Cps1.

The localization of the GFP-Cps1 cargo is different in *lsb3*Δ and/or *ysc84*Δ mutant compared to the WT. In the BY4742 strain, the GFP marker is seen within the vacuole while in mutant cells, the GFP-fused cargo is seen on the vacuolar membrane, co-localizing with the FM4-64 dye. This shows that, in *lsb3*Δ or *ysc84*Δ mutants, the GFP-Cps1 cargo is not incorporated into the MVB vesicles and accumulates at the limiting membrane.

(B) Localization of the GFP-Phm5 cargo.

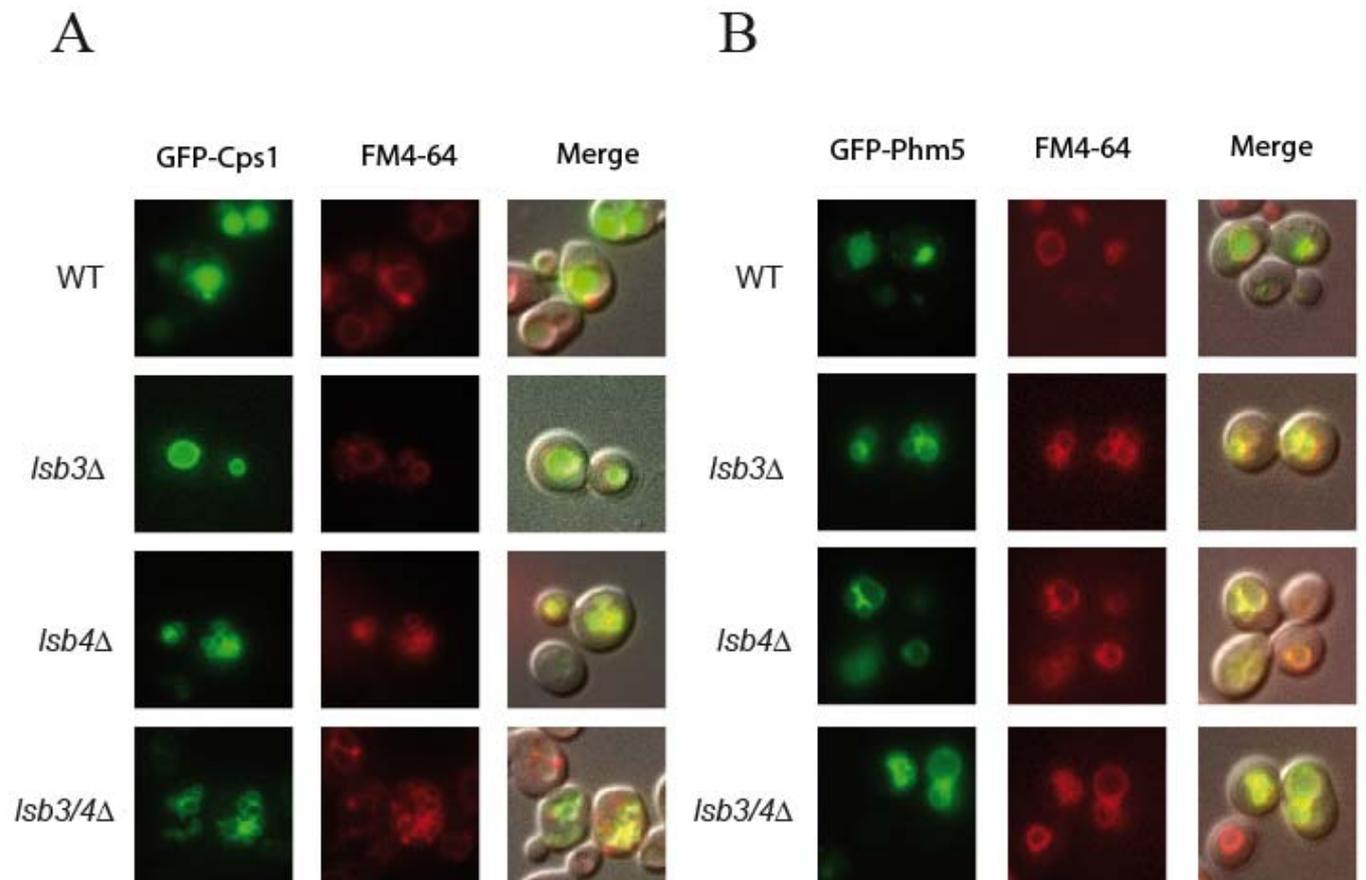
Like for GFP-Cps1, the localization of the GFP-Phm5 cargo is different in *lsb3*Δ and/or *ysc84*Δ mutant cells compared to the WT cells. This shows that, in *lsb3*Δ or *ysc84*Δ mutants, the GFP-Phm5 cargo is not incorporated into the MVB vesicles and accumulates at the limiting membrane.

(C) Localization of the GFP-Sna3 cargo.

The GFP-Sna3 cargo shows no phenotype, and the GFP fluorescent pattern is the same for mutant cells and for the WT cells, localizing on the vacuolar lumen.

Cps1 and Phm5 are two Rsp5-ubiquitinated dependent cargos whereas Sna3 is thought to be transported by a specific pathway and interacts directly with Rsp5. This shows that Lsb3 and Ysc84 are required for MVB sorting of some specific biosynthetic ubiquitinated cargos and not in the general MVB sorting.

Figure 3





C

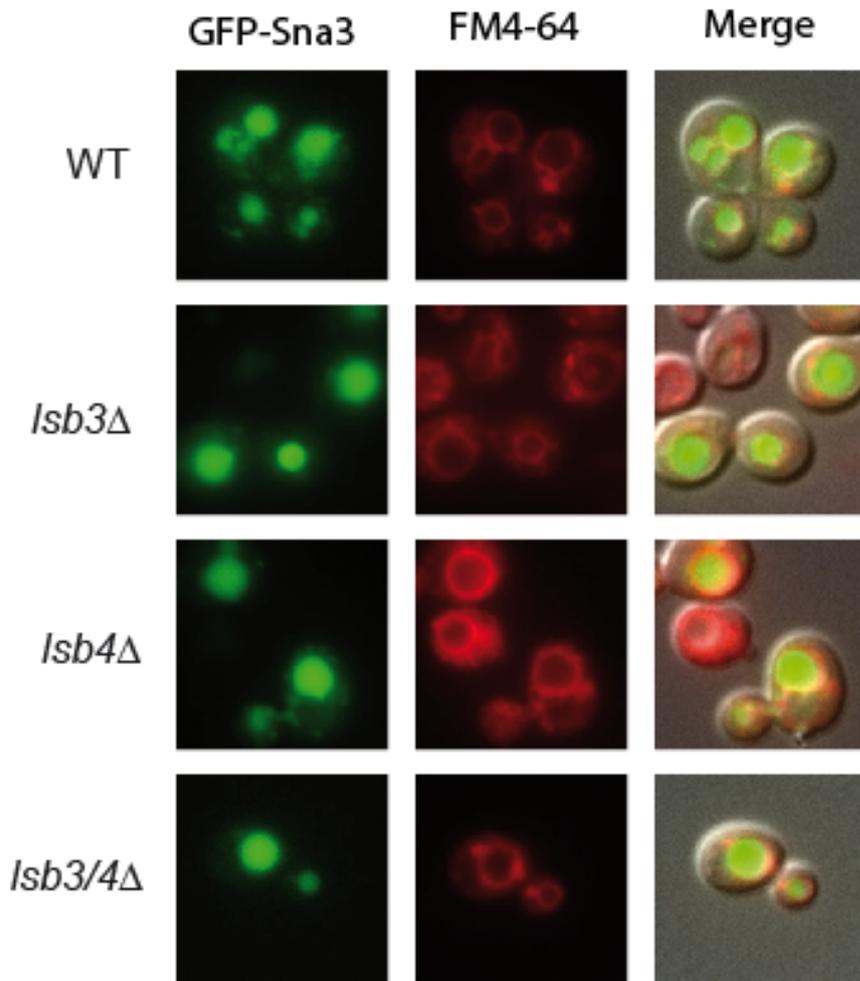


Figure 30 : Lsb3 and Ysc84 are required for the sorting of biosynthetic cargos at the MVB.

**Figure 4** : Lsb3 and Ysc84 are not required for cargo internalization at the MVB.

(A) Localization of the GFP-DPAP-B.

The localization of the GFP-DPAP-B cargo is the same in *lsb3Δ* and/or *ysc84Δ* mutant cells compared to the WT. In all strains, the GFP marker is seen on the vacuolar membrane, co-localizing with the FM4-64 dye. This shows that, in *lsb3Δ* and *ysc84Δ* mutants, the GFP-DPAP-B cargo is correctly transported, *via* the VPS pathway, to the vacuolar membrane.

(B) Like for the GFP-DPAP-B, the localization of the GFP-Vam3 is not affected. Vam3 is transported *via* another pathway : the AP-3 dependant pathway. This shows that, in *lsb3Δ* and *ysc84Δ* mutants, the AP-3 dependant pathway is functional for vacuolar membrane protein.

Both DPAP-B and Vam3 are proteins that are transported from the Golgi to the vacuole but do not need internalization in the MVB vesicles.

Figure 4

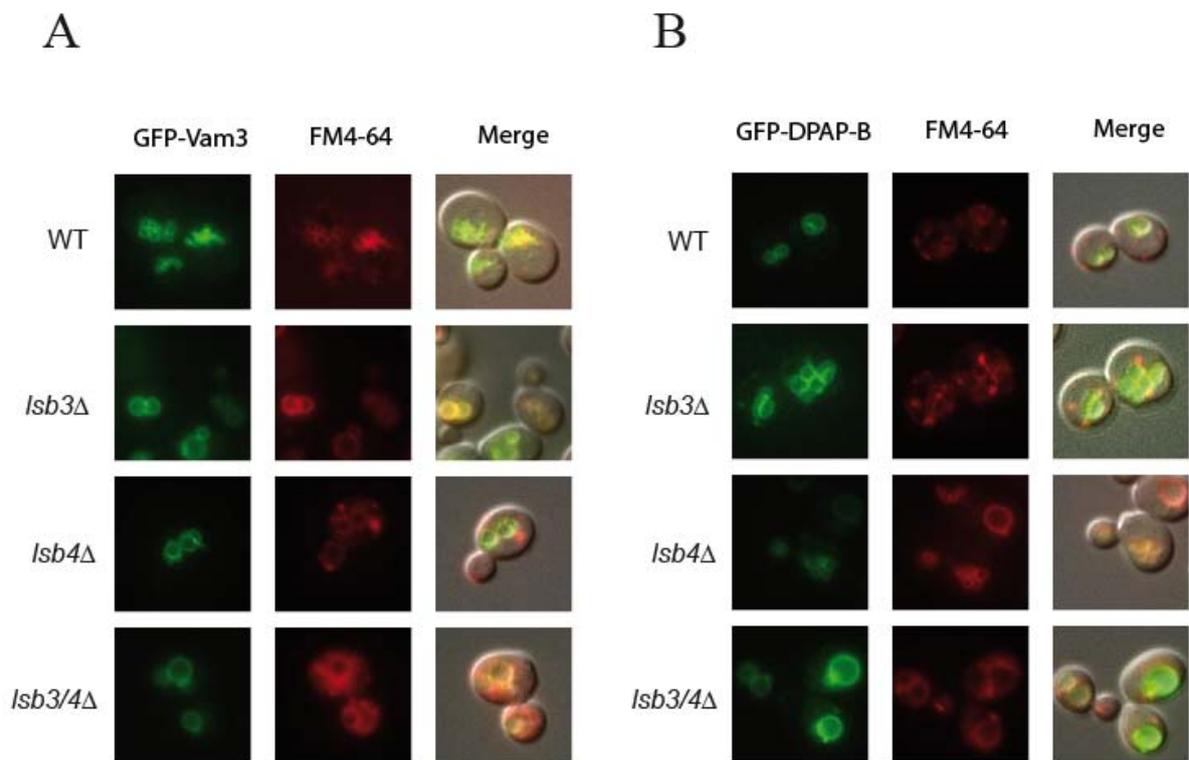
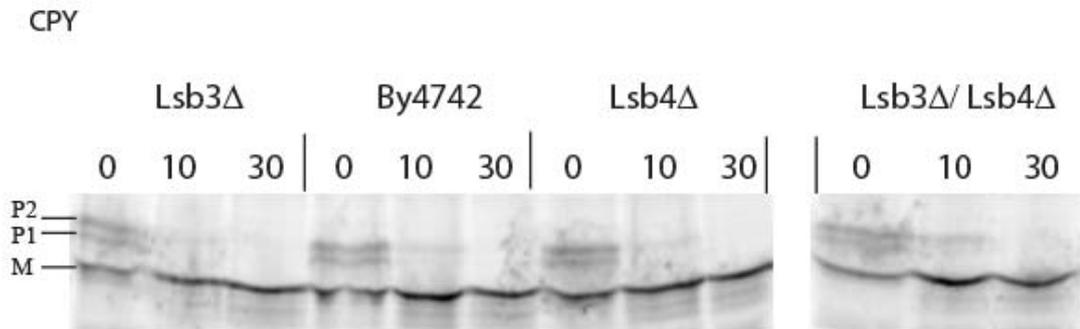


Figure 31 : Lsb3 and Ysc84 are not required for cargo internalization at the MVB.

**Figure 5** : *LSB3* and/or *YSC84* deletions do not show any defect in CPY maturation.

After a pulse with  $^{35}\text{S}$  labelled Met/Cys, the precursor and mature forms of CPY (Golgi to vacuole pathway) and Gas1 (as control) were monitored. For the CPY protein, two precursor forms exist at the initial time : an ER (P1) and a Golgi-modified form (P2). Upon delivery to the vacuole, the precursor forms are proteolytically processed, resulting in the mature form (M). After the pulse, a chase was initiated and some cells were taken at different time points (0, 10 and 30 minutes) before the chase is stopped. The harvested cells are then lysed and incubated overnight at 4°C with anti-Cpy antibody and sepharose beads to perform the immunoprecipitation. The supernatant was then taken and incubated at 4°C with anti-Gas1 antibody and sepharose beads to carry out the second immunoprecipitation. Beads are loaded on SDS-PAGE and analyzed with PhosphorImager (Fuji, Bas2000). CPY maturation and transport appeared to be unaffected in mutants.

## Figure 5



GAS1

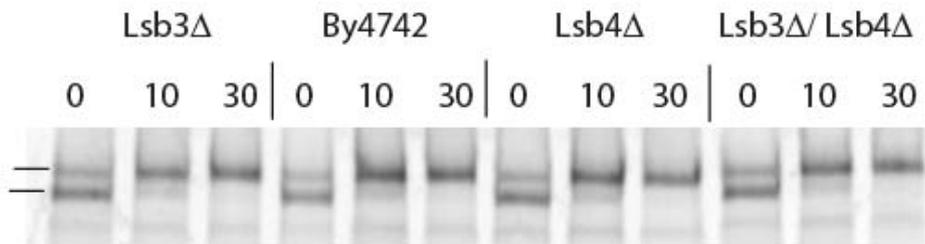


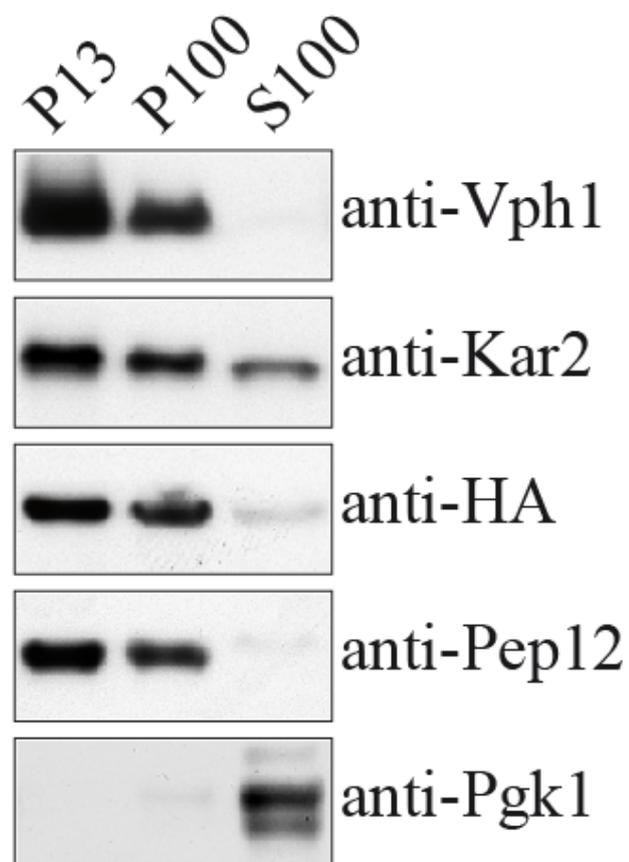
Figure 32 : Lsb3 and/or Ysc84 deletion do not show any defect in CPYp maturation.



**Figure 6** : Subcellular fractionation of Ysc84-HA.

Total cell lysates were centrifuged at different speeds. Pellets were resuspended and pellet and soluble fractions were loaded on a 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane, which was blotted with different antibodies. Vph1 is a marker of the vacuole. Kar2 is an ER marker. Pep12 is an endosomal t-SNARE. Pgk1 is cytosolic marker. The P13 fraction correspond to Plasma Membrane, Endoplasmic Reticulum and vacuole, P100 to Golgi and endosomes and S100 to soluble proteins and small vesicles.

Figure 6



**Figure 33** : Subcellular fractionation of Ysc84-HA.



**Table1**

Strain	Genotype	Source/reference
By4742 (WT)	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
<i>lsb3Δ</i>	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3::KANMX6</i>	Open Biosystems
<i>ysc84Δ</i>	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ysc84::KANMX6</i>	Open Biosystems
<i>yVD130</i>	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3::his5MX6 ysc84::KANMX6</i>	This study
<i>yVD171</i>	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0 lsb3 : (HA HIS)</i>	This study
<i>yVD177</i>	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 ysc84 : (HA KANMX6)</i>	This study
<i>yVD209</i>	<i>Mat α his3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3 : (MYC KANMX6)</i>	This study
<i>yVD271</i>	<i>Mat a his3Δ0 leu2.3,112 lys2.801 ura3.52 LAS17 (GFP HIS3)</i>	This study
<i>yVD335</i>	<i>Mat a his3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3 : (MYC KANMX6) LAS 17 (GFP HIS3)</i>	This study

**Tableau 5 : *S. cerevisiae* strains used in this study.****Table2**

GGATCCATGAGTTTAGAGGATACATTA	Forward <i>ENT3</i> in pGEX4T3(BamHI)
GATAAGGGATCCGACTCATTATCAAAAAAGATTC	Forward <i>ENT5</i> in pGEX4T1 (BamHI)
GTCGACAAAGGAAAGTAAATCGATTTC	Reverse <i>ENT3</i> in pGex4T3 (Sall)
AGAATTCTCGAGTTAGACCAACGACTTGGA	Reverse <i>ENT5</i> in pGex4T1 (XhoI)
GGTGGCAAAGAAATCAAAAACAAAAGCTGTATCACACGCACGGATCCCCGGGTAAATTAA	F1 <i>LSB3</i>
TTTTCAAGAGTAGTGGTAATATCAAATCCAAAATCCAAAACGGATCCCCGGGTAAATTAA	F1 <i>YSC84</i>
CAATAACGTTTCTCGTATTCTTTACTCTCCTTCAAATTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 <i>LSB3</i>
AATTCTATATATAGGAACGAGACATATGGAGGACGATAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 <i>YSC84</i>
GAGTCAACGGTAGAGAAGGTATATTTCCAGCAAATTACGTTGAACTAGTTCCGGATCCCCGGGTAAATTAA	F2 <i>LSB3</i>
GGACTAACGGAAAAGAAGGAATATTCCTGCAAACACTACGTTAGAGTTTCTCGGATCCCCGGGTAAATTAA	F2 <i>YSC84</i>
TACTTTGTCTCACTCTTTAACTCCTTGGAATAGGATTGTTAATACCCATCATTTTGAGATCCGGGTTTT	R2 <i>LSB3</i>
TACTTGGTCTCGCTTTTCAAGCTTCGAGGAATTGGATTATTGATACCCATCATTTTGAGATCCGGGTTTT	R2 <i>YSC84</i>

**Tableau 6 : Oligonucléotides used in this study.**



## References

1. Eugster A, Pecheur EI, Michel F, Winsor B, Letourneur F, Friant S. Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body. *Molecular biology of the cell* 2004;15(7):3031-3041.
2. Friant S, Pecheur EI, Eugster A, Michel F, Lefkir Y, Nourrisson D, Letourneur F. Ent3p Is a PtdIns(3,5)P2 effector required for protein sorting to the multivesicular body. *Developmental cell* 2003;5(3):499-511.
3. Dewar H, Warren DT, Gardiner FC, Gourlay CG, Satish N, Richardson MR, Andrews PD, Ayscough KR. Novel proteins linking the actin cytoskeleton to the endocytic machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 2002;13(10):3646-3661.
4. Madania A, Dumoulin P, Grava S, Kitamoto H, Scharer-Brodbeck C, Soulard A, Moreau V, Winsor B. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Molecular biology of the cell* 1999;10(10):3521-3538.
5. Robertson AS, Allwood EG, Smith AP, Gardiner FC, Costa R, Winder SJ, Ayscough KR. The WASP Homolog Las17 Activates the Novel Actin-regulatory Activity of Ysc84 to Promote Endocytosis in Yeast. *Molecular biology of the cell* 2009.
6. Li R. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 1997;136(3):649-658.
7. Winter D, Lechler T, Li R. Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol* 1999a;9(9):501-504.
8. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science (New York, NY)* 1993;259(5098):1157-1161.
9. Tonikian R, Xin X, Toret CP, Gfeller D, Landgraf C, Panni S, Paoluzi S, Castagnoli L, Currell B, Seshagiri S, Yu H, Winsor B, Vidal M, Gerstein MB, Bader GD, *et al.* Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS biology* 2009;7(10):e1000218.
10. Insall R, Muller-Taubenberger A, Machesky L, Kohler J, Simmeth E, Atkinson SJ, Weber I, Gerisch G. Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell motility and the cytoskeleton* 2001;50(3):115-128.
11. Jonsdottir GA, Li R. Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr Biol* 2004;14(17):1604-1609.
12. Galletta BJ, Chuang DY, Cooper JA. Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS biology* 2008;6(1):e1.
13. Kim K, Galletta BJ, Schmidt KO, Chang FS, Blumer KJ, Cooper JA. Actin-based motility during endocytosis in budding yeast. *Molecular biology of the cell* 2006;17(3):1354-1363.
14. Moreau V, Galan JM, Devilliers G, Haguenaer-Tsapis R, Winsor B. The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Molecular biology of the cell* 1997;8(7):1361-1375.
15. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews* 2004;5(4):317-323.
16. Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 2003;19:141-172.
17. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001;106(2):145-155.

18. Odorizzi G, Babst M, Emr SD. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 1998;95(6):847-858.
19. Reggiori F, Pelham HR. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *The EMBO journal* 2001;20(18):5176-5186.
20. Urbanowski JL, Piper RC. Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2001;2(9):622-630.
21. Wurmser AE, Emr SD. Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities. *The EMBO journal* 1998;17(17):4930-4942.
22. De Camilli P, Chen H, Hyman J, Panepucci E, Bateman A, Brunger AT. The ENTH domain. *FEBS letters* 2002;513(1):11-18.
23. Kay BK, Yamabhai M, Wendland B, Emr SD. Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci* 1999;8(2):435-438.
24. Wendland B, Steece KE, Emr SD. Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *The EMBO journal* 1999;18(16):4383-4393.
25. Duncan MC, Costaguta G, Payne GS. Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nature cell biology* 2003;5(1):77-81.
26. Chidambaram S, Mullers N, Wiederhold K, Haucke V, von Mollard GF. Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(6):4175-4179.
27. Chidambaram S, Zimmermann J, von Mollard GF. ENTH domain proteins are cargo adaptors for multiple SNARE proteins at the TGN endosome. *Journal of cell science* 2008;121(Pt 3):329-338.
28. Copic A, Starr TL, Schekman R. Ent3p and Ent5p exhibit cargo-specific functions in trafficking proteins between the trans-Golgi network and the endosomes in yeast. *Molecular biology of the cell* 2007;18(5):1803-1815.
29. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science (New York, NY)* 2001;293(5537):2101-2105.
30. Rocco V, Daly MJ, Matre V, Lichten M, Nicolas A. Identification of two divergently transcribed genes centromere-proximal to the ARG4 locus on chromosome VIII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1993;9(10):1111-1120.
31. Hesselberth JR, Miller JP, Golob A, Stajich JE, Michaud GA, Fields S. Comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* WW domains and their interacting proteins. *Genome biology* 2006;7(4):R30.
32. Morvan J, Froissard M, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D. The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2004;5(5):383-392.
33. Katzmann DJ, Sarkar S, Chu T, Audhya A, Emr SD. Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Molecular biology of the cell* 2004;15(2):468-480.
34. Hettema EH, Valdez-Taubas J, Pelham HR. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *The EMBO journal* 2004;23(6):1279-1288.

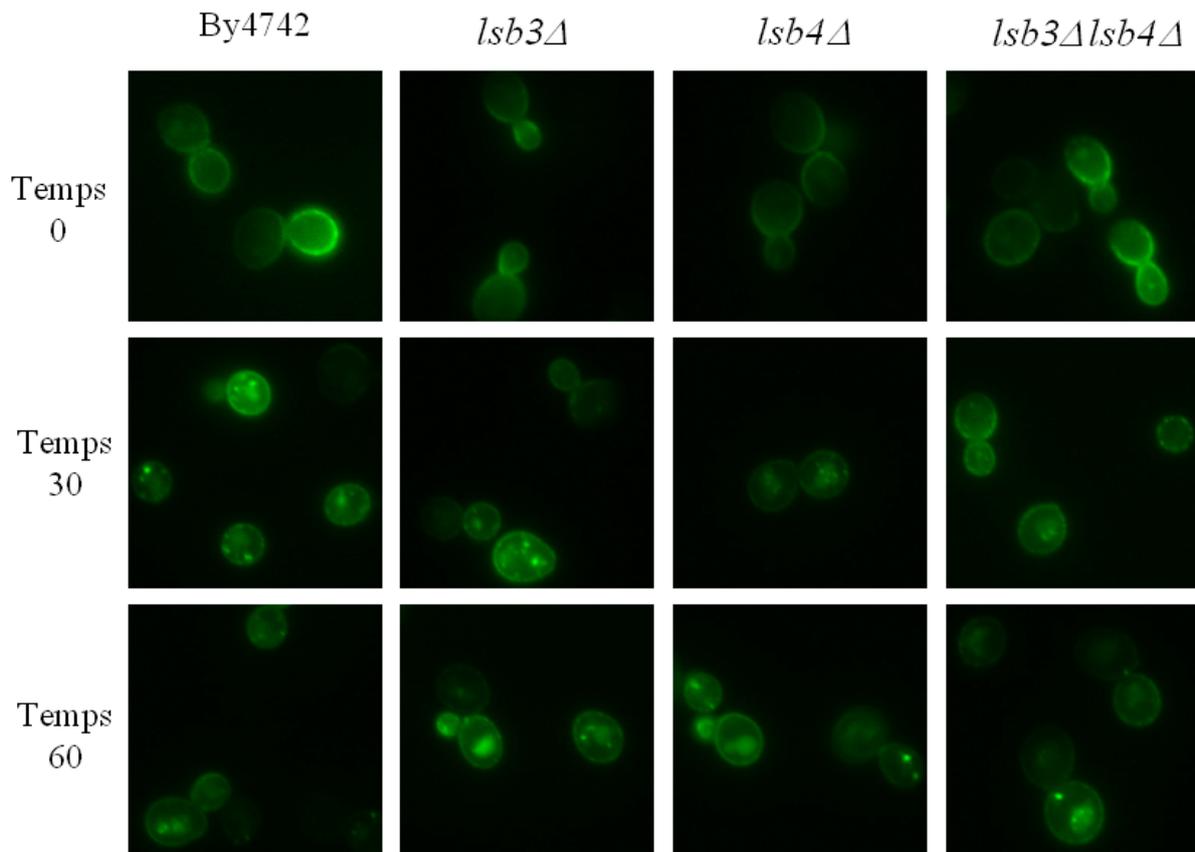
35. Reggiori F, Pelham HR. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nature cell biology* 2002;4(2):117-123.
36. Oestreich AJ, Aboian M, Lee J, Azmi I, Payne J, Issaka R, Davies BA, Katzmann DJ. Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5. *Molecular biology of the cell* 2007a;18(2):707-720.
37. Stawiecka-Mirota M, Pokrzywa W, Morvan J, Zoladek T, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D, Morsomme P. Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2007;8(9):1280-1296.
38. Darsow T, Burd CG, Emr SD. Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *The Journal of cell biology* 1998;142(4):913-922.
39. Hasilik A, Tanner W. Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 1978;85(2):599-608.
40. Doering TL, Schekman R. GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. *The EMBO journal* 1996;15(1):182-191.
41. Burd CG, Emr SD. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Molecular cell* 1998;2(1):157-162.
42. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO journal* 2000;19(17):4577-4588.
43. Stenmark H, Aasland R, Driscoll PC. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS letters* 2002;513(1):77-84.
44. Eitzen G, Wang L, Thorngren N, Wickner W. Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *The Journal of cell biology* 2002;158(4):669-679.
45. Conibear E, Stevens TH. Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Molecular biology of the cell* 2000;11(1):305-323.
46. Novick P, Osmond BC, Botstein D. Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics* 1989;121(4):659-674.
47. Sevrioukov EA, Moghrabi N, Kuhn M, Kramer H. A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in *Drosophila*. *Molecular biology of the cell* 2005;16(5):2301-2312.
48. Mitchell DA, Marshall TK, Deschenes RJ. Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast (Chichester, England)* 1993;9(7):715-722.
49. Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1998;14(10):953-961.
50. Vida TA, Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology* 1995;128(5):779-792.



## II. Expériences complémentaires de trafic.

### A. Endocytose.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, il avait été montré que les délétions de *LSB3* et *LSB4* ne présentaient pas de phénotype d'endocytose, que ce soit avec les marqueurs fluorescents Lucifer Yellow (LY) et FM4-64 (Dewar *et al.*, 2002) ou avec le récepteur de membrane plasmique Ste2 (Vanessa Addis, communication personnelle). Cependant ces expériences s'intéressaient uniquement à la possibilité d'un blocage du processus d'internalisation à la membrane plasmique (LY et Ste2) ou à un retard pour les étapes précoces de l'endocytose (FM4-64) et non à un éventuel retard d'internalisation dans les vésicules du MVB. Afin de m'intéresser plus particulièrement à cette étape, j'ai travaillé avec des levures transformées par un plasmide codant pour la perméase de l'uracile (Fur4), fusionnée en C-terminal à la GFP. L'expression de cette protéine de fusion est placée sous le contrôle du promoteur du gène *GALI* (Blondel *et al.*, 2004), inductible par le galactose et répressible par le glucose. Les cellules ayant poussé durant la nuit en présence de raffinose ou glycérol (source de carbone de dérépression et de non-induction du système *GALI*) sont diluées dans ce même milieu. Lorsque les cellules ont de nouveau atteint la phase exponentielle de croissance, la production de la protéine est induite par ajout de galactose. Deux heures après cet ajout de galactose, la synthèse des protéines sous promoteur *GAL* est arrêtée par ajout de glucose puis l'endocytose est déclenchée après une demi-heure par ajout de cycloheximide (10µg/ml).



**Figure 34 : Localisation de Fur4-GFP.**

Les cellules transformées avec le plasmide permettant l'expression de la protéine Fur4-GFP sont observées à différents temps après l'ajout de cycloheximide.

Le temps 0 correspond au moment où la cycloheximide est ajoutée.

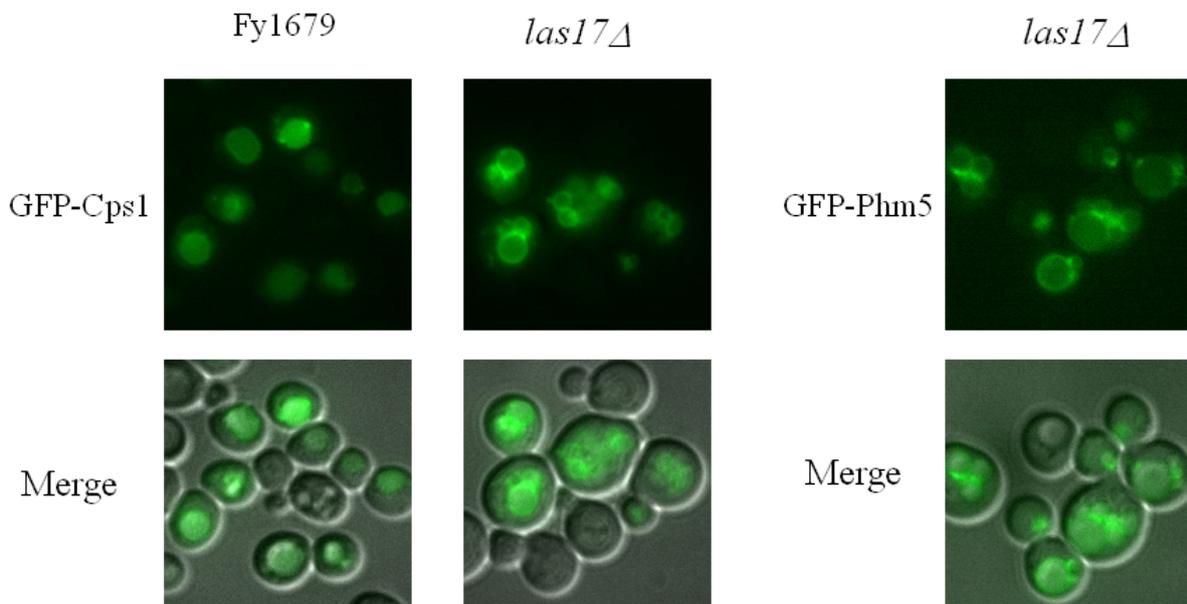
Chez les levures sauvages les protéines présentes au niveau de la membrane plasmique au temps 0 vont être progressivement internalisées par la voie d'endocytose pour finalement se retrouver au niveau du lumen de la vacuole au temps 60.

Trente minutes après l'ajout de cycloheximide, un signal GFP est déjà observé à l'intérieur de la vacuole dans les cellules sauvages et les cellules délétées pour *LSB3*, *LSB4* ou pour le double mutant (figure 34). La vacuole est bien marquée au bout de 60 minutes et la faible concentration en cycloheximide utilisée (10µg/ml) explique certainement pourquoi la GFP est encore présente à la membrane dans les 4 types de cellules (Figure 34). Lors de cette expérience je ne m'intéressais pas aux étapes précoces de l'endocytose, se déroulant à la membrane plasmique, mais au tri des protéines au MVB. Des problèmes dans le tri des protéines au niveau du MVB peuvent entraîner un blocage ou un ralentissement de l'internalisation des cargos d'endocytose dans le lumen de la vacuole tandis que les étapes précédentes, au niveau de la membrane plasmique, ne sont pas perturbées. Dans l'expérience réalisée ici, les délétions de *LSB3* et de *LSB4* ainsi que la double délétion ne montrent pas de ralentissement dans l'internalisation de Fur4-GFP dans le lumen de la vacuole. Aucun effet des délétions de *LSB3* et de *LSB4* n'est observé sur le trafic de protéines internalisées à la

membrane plasmique. Les protéines Lsb3 et Lsb4 ne semblent donc pas impliquées dans le tri, au niveau du MVB des cargos issu de l'endocytose.

## B. Las17 et la voie VPS.

Lsb3 et Lsb4 interagissant avec la protéine Las17, j'ai testé si cette dernière joue également un rôle dans le tri des protéines au MVB. Pour cela j'ai transformé le mutant *las17Δ* (obtenu par dissection d'asques issues du diploïde hétérozygote FY169) avec les plasmides portant les gènes codant pour les protéines GFP-Phm5 et GFP-Cps1 sous contrôle du promoteur *DPI* constitutif. La souche sauvage me servant ici de contrôle est issue de la dissection du diploïde.



**Figure 35 : Localisation de GFP-Cps1 et GFP-Phm5 dans des cellules *las17Δ*.**

Les cellules transformées avec les plasmides permettant l'expression de la protéine GFP-Cps1 ou GFP-Phm5 sont observées avec un microscope à fluorescence muni d'un objectif 100 X.

J'ai ainsi constaté que dans les mutants *las17Δ*, les protéines GFP-Cps1 et GFP-Phm5 ne sont plus localisées dans le lumen de la vacuole mais à la membrane vacuolaire (Figure 35). Ainsi il semble que Las17 est également impliquée lors de l'internalisation des protéines Phm5 et Cps1 au niveau du MVB. L'expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois, avec un clone unique pour les deux souches transformées.

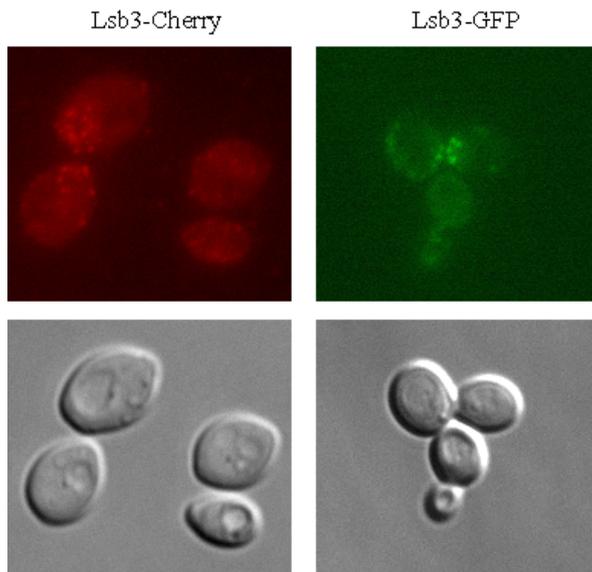


### **III. Localisation des protéines Lsb3, Lsb4, Ent3 et Ent5.**

Après avoir mis en évidence le rôle de Lsb3, Lsb4 et Las17 dans l'internalisation de cargos à destination de la vacuole, je me suis attelé à la question de savoir si Lsb3 et Lsb4 co-localisaient avec les epsines Ent3 et Ent5. En effet, nous nous attendions à ce que des protéines qui interagissent et qui sont impliquées dans un même processus se situent au même endroit dans la cellule.

#### **A. Lsb3 et Lsb4.**

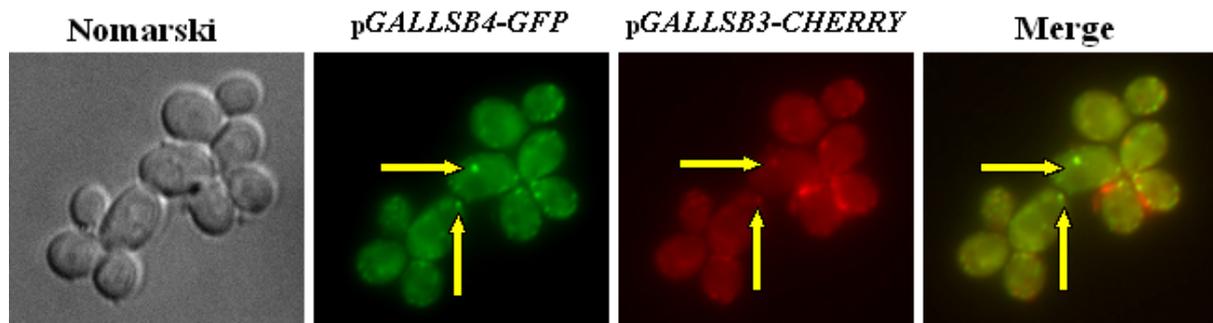
Des plasmides permettant d'étiqueter les protéines Lsb3 et Lsb4 avec la protéine fluorescente rouge Cherry dans la levure ont été construits (travail de Dimitri Dolosor, stagiaire au laboratoire). Après amplification des fragments d'ADN permettant l'étiquetage en C-terminal de Lsb3 et Lsb4 par des amorces spécifiques, ceux-ci ont été transformés dans des souches de levures en vue de leur intégration spécifique aux locus *LSB3* et *LSB4* par recombinaison homologue. Après vérification de l'intégration par PCR (avec des primers spécifiques aux gènes *LSB3* ou *LSB4*), nous avons obtenu des souches haploïdes dont les protéines Lsb3 et Lsb4 sont étiquetées GFP ou Cherry (travail de Dina Andriamortsiresy, stagiaire au laboratoire). La protéine Lsb3 étiquetée GFP ou Cherry est observée dans des structures ponctuelles cytosoliques (Figure 36). Il n'en va pas de même pour Lsb4-GFP ou Lsb4-Cherry car le niveau d'expression du gène *LSB4* sous le contrôle de son promoteur endogène s'avère extrêmement faible, rendant la visualisation de Lsb4-GFP ou Lsb4-Cherry au microscope difficile.



**Figure 36 : Localisation de Lsb3 étiquetée avec Cherry ou GFP**

La souche sauvage BY4742 produisant Lsb3 étiquetée GFP ou Cherry est observée au microscope à fluorescence avec un grossissement 100 X.

Afin de visualiser Lsb4, nous avons réalisé de nouvelles souches dans lesquelles le gène *LSB4* est placé sous le contrôle du promoteur inductible *GALI*. Nous avons croisé ces souches à des souches produisant Lsb3-GFP (*LSB3* est dans ce cas également placé sous promoteur *GALI*). Les diploïdes ainsi obtenus ont été observés au microscope à fluorescence.



**Figure 37 : Diploïdes hétérozygotes exprimant Lsb3-Cherry et Lsb4-GFP.**

Les cellules sont observées au microscope à fluorescence avec un grossissement 100 X après croissance sur milieu SC en présence de galactose durant une nuit.

Les flèches indiquent des points de co-localisation.

Dans les cellules diploïdes hétérozygotes pour *LSB3* et *LSB4*, nous voyons que Lsb3-Cherry et Lsb4-GFP co-localisent au niveau de structures ponctuelles (Figure 37). Etant donné leur interaction avec Las17 (Madania *et al.*, 1999) et le fait que, surproduites, elles co-localisent avec l'actine (Dewar *et al.*, 2002) nous supposons que ces structures ponctuelles correspondent aux taches corticales d'actine.

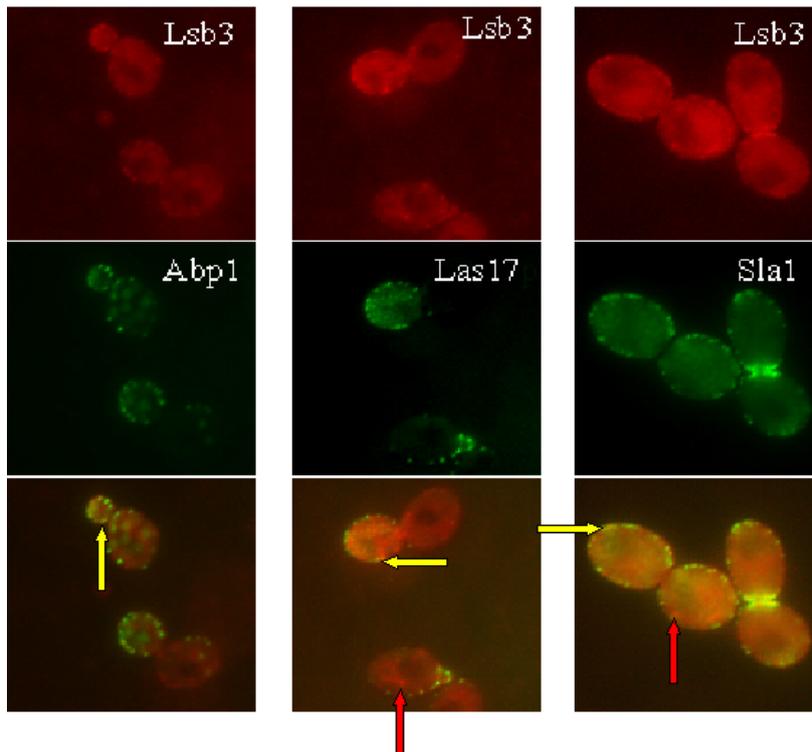
Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons introduit par croisement les gènes codant pour Lsb3-Cherry et Lsb4-Cherry dans des souches portant différents marqueurs des taches corticales d'actine fusionnés à la GFP. Nous avons choisi les souches Abp1-GFP, Las17-GFP et Sla1-GFP.

- Abp1 est un NPF de classe II ayant la capacité de stabiliser les filaments néosynthétisés par Arp2/3 (Weaver *et al.*, 2001). Elle recrute et active le complexe Arp2/3 sur le côté de filaments préexistants (Goode *et al.*, 2001a).

- Las17 est un NPF de classe I, le seul homologue de WASP chez la levure (Li, 1997), qui promeut l'assemblage de l'actine branchée *via* le complexe Arp2/3 (Rodal *et al.*, 2003). Elle interagit avec Lsb3 et Lsb4 *via* son domaine polyproline (Madania *et al.*, 1999).

- Sla1 est un régulateur négatif de l'activité de Las17 (Rodal *et al.*, 2003). Cette inhibition est levé par Bzz1 (Sun *et al.*, 2006). D'autre part, Sla1 interagit avec Lsb3 et Lsb4 *via* leurs domaines SH3 (Dewar *et al.*, 2002).

Sla1 et Las17 font partie des premières protéines des taches corticales à arriver au site d'endocytose ; elles arrivent une à deux minutes après la clathrine et repartent lorsque la vésicule commence à se déplacer vers l'intérieur de la cellule avec une vitesse rapide et directionnelle (Kaksonen *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2002). Abp1 arrive aux taches corticales d'actine en même temps que la machinerie de nucléation de l'actine, c'est à dire plus tard que Sla1 et Las17, et reste associée aux vésicules d'endocytose plus longtemps (Kaksonen *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2002). Nous pourrions ainsi observer l'association de Lsb3 et Lsb4 avec des marqueurs spécifiques de différentes étapes précoces de l'endocytose.



**Figure38 : Lsb3 et les protéines des taches corticales d'actine.**

Les cellules produisant Lsb3 étiquetée Cherry et les différents marqueurs des taches corticales d'actine fusionnés à la GFP sont observées au microscope à fluorescence avec un grossissement 100 X.

Les flèches jaunes indiquent la co-localisation entre Lsb3-cherry et les protéines étiquetées GFP.

Les flèches rouges des structures où Lsb3-cherry ne co-localise pas avec les protéines étiquetées GFP.

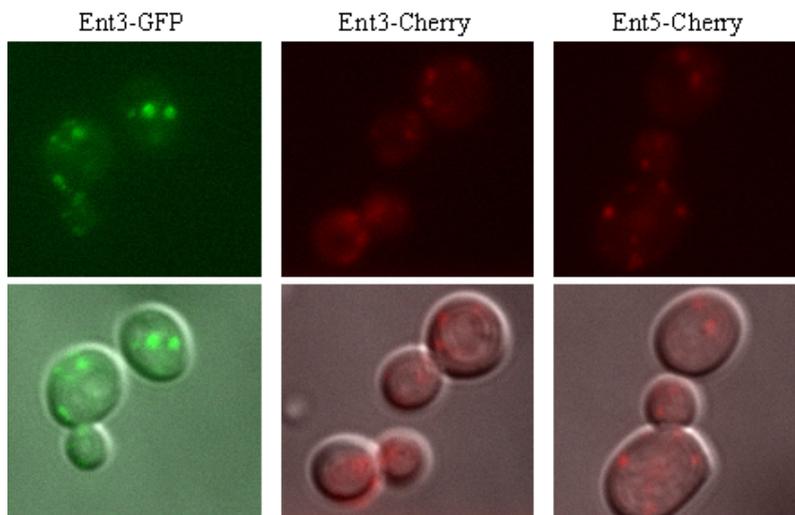
Nous avons pu constater que Lsb3-Cherry co-localise avec les trois protéines au niveau de structures ponctuelles (Figure 38 flèches jaunes). Nous ne pouvons l'assurer avec certitude, ne disposant pas de données issues d'un microscope confocal mais ces structures semblent directement localisées sous la membrane plasmique, ce qui est en accord avec une localisation au niveau des taches corticales d'actine. Par ailleurs, les co-localisations observées permettent de confirmer la fonctionnalité de la fusion Lsb3-Cherry. Nous constatons cependant que toutes les structures ponctuelles contenant Lsb3 ne co-localisent pas avec les protéines de la machinerie de l'actine (Figure 38 flèches rouges). Cette absence de co-localisation peut s'expliquer par la dynamique de Lsb3 aux taches corticales d'actine. En effet il a été montré que Lsb3 et Lsb4 arrivent au niveau des taches corticales d'actine avant Abp1 et les quittent après Las17 et Sla 1 (Robertson et al., 2009; Tonikian et al., 2009). Par conséquent, les structures marquées par Lsb3-Cherry mais pas par Abp1-GFP peuvent être des taches corticales précoces et les structures marquées par Lsb3-Cherry mais pas par Las17-GFP ou Sla1-GFP des taches corticales tardives. Cependant il nous a semblé que certaines des structures observées contenant uniquement Lsb3-Cherry n'étaient pas

directement localisées sous la membrane plasmique mais plus à l'intérieur de la cellule. Ces structures pourraient être le lieu où Lsb3 et Ent5 interagissent.

## B. Localisation simultanée des epsines et de Lsb3.

Dans une souche sauvage produisant à la fois les versions endogènes des epsines Ent3 et Ent5 et des versions étiquetées à la GFP, il a été montré, que les protéines Ent3-GFP et Ent5-GFP sont localisées au niveau des compartiments endosomaux marqués avec le fluorophore lipophile FM4-64 (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003).

Afin d'établir une localisation simultanée des protéines Ent3 ou Ent5 et Lsb3, nous avons construit, par recombinaison homologue, des souches haploïdes chez lesquelles les gènes *ENT3* et *ENT5* sont fusionés, en phase, aux étiquettes *GFP* ou *CHERRY*. J'ai réalisé ce travail avec Elodie Hanns, stagiaire que j'ai encadré au laboratoire. Les insertions au génome ont été vérifiées par PCR et les cellules ont été observées au microscope à fluorescence.



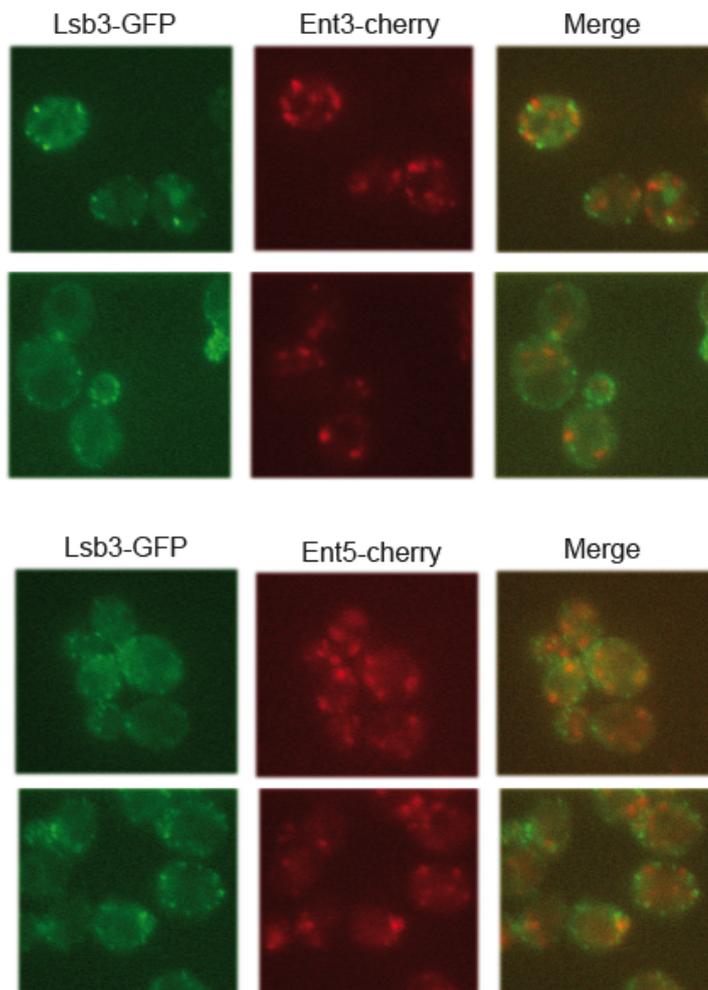
**Figure 39 : Localisation des Epsines Ent3 et Ent5.**

Des levures haploïdes produisant de façon endogène Ent3-GFP, Ent3-Cherry et Ent5-Cherry ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 100 X.

Nous avons obtenu les souches produisant Ent3-GFP, Ent3-Cherry et Ent5-Cherry mais pas celle produisant Ent5-GFP. Nous pouvons observer que Ent3 et Ent5 sont présentes au niveau de structures ponctuelles (Figure 39). Ces structures semblent plus larges que dans le cas de Lsb3 et Lsb4. Ces structures pourraient correspondre à des endosomes ou à l'appareil de Golgi, Ent3 et Ent5 étant impliquées dans l'internalisation au MVB et dans l'assemblage de

la clathrine au TGN (Costaguta et al., 2006; Duncan et al., 2003; Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). Cette localisation est très similaire à celle observée précédemment avec les plasmides codant pour Ent3-GFP et Ent5-GFP (Costaguta et al., 2006; Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). Une expérience de co-marquage avec du FM4-64, des marqueurs du Golgi ou des endosomes tardifs pourrait valider définitivement la localisation de ces protéines.

Afin de tester une éventuelle co-localisation entre Lsb3 et les epsines Ent3 et Ent5, j'ai construit génétiquement des souches haploïdes exprimant à la fois Lsb3-GFP et Ent3-Cherry ou Ent5-Cherry à partir des souches précédemment obtenues.



**Figure 40 : Localisation simultanée de Lsb3 et des epsines Ent3 et Ent5.**

Les levures exprimant Lsb3-GFP et Ent3-Cherry ou Ent5-Cherry ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 100 X.

Dans les conditions utilisées au laboratoire, nous n'avons pas observé de co-localisation entre Lsb3 et les epsines (Figure 40).

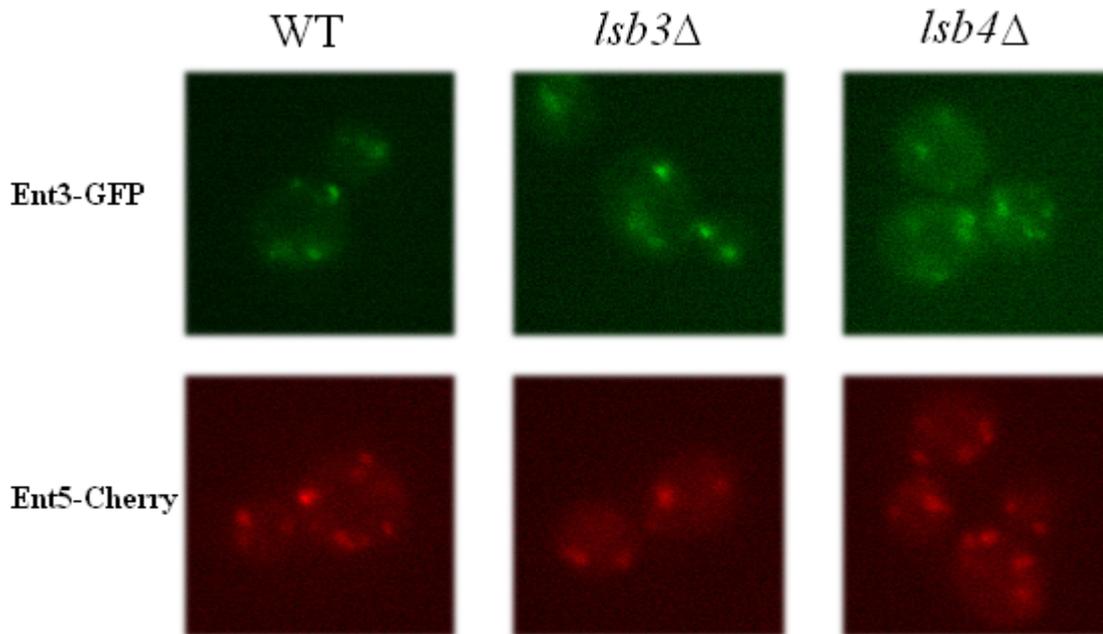
### **C. La localisation des epsines dans les mutants *lsb3*Δ ou *lsb4*Δ.**

Nous avons montré que les protéines Lsb3 et Ent5 interagissaient. Cependant les expériences de co-localisation ne montrent aucune co-localisation visible entre Lsb3 et les epsines Ent3 ou Ent5. Lsb3 semble uniquement présente aux taches corticales d'actine tandis que Ent3 et Ent5 ne le sont qu'au niveau des endosomes. Dans des cellules *lsb3*Δ, *lsb4*Δ, *lsb3*Δ*lsb4*Δ et *ent3*Δ*ent5*Δ l'internalisation au MVB des protéines de la voie VPS est perturbée. Par conséquent nous supposons que c'est au MVB que se fait l'interaction entre Lsb3 et Ent5, les deux protéines intervenant dans la formation des vésicules du MVB. Le rôle de Lsb3 pourrait alors être trop transitoire pour être observé au microscope. Une autre explication serait qu'une petite fraction du pool de Lsb3 soit impliquée, rendant l'observation microscopique très difficile.

Lorsque deux protéines interagissent au niveau d'un compartiment cellulaire, la localisation d'une des deux protéines peut être médiée par la présence de l'autre. Dans le cas de Lsb3 et Ent5, Ent5 possédant un domaine ENTH capable de lier le PI(3,5)P<sub>2</sub> présent aux membranes endosomales semblait le plus à même de s'associer au MVB et de recruter Lsb3. Cependant étudier une éventuelle modification de la localisation des protéines Lsb3 et Lsb4 lorsque les epsines Ent3 et Ent5 ne sont pas présentes ne m'a pas paru être nécessaire. En effet, la seule localisation observée pour Lsb3 par microscopie est celle observée pour les taches corticales d'actine suggérant que nous ne pourrions pas voir le changement de localisation de la sous-population à laquelle je m'intéresse dans une expérience de microscopie à fluorescence.

Je me suis alors intéressé à l'hypothèse d'un effet synergique du recrutement des epsines au niveau des compartiments endosomaux par Lsb3 ou Lsb4. Lorsque ces travaux ont été effectués la fonction du domaine YAB (alors appelé DUF500) n'était pas encore connue. Nous pouvions donc envisager que la protéine Lsb3 s'associe aux endosomes et permette le recrutement de Ent5, recrutement stabilisé par la liaison du domaine ENTH avec le PI(3,5)P<sub>2</sub>. J'ai donc décidé d'étudier la localisation de Ent3 et Ent5 dans des souches *lsb3*Δ et *lsb4*Δ.

Les mutants *lsb3Δ* et *lsb4Δ* ont été croisés avec les souches portant les gènes d'expression des protéines Ent3 et Ent5 étiquetées GFP. Les souches haploïdes délétées de *LSB3* ou *LSB4* et fluorescentes ont été isolées après sporulation.



**Figure 41 : Localisation des epsines Ent3 et Ent5 dans les mutants *lsb3Δ* et *lsb4Δ*.**  
Les souches sauvages ou délétées pour *LSB3* ou *LSB4* et exprimant Ent3-GFP et Ent5-Cherry ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 100 X.

La localisation des protéines Ent3 et Ent5 ne semble pas être perturbée dans les mutants *lsb3Δ* ou *lsb4Δ* (Figure 41). Bien que la localisation de Ent3 et Ent5 n'ait pas été analysée dans le double mutant *lsb3Δ lsb4Δ*, nous pouvons conclure que ni Lsb3 ni Lsb4 ne sont impliquées dans le recrutement des epsines à la membrane endosomale. En effet, le phénotype de séquestration des cargos ubiquitinés à la membrane vacuolaire est observé dans les cellules pour lesquelles seul *LSB3* (ou seul *LSB4*) est délété. L'effet de la délétion de *LSB3* ou *LSB4* sur le tri des cargos au MVB n'est donc pas dû à un effet de délocalisation de Ent3 ou Ent5.

Nous avons confirmés par les expériences de GST pull-down et de co-immunoprécipitation l'interaction directe entre Lsb3 et Ent5 mise en évidence par les expériences de protoarray. Toutefois, je n'ai pas pu mettre en évidence une co-localisation entre Lsb3 et les epsines ni de délocalisation des epsines dans une souche délétée pour *LSB3* ou *LSB4*. Je considère que cela peut s'expliquer par le fait que la grande majorité du pool

intracellulaire de Lsb3 se trouve au niveau des taches corticales d'actine, que seule une petite partie des protéines Lsb3 interagit avec la protéine Ent5 et que c'est Ent5 qui permettrait le recrutement de Lsb3 au MVB.



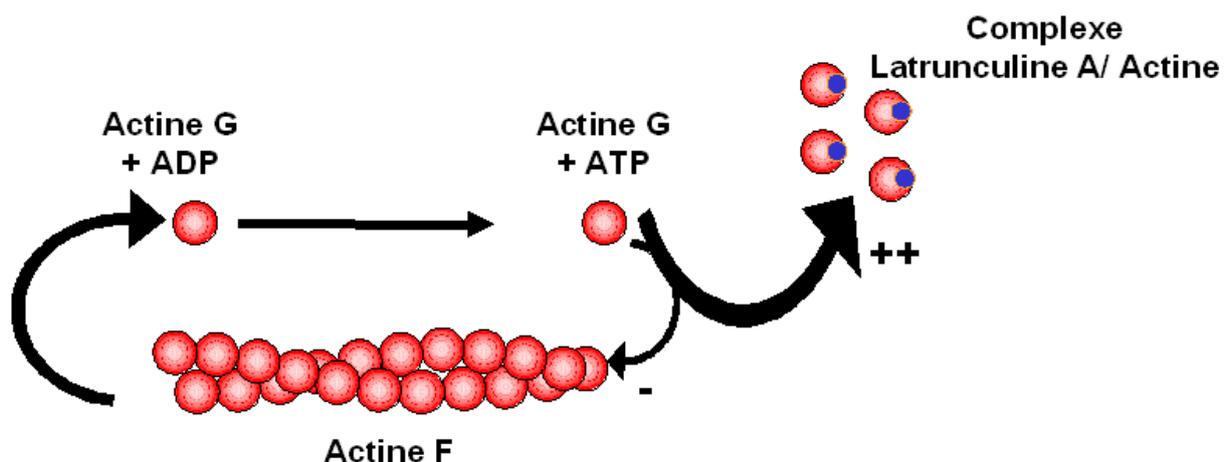
## IV. Lsb3, Lsb4 et l'actine.

Avant mon arrivée au laboratoire, il avait été montré que les protéines Lsb3 et Lsb4 interagissent avec Las17 (Madania *et al.*, 1999). Des travaux plus récents ont montré que ces deux protéines co-localisent avec l'actine. Cependant, aucun défaut d'internalisation n'a été mis en évidence dans les simples mutants *lsb3Δ* et *lsb4Δ* ou dans le double *lsb3Δ lsb4Δ* (Dewar *et al.*, 2002)(Observations personnelles avec Fur4-GFP).

La majorité des expériences concernant Lsb3, Lsb4 et le cytosquelette d'actine avaient été réalisées avec une simple délétion de *LSB3* ou de *LSB4*. Compte tenu de l'homologie des deux protéines, j'ai pensé que des effets sur la polymérisation de l'actine pourraient être visibles dans des souches portant la double délétion. En m'intéressant à la question du rôle de Lsb3 et Lsb4 au niveau des taches corticales d'actine j'ai construit génétiquement plusieurs souches de levures *lsb3Δ lsb4Δ* et j'ai donc pu procéder à des expériences portant sur la polymérisation de l'actine dans les souches *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ lsb4Δ*.

### A. Latrunculine A.

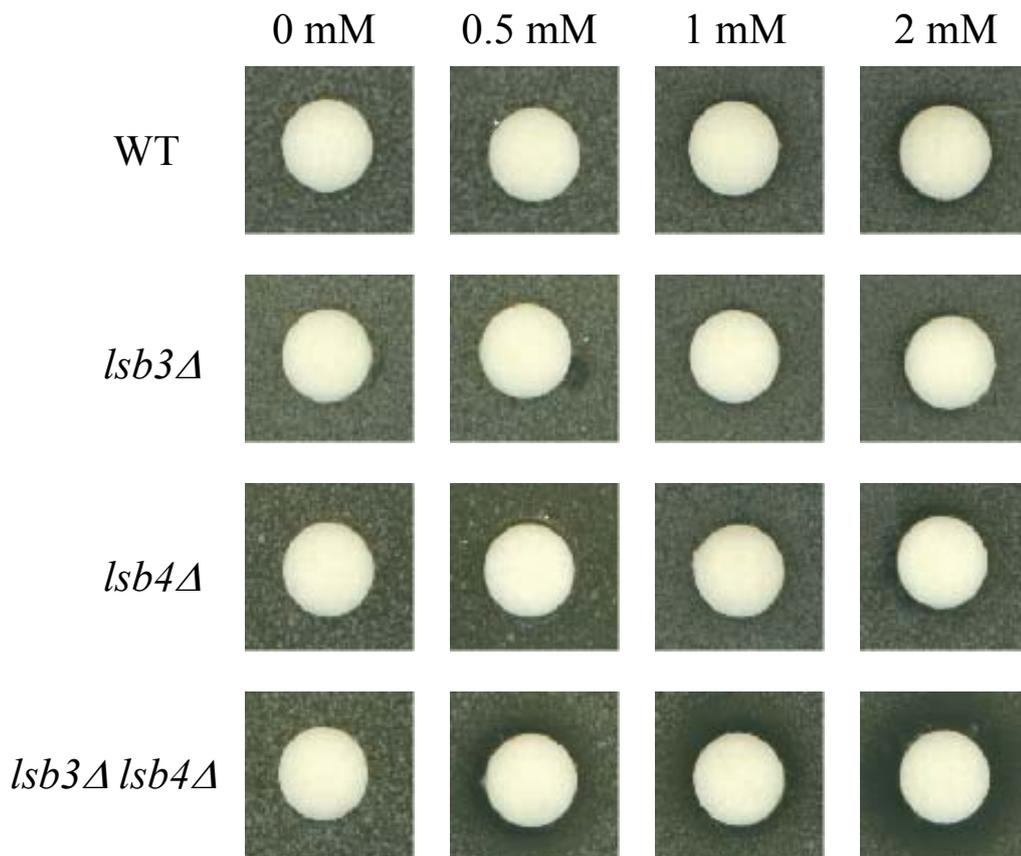
Une façon d'étudier la dynamique de l'actine est d'empêcher la polymérisation ou la dépolymérisation des filaments. Dans ce but, de nombreuses toxines sont utilisées telle la Latrunculine A qui affecte la polymérisation en séquestrant les monomères d'actine.



**Figure 42 : Effet de la Latrunculine A.**

En s'associant aux monomères d'actine G, la latrunculine A inhibe la polymérisation des filaments d'actine.

Lsb3 et Lsb4 sont associées aux taches corticales et à la machinerie de polymérisation de l'actine. Certaines protéines présentes dans cette machinerie peuvent avoir un effet d'activation ou d'inhibition de la polymérisation de l'actine. Afin de déterminer dans lequel de ces deux processus Lsb3 et Lsb4 sont impliqués, j'ai comparé la croissance cellulaire en présence de LatA des mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ lsb4Δ* à celle de la souche sauvage. Pour cela, les différentes souches ont été étalées sur milieu riche et des disques de papier filtre stériles avec différentes concentrations en LatA ont été placées sur ces boîtes. La LatA, empêchant la polymérisation de l'actine, inhibe la croissance des cellules sauvages et induit la formation d'un halo de non-croissance autour des filtres. Plus la concentration en LatA sur les disques est importante, plus la taille du halo est importante car cette drogue diffuse, créant un gradient de concentration. De nombreux mutants affectant la polymérisation de l'actine ont une sensibilité accrue à la LatA (Ayscough, 1998c).



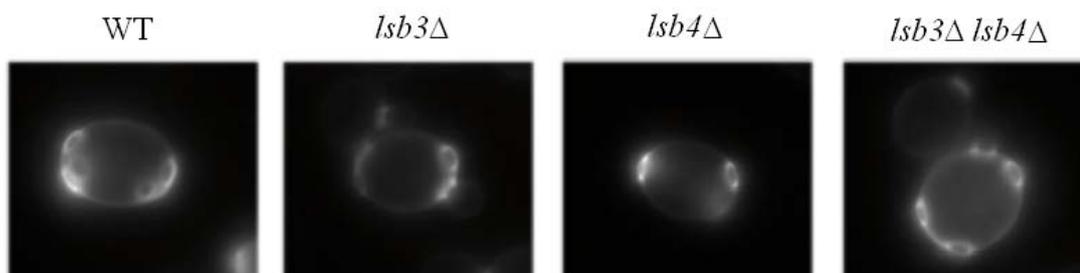
**Figure 43 : Sensibilité à la Latrunculine A des souches *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δlsb4Δ*.**

Test de croissance des souches *lsb3*, *lsb4* et *lsb3 lsb4* en présence de filtres contenant des concentrations croissantes de Latrunculine A. Pour les souches portant les simples délétions, aucun halo d'inhibition de croissance n'est observé en présence de concentrations croissantes de Latrunculine A. La souche portant la double délétion présente un halo d'inhibition de croissance dont le diamètre augmente avec la concentration de Latrunculine A.

Nous observons que la croissance des simples mutants *lsb3Δ* ou *lsb4Δ* est comparable à celle de la souche sauvage (Figure 43). Par contre, la croissance du double mutant *lsb3Δ lsb4Δ* est affectée par la présence de LatA et ce même à la plus faible concentration. Ceci confirme la nature redondante des deux protéines et suggère que la fonction de Lsb3 et de Lsb4 a soit un effet positif sur la polymérisation de l'actine, soit un effet négatif sur la dépolymérisation. Au cours de l'année 2009, il a été montré que Lsb4, en combinaison avec la région proline-riche de Las17, est un activateur direct de la polymérisation de l'actine (Robertson *et al.*, 2009). Etant donné la redondance des deux protéines mise en évidence par cette expérience, nous proposons qu'il en est de même pour Lsb3.

## B. Profil de bourgeonnement.

Chez *S. cerevisiae*, l'émergence du bourgeon est un processus polarisé. Chez les cellules diploïdes, le bourgeonnement alterne entre les deux pôles alors que chez les cellules haploïdes il se fait toujours au même pôle. La sélection du site de bourgeonnement nécessite le recrutement du cytosquelette d'actine qui assure l'acheminement des composants indispensables à la croissance du bourgeon. Lorsque certaines protéines importantes du cytosquelette d'actine sont absentes ou non-fonctionnelles, cela peut entraîner un bourgeonnement aléatoire. Chaque bourgeonnement laisse une cicatrice en forme d'anneau au niveau de la cellule. Ces cicatrices, correspondant à l'accumulation de chitine, peuvent être détectées par la coloration au calcofluor white. J'ai donc examiné la localisation des cicatrices de chitine, afin de tester la polarisation des bourgeons chez les simples mutants ainsi que dans le diploïde double mutant homozygote *lsb3Δ lsb4Δ*.



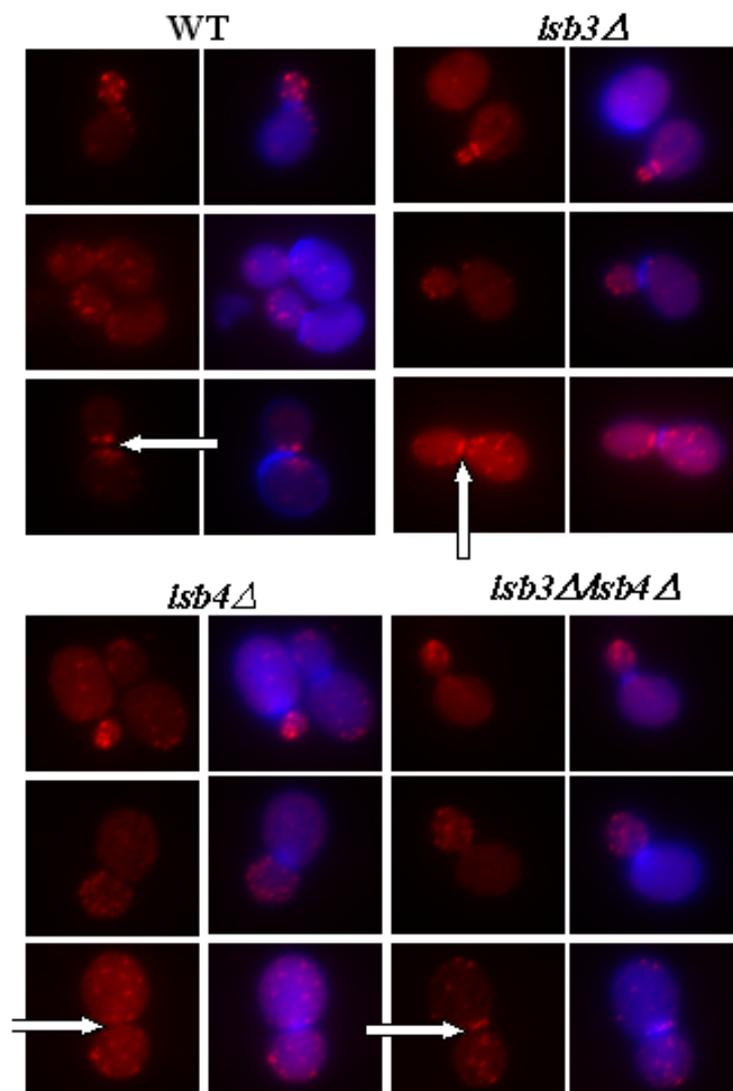
**Figure 44 : Profil de bourgeonnement dans des souches diploïdes.**

Image de microscopie à fluorescence montrant les cicatrices de chitine marquées au calcofluor white qui fluoresce à 510 nm et qui est observé avec le filtre DAPI.

Aucune des souches testées ne présente un bourgeonnement aléatoire (Figure 44), indiquant que les souches ne présentent pas de déficience de la polarisation de la croissance.

### C. Organisation du cytosquelette d'actine.

Je me suis également intéressé au rôle des protéines Lsb3 et Lsb4 dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Comme nous l'avons vu chez la levure, l'actine polymérisée est présente sous trois formes différentes : les câbles d'actine, les taches corticales d'actine et l'anneau contractile d'acto-myosine. Afin de visualiser les structures d'actine des cellules cultivées durant la nuit sont fixées puis colorées avec de la phalloïdine couplée à la Rhodamine, un fluorophore rouge. La phalloïdine est une drogue qui se fixe spécifiquement à l'actine polymérisée.



**Figure 45. Organisation du cytosquelette d'actine.**

En rouge la phalloïdine permet de visualiser l'actine polymérisée, en bleu le Calcofluor White permet de visualiser la paroi cellulaire. L'anneau d'actomyosine est indiqué par la présence d'une flèche.

En accord avec les résultats obtenus pour le bourgeonnement, aucune des souches testées ne présente de défaut visible dans l'organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire (Figure 45). Les taches corticales d'actines sont correctement polarisées et sont situées au site d'émergence du bourgeon et dans les bourgeons en croissance. Par ailleurs, l'anneau contractile d'acto-myosine est visible à l'étranglement entre la cellule mère et la cellule fille avant la cytokinèse.

Nous avons pu constater que la double délétion *lsb3Δ lsb4Δ* avait un impact sur la polymérisation d'actine qui n'était pas observé pour les simples délétions *lsb3Δ* et *lsb4Δ*. Lsb3 et Lsb4 présentent une activité redondante d'activation de la polymérisation de l'actine. Cependant, cette activité ne semble pas impliquée dans la sécrétion nécessaire à la croissance ou dans l'organisation des patchs corticaux d'actine. Ceci est en accord avec ce qui a été observé en suivant les cargos du trafic intracellulaire. Ce rôle d'activation de la polymérisation de l'actine pourrait se révéler important pour l'internalisation au MVB. Néanmoins, dans le mécanisme d'internalisation au MVB nous avons montré que les fonctions de Lsb3 et Lsb4 n'étaient pas redondantes.

# Discussion

## I. Interaction entre Lsb3 et Ent5.

Les résultats obtenus dans le laboratoire de Sylvie Friant avec les puces protéiques ont révélé une interaction entre Lsb3 et les deux epsines Ent3 et Ent5. Aucune interaction n'a été observée entre Lsb4 (le paralogue de Lsb3) et les epsines car Lsb4 n'était pas présente sur les puces, ceci vraisemblablement en raison de son abondance moindre (Rocco *et al.*, 1993). Ces interactions nous ont intéressé car les epsines Ent3 et Ent5 sont impliquées au niveau de l'appareil de Golgi et dans la voie VPS tandis que les protéines Lsb3 et Lsb4 interagissent avec la machinerie de nucléation de l'actine aux taches corticales. Ces résultats suggèrent donc une interaction physique entre des protéines impliquées dans deux étapes distinctes du trafic intracellulaire. L'un des objectifs de ma thèse a été de confirmer l'interaction entre Lsb3 et Ent3 et/ou Ent5 et de tester une éventuelle interaction entre Lsb4 et ces epsines. Ceci a été réalisé *in vitro* par GST pull-down, en utilisant les protéines de fusion N-terminale GST-Ent3 et GST-Ent5 comme appâts sur un extrait de levure totale contenant soit Lsb3-HA soit Lsb4-HA. J'ai confirmé l'interaction entre Lsb3 et Ent5 par ces expériences mais pas celle entre Lsb3 et Ent3, ni pu mettre en évidence une interaction entre Lsb4 et Ent3 ou Ent5. D'autre part l'interaction entre Lsb3 et Ent5 a également pu être observée dans des extraits totaux de cellules entières lors d'une expérience de co-immunoprécipitation entre Lsb3-Myc et l'epsine Ent5 endogène, suggérant que cette interaction a lieu *in vivo*.

L'absence d'interaction entre Lsb3 et Ent3 dans mes expériences (alors qu'elle a été observée sur les protoarrays) pourrait s'expliquer par l'étiquetage des protéines. Les protéines déposées sur la puce sont toutes étiquetées GST-6xHis en N-terminale, alors que dans mes expériences de GST pull-down ou d'immunoprécipitation, Lsb3 est étiquetée en C-terminale (Mitchell *et al.*, 1993). Les protéines déposées sur la puce et les protéines utilisées chez la levure ne sont donc pas étiquetées au niveau de la même extrémité. Cela pourrait expliquer l'absence d'interaction entre Lsb3 et Ent3 et également expliquer l'absence d'interaction de Lsb4 avec les epsines. Cependant, les protéines Lsb3 et Lsb4 présentant une forte homologie et ayant été étiquetées de la même manière, je m'attendais à observer au moins une interaction entre Lsb4 et Ent5 et je ne pense pas que l'étiquette soit responsable de l'absence d'interaction. Cette absence de la mise en évidence d'interaction pourrait en revanche s'expliquer par la

faible expression de la protéine Lsb4 (Rocco *et al.*, 1993). Une expérience d'immunoprécipitation avec la protéine Lsb4 surexprimée permettrait de valider ou éliminer cette hypothèse.

Il semble donc que nous soyons en présence d'un mécanisme finement régulé car les protéines Lsb3 et Lsb4 ou Ent3 et Ent5 présentent des organisations de structure similaire et pourtant seulement deux d'entre elles interagissent l'une avec l'autre.

## II. L'internalisation des protéines empruntant la voie VPS.

Ayant confirmé que Lsb3 interagit avec Ent5, nous avons cherché à déterminer si Lsb3, mais aussi Lsb4, étaient impliquées dans le trafic intracellulaire aux mêmes étapes que Ent3 et Ent5 et dans l'affirmatif, à déterminer à quelle(s) étape(s). Pour cela, nous avons étudié l'effet des simples ou de la double délétion des gènes *LSB3* et *LSB4* sur le trafic intracellulaire des protéines empruntant la voie VPS (comme DPAP-B (protéase membranaire de la vacuole), Phm5 (polyphosphatase vacuolaire), Cps1 (peptidase vacuolaire) et Sna3 (protéine de la vacuole) ou la voie d'endocytose comme Fur4 (transporteur de l'uracile de la membrane plasmique) (Darsow et al., 1998; Odorizzi et al., 1998; Oestreich et al., 2007a; Reggiori and Pelham, 2001; Stawiecka-Mirota et al., 2007).

J'ai pu montrer que dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ lsb4Δ*, les localisations de Cps1 et de Phm5 étaient perturbées mais pas celles des cargos d'endocytose ou des cargos DPAP-B, Sna3 et Vam3. Les protéines Cps1 et Phm5, normalement internalisées dans les vésicules du MVB, se retrouvent ensuite dans le lumen de la vacuole. Dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ lsb4Δ*, elles sont localisées à la membrane de la vacuole. Ceci indique que dans ces mutants, ni Cps1 ni Phm5 ne sont incorporées dans les vésicules qui forment le MVB mais restent à la membrane de celui-ci. DPAP-B et Vam3 empruntant la même voie mais ne nécessitant pas d'internalisation dans les vésicules du MVB sont correctement localisées dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ lsb4Δ*. Ceci indique que le phénotype observé pour Cps1 et Phm5 concerne bien l'internalisation aux MVBs. La localisation correcte des cargos issus de l'endocytose et de Sna3 dans le lumen de la vacuole dans les mutants *lsb3Δ*, *lsb4Δ* et *lsb3Δ/lsb4Δ* indique que Lsb3 et Lsb4 sont impliquées dans une internalisation spécifique de certains cargos de la voie VPS, au niveau des vésicules du MVB.

Il est intéressant de noter que l'effet de la délétion de *LSB4* est similaire à celle de la délétion de *LSB3* alors la protéine Lsb4 est beaucoup moins abondante que Lsb3. Ceci suggère que malgré un fort taux d'homologie et une structure similaire, ces protéines ne sont pas redondantes pour la fonction de tri protéique au MVB. De plus, malgré l'absence de mise en évidence d'interaction entre Lsb4 et les epsines Ent3 et Ent5, la simple délétion de *LSB4* entraîne un phénotype similaire à celui observé dans le double mutant *ent3Δent5Δ*.

La localisation à la membrane vacuolaire de DPAP-B et de Vam3 n'est pas affectée dans les mutants *lsb3Δ* et *lsb4Δ* ou dans le double mutant *lsb3Δ lsb4Δ*. Or, tandis que Cps1 et Phm5 sont localisées à la membrane vacuolaire, ni Sna3 ni le marqueur d'endocytose Fur4 ne le sont. Ceci n'est pas observé pour le double mutant *ent3Δ ent5Δ* dans lequel Ste2 s'accumule à la membrane vacuolaire (Eugster *et al.*, 2004). Une telle dichotomie entre Cps1 et Phm5 d'une part, et Sna3 d'autre part est par contre observée en absence de la PI(3)P kinase Fab1 (Reggiori and Pelham, 2002). De plus, la délétion du gène *FAB1* a un effet spécifique vis-à-vis de la localisation vacuolaire de différents marqueurs d'endocytose. En effet, le récepteur de la phéromone **a**, Ste3, n'est pas affecté alors que celui de la phéromone **α** Ste2 l'est (Odorizzi *et al.*, 1998; Reggiori and Pelham, 2002). Au cours de ma thèse je n'ai pas travaillé avec le cargo Ste3-GFP et le cargo Ste2-GFP n'a pas été utilisé dans les cellules *lsb3Δ lsb4Δ* mais est correctement localisé dans les simples mutants *lsb3Δ* et *lsb4Δ*.

Tous ces éléments conduisent à penser que les protéines Lsb3 et Lsb4 sont impliquées dans un processus les liant à Ent3, Ent5 et Fab1 dans l'internalisation de certaines protéines dans les vésicules internes du MVB. N'étant pas internalisées au niveau des vésicules internes du MVB, Cps1 et Phm5, protéines de la voie VPS, s'accumulent à la membrane externe et, après la fusion du MVB avec la vacuole, se retrouvent à la membrane vacuolaire. Cependant Lsb3 et Lsb4 ne sont pas impliquées directement dans la machinerie des ESCRTs car elles ne présentent pas le phénotype des mutants Vps de classe E (Banta *et al.*, 1988; Raymond *et al.*, 1992).

### III. Localisation de Lsb3 et Lsb4.

Il a été montré que Lsb3 et Lsb4 surproduites sont localisées à la membrane plasmique et, plus particulièrement, au niveau des sites d'endocytose (Dewar et al., 2002; Robertson et al., 2009; Tonikian et al., 2009). Lsb3 et Lsb4 sont donc localisées au niveau de patches directement sous la membrane. Nous avons montré le rôle important de Lsb3 et Lsb4 dans le tri des protéines au MVB ainsi que l'interaction de Lsb3 avec Ent5. Ceci suggère qu'une partie des protéines Lsb3 et Lsb4 est également localisée au niveau des endosomes. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de co-localisation microscopique ont été effectuées mais n'ont pas révélé de co-localisation visible. Une expérience de fractionnement subcellulaire a été réalisée sur des lysats cellulaires totaux de cellules produisant Lsb3-HA ou Lsb4-HA à des niveaux endogènes (Travail de Johan De Craene, post doctorant dans le laboratoire de Sylvie Friant). L'expérience révèle que Lsb3 et Lsb4 sont essentiellement présentes dans les fractions membranaires P13 (membrane plasmique, RE et vacuole) et P100 (appareil de Golgi et endosomes) mais absentes du S100 (cytosol et vésicules). Cela indique qu'elles ne sont pas cytosoliques mais associées avec des compartiments cellulaires ou des structures protéiques denses telle que le cytosquelette d'actine. Les protéines Ent3 et Ent5 quant à elles sont majoritairement présentes dans le P13 mais on en retrouve également dans le P100 et du S100 (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). Dans une souche *fab1Δ* la fraction de Ent3 présente dans le P100 disparaît (Friant *et al.*, 2003). Ceci indique que Ent3 est effectivement associée aux membranes endosomales et que cette association se fait *via* l'interaction avec le PI(3,5)P<sub>2</sub>. Nous supposons que le pool de protéines Lsb3 présentes dans le P100 correspond également à des protéines associées aux endosomes. Il serait intéressant de réaliser des expériences de fractionnement subcellulaire de Lsb3-HA dans des souches *fab1Δ* ou *Ent3Δ Ent5Δ*.



## IV. Actine et MVB.

Nos résultats s'inscrivent dans une série de résultats suggérant un lien entre le cytosquelette d'actine et le tri protéique au MVB. En effet, il a été montré chez les embryons de *D. Melanogaster* qu'une mutation d'une protéine du complexe ESCRT-1, dVps28, altère de nombreux processus requérant le cytosquelette d'actine (Sevrioukov *et al.*, 2005). Chez la levure, Vps28 est une protéine de classe E présente dans ESCRT-1, permettant le recrutement par ce dernier du complexe ESCRT-2 (Gill *et al.*, 2007; Pineda-Molina *et al.*, 2006). Il a également été montré, chez la levure, que des mutants affectant les patchs d'actine tel que *las17-16* ou *arp2Δ* ont une vacuole fragmentée (Eitzen *et al.*, 2002) et qu'un mutant initialement identifié comme un suppresseur de la mutation *act-1-1* affecte la voie VPS (Sac2/Vps52) (Conibear and Stevens, 2000; Novick *et al.*, 1989). Le lien entre l'actine et le MVB est renforcé par le fait que le mutant *fab1Δ*, en plus de ses défauts vacuolaires, présente des problèmes d'orientation du fuseau mitotique et de distribution des chromosomes (Yamamoto *et al.*, 1995a), processus dans lesquels l'actine est impliquée.

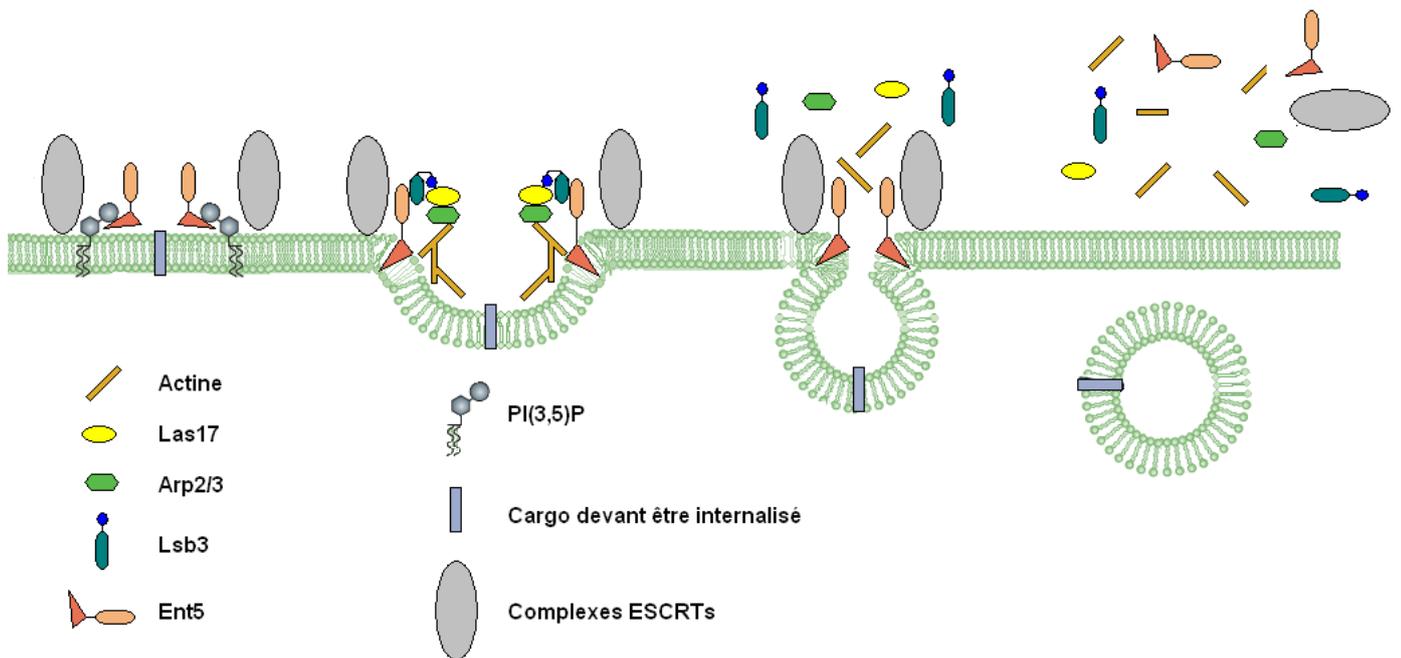
Tous ces résultats nous indiquent que la polymérisation de l'actine, la voie VPS ou la fusion homotypique des vacuoles sont des mécanismes liés les uns aux autres au sein de la cellule.

Les domaines YAB de Lsb3 et Lsb4 sont capables de lier l'actine (Robertson *et al.*, 2009) et nous montrons que Lsb3 interagit également avec la protéine Ent5, qui s'associe *via* son domaine ENTH avec le PI(3,5)P<sub>2</sub> (Eugster *et al.*, 2004; Friant *et al.*, 2003). Le PI(3,5)P<sub>2</sub>, synthétisé par Fab1, est impliqué dans le processus d'internalisation des protéines dans les vésicules internes du MVB (Dove *et al.*, 1997). De façon intéressante, chez les plantes, le domaine YAB est présent dans des protéines possédant également un domaine FYVE (Robertson *et al.*, 2009) (Figure 11). Le domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac 1, EEA1) interagit avec le PI(3)P, enrichi au niveau des endosomes (Burd and Emr, 1998; Gillooly *et al.*, 2000; Stenmark *et al.*, 2002). Le fait de trouver, dans des protéines de plante, des domaines provenant de familles de protéines différentes chez les métazoaires et les champignons renforce notre hypothèse selon laquelle Lsb3 et Ent5 servent de lien entre l'internalisation à la membrane plasmique et le tri au MVB. En effet, les protéines sont modulaires et un mécanisme donné nécessite que tous les domaines requis soient présents mais n'implique pas nécessairement qu'ils soient portés par les mêmes protéines.

Un lien existe déjà entre les epsines et le cytosquelette d'actine puisqu'il a été montré que le recrutement de l'actine aux futurs sites d'endocytose se fait notamment grâce aux protéines Ent1 et Ent2 qui possèdent des domaines d'interaction au PI(4,5)P<sub>2</sub> (Newpher et al., 2005; Wendland, 2002). Il a de plus été proposé que le domaine ENTH de Epsine 1, l'homologue de Ent1 et de Ent2 chez les mammifères, est impliqué dans le processus de courbure de la membrane lors de l'endocytose (Ford et al., 2002; Yoon et al., 2009). Ent1 et Ent2 pourraient faire de même au niveau de l'endocytose chez la levure tandis que Ent3 et Ent5 seraient impliquées dans la courbure de la membrane du MVB.

Les complexes ESCRTs interviennent lors du tri des cargos devant être internalisés au MVB. Cependant le mécanisme permettant la formation et l'invagination des vésicules n'est pas défini. La figure 46 propose un modèle qui pourrait se dérouler chez la levure en parallèle du tri par la machinerie des ESCRTs. En se liant, *via* son domaine ENTH, au PI(3,5)P<sub>2</sub> de la membrane endosomale, Ent5 permet le recrutement de Lsb3. Lsb3, *via* ses domaines SH3 et YAB va, à son tour, recruter la machinerie de polymérisation de l'actine branchée. La polymérisation de l'actine branchée va permettre de pousser la membrane endosomale vers l'intérieur du MVB, la courbure de la membrane étant induite par le domaine ENTH de Ent5. Lorsque le nœud d'étranglement de la vésicule est sur le point de se refermer, la machinerie de polymérisation d'actine est démantelée et la vésicule migre vers l'intérieur du MVB.

Pour exercer sa pression sur la membrane endosomale, l'actine pourrait polymériser avec le complexe Arp2/3 tandis que le complexe ESCRT-3 lui servirait de point d'ancrage. La protéine Vps4, qui est impliquée dans le mécanisme de désassemblage des ESCRTs possède un domaine MIT capable de s'associer au microtubules chez les mammifères et pourrait être un bon candidat pour cet ancrage de l'extrémité barbelée des filaments d'actine (Ciccarelli et al., 2003).



**Figure 46 : Modèle proposant un rôle de la polymérisation de l'actine au niveau du MVB.**

Chez les plantes, la fixation à la membrane du MVB et le recrutement du complexe de polymérisation de l'actine serait le fait d'une seule et même protéine possédant les domaines YAB et FYVE. Malheureusement, la famille de protéines de plantes possédant ces deux domaines n'a pas encore été étudiée et nous ne pouvons pas tester notre hypothèse. De plus leur étude se révélerait assez compliquée du fait qu'il existe plusieurs paralogues.

Par ailleurs, le domaine YAB est aussi présent chez certaines bactéries, où il pourrait lier la protéine MreB qui est considérée comme l'homologue bactérien de l'actine (van den Ent *et al.*, 2001). Cependant, chez les bactéries il n'existe pas d'endosomes et l'interaction avec l'actine serait la fonction primaire de ces protéines. On peut alors supposer que les protéines possédant des domaines YAB ont acquis au fur et à mesure de l'évolution la capacité de se lier aux membranes endosomales (chez les plantes) ou à des protéines interagissant avec ces membranes (chez les levures et les mammifères).



## Conclusion et perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer que Lsb3 et son homologue Lsb4 sont impliquées dans deux mécanismes différents ; dans la polymérisation de l'actine lors du processus d'endocytose, où les deux protéines sont fonctionnellement redondantes et dans l'internalisation au MVB des protéines empruntant la voie VPS. Dans cette deuxième fonction, Lsb3 et Lsb4 ne sont pas redondantes. En effet, des perturbations de la voie VPS sont observées lorsqu'une seule des deux protéines est absente. J'ai par ailleurs montré que Lsb3 interagissait *in vitro* et probablement *in vivo* avec la protéine Ent5. Les epsines Ent3 et Ent5 sont également impliquées dans l'internalisation des protéines ubiquitinées dans les vésicules internes du MVB, peut être, suivant le modèle de l'epsine 1 chez les mammifères, dans le mécanisme de courbure de la membrane (Yoon et al., 2009). Aucune interaction n'a pu être montrée entre Lsb4 et les epsines, ce qui appuierait le fait que Lsb3 et Lsb4 présentent des fonctions non redondantes au niveau du MVB.

Afin de continuer ces travaux, il est prévu de tester différents mutants affectant la mise en place du cytosquelette d'actine (*las17Δ* mais aussi *rvs167Δ*, *arp2-1* et *arp2-7*) avec des cargos empruntant la voie VPS. Par ailleurs, afin de déterminer les domaines impliqués dans l'interaction entre Lsb3 et Ent5, j'ai construit des plasmides permettant la production des domaines YAB et SH3 de Lsb3, et je dispose aussi des plasmides permettant de produire le domaine ENTH et la partie C-terminale de Ent5. Tous ces domaines sont étiquetés GST en N-terminal.

Nous pensons que Lsb3 pourrait être transitoirement recrutée au niveau de la membrane du MVB aux sites enrichis en PI(3,5)P<sub>2</sub>, où elle interagirait avec Ent5. Cette localisation de Lsb3 permettrait le recrutement du NPF Las17, connectant ainsi la machinerie de polymérisation de l'actine et permettant une internalisation dans les endosomes, avec un mécanisme de poussée exercé par le cytosquelette d'actine sur la vésicule à internaliser.

Pour tester notre modèle, nous ne pouvons étudier par microscopie la localisation de Lsb3 dans des mutants epsines car les taches corticales d'actine sont les seules structures que nous observons dans nos conditions expérimentales. Cependant nous pouvons déterminer l'effet des délétions de *ENT3*, *ENT5* et de *FAB1* sur la distribution subcellulaire de Lsb3 et Lsb4 par fractionnement. La protéine Fab1 permet la synthèse du PI(3,5)P<sub>2</sub> présent à la



membrane endosomale ; chez le mutant *fab1Δ*, des expériences de fractionnement subcellulaire ont montré que la fraction P100 des protéines Ent3 et Ent5, présente chez les cellules sauvages, disparaît. Nous pensons voir un effet similaire sur la distribution subcellulaire de Lsb3 et Lsb4 pourrait être mis en évidence. Enfin, nous regarderons par ailleurs si dans des mutants *vps* les protéines Lsb3 et Lsb4 étiquetées GFP peuvent être observées dans les compartiments de classe E.

En conclusion, nous avons mis en évidence le rôle de certaines protéines du cytosquelette d'actine dans l'internalisation des protéines de la voie VPS. Le mécanisme permettant la formation des vésicules du MVB est encore inconnu à ce jour. Nous pensons que nos travaux apportent un début de réponse à cette question. Les études complémentaires que nous envisageons portent sur l'interaction entre le trafic intracellulaire et la machinerie de polymérisation de l'actine. Nous espérons ainsi pouvoir affiner le modèle que nous proposons dans lequel nous envisageons un phénomène de propulsion/poussée de la membrane du MVB vers l'intérieur de ce compartiment pour former des vésicules. Cette poussée serait exercée par grâce à la force de polymérisation de l'actine.



# Matériels et méthodes

## I. Bactéries.

### A. Souches utilisées et génotypes.

- Souches d'*Escherichia coli* utilisées lors des clonages et de la production de protéines.

**DH5 $\alpha$**  : (*fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*LacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

**TOP10** (*F- mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*LacZ*)*M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 D(araleu) 7697 ga/U ga/K rpsL (St rR) endA1 nupG*).

**BL21 Rosetta II** : (*F- ompT lon hsdSB (rB- mB-)* gal dcm (DE3) pLysSRARE).

Le plasmide pLysRARE code pour les ARNts à codons rares et porte le marqueur de résistance au chloramphénicol.

### B. Conditions de croissance, milieux de culture et conservation.

Les cultures se font en milieu liquide ou solide à 37°C. Le milieu utilisé est le :

#### Milieu LB (Luria Broth) :

Bactotryptone : 10g/L ; Extrait de levure : 5g/L ; NaCl : 5 g/L

Les antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (concentration finale 100  $\mu$ g/ml) et le chloramphénicol (concentration finale 34  $\mu$ g/ml) pour le maintien des plasmides portant les gènes AmpR et CamR conférant les résistances à ces antibiotiques.

Pour les cultures en milieu liquide, une unité d'absorbance à la longueur d'onde de 600 nm correspond approximativement à 10<sup>9</sup> bactéries.

Les cellules sont conservées dans du milieu glycérolé (25 %) à – 80°C.

## **C. Transformation des plasmides chez les bactéries.**

### **1. Préparation d'ADN.**

Tous les plasmides utilisés ont été isolés à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep Kit basé sur une lyse alcaline des cellules et une adsorption de l'ADN sur une membrane de silice en présence d'une forte concentration de sels. Le protocole suivi est celui décrit dans le manuel d'utilisation du manufacturier.

### **2. Cellules chimiocompétentes.**

Les bactéries sont incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, elles sont diluées dans du milieu SOB jusqu'à une DO de 0,4. Elles sont alors refroidies 10 min dans la glace puis centrifugées (15 min, 2 500 g, 4°C). Le culot est repris dans 4 ml de milieu TB froid, après 10 min sur la glace, les cellules sont de nouveau centrifugées (2500 g, 4°C) et resuspendues dans 1 ml de TB froid. Du DMSO est ajouté goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 7 % et les cellules sont incubées encore 10 min sur la glace. A cette étape les bactéries peuvent être aliquotées et stockées à -80°C.

**Milieu SOB** : Bacto tryptone 2 % (m/v) ; Yeast extract 0,5 % (m/v) ; NaCl 10 mM ; KCl 2,5 mM ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; MgSO<sub>4</sub> 10 mM

**Milieu TB** : Pipes 10 M pH 7 ; MnCl<sub>2</sub> 55 mM ; CaCl<sub>2</sub> 15 mM ; KCl 250 mM.

Si nécessaire ajuster le pH à 6,7 avec 5 M de soude avant d'ajouter le chlorure de manganèse.

### **3. Transformation des cellules chimiocompétentes.**

A 50 µL de bactéries chimiocompétentes est ajouté l'ADN à transformer ( $\leq 100$  ng). Les cellules sont incubées sur la glace pendant 20 min avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Suite au choc thermique, les cellules sont immédiatement remises dans la glace pendant 5 min. 450 µL de milieu LB sont ajoutés, les cellules sont placées 30 minutes à 37°C afin d'être régénérée. Les cellules sont ensuite centrifugées et étalées sur un milieu solide de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.

#### **4. Cellules électrocompétentes.**

Les bactéries sont cultivées toute la nuit à 37°C dans du milieu LB avec les antibiotiques adéquats. Au matin elles sont diluées ( $DO_{600} = 0.01$ ). Lorsque la  $DO_{600}$  est comprise entre 0,5 et 0,8, elles sont refroidies 20 min dans la glace puis centrifugées 15 minutes à 4°C et 2000g. Le culot est repris dans le même volume d'eau froide. Les cellules sont à nouveau centrifugées et lavées dans 1/2 volume d'eau froide, puis reprises dans 1/25 volume de glycérol 10 % froid. Une dernière centrifugation est faite pour reprendre les cellules dans 1/200 volume de glycérol 10 % froid. A cette étape les bactéries peuvent être aliquotées et stockées à -80°C après congélation dans l'azote liquide.

#### **5. Electroporation.**

A 40 µL de bactéries électrocompétentes est ajouté l'ADN à transformer ( $\leq 100$  ng). La transformation est réalisée à l'aide d'un appareil d'électroporation " Gene pulser II " (BioRad) avec un voltage de 2,5 kV, une résistance de 200 Ohms et une capacité de 25 µF. La constante de temps est alors de 4,5 à 5 ms. Immédiatement après le choc électrique, 200 µL de LB froid sont ajoutés aux cellules qui sont alors placées à agiter à 37°C pendant 30 min. Les cellules sont finalement étalées sur un milieu solide de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.



## II. Levures.

### A. Souches utilisées et géotypes.

Nom	Géotype	Origine
By 4741	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 Met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
By 4742	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
1d	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0</i>	Johan De Craene
11b	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0</i>	Johan De Craene
lsb3Δ	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3::KANMX6</i>	Open Biosystems
lsb4Δ	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb4::KANMX6</i>	Open Biosystems
DDY 2736	<i>Mat a his3Δ200 leu2.3,112 lys2.801 ura3.52 LAS17 (GFP HIS3)</i>	Rodal et al, 2003
WT Fy	<i>Mat α ura3.52</i>	Soulard et al, 2002
Las17Δ	<i>Mat a ura3.52 las17 :: HIS5MX6</i>	Soulard et al, 2002
yVD111	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0- lsb3::HIS5MX6</i>	Délétion de <i>LSB3</i> dans la souche 11b
yVD113	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0- lsb4::HIS5MX6</i>	Délétion de <i>LSB4</i> dans la souche 11b
yVD115	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb3::HIS5MX6 lsb4::KANMX6</i>	Spore issue du croisement de lsb4Δ avec Yvd111
yVD127	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb3::HIS5MX6 lsb4::KANMX6</i>	Spore issue du croisement de By4741 avec Yvd115
yVD130	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3::HIS5MX6 lsb4::KANMX6</i>	Délétion de <i>LSB3</i> dans la souche lsb4Δ
yVD132	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 Met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Croisement de By4741 avec By4742
yVD133	<i>his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/LEU2 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 lsb3::KANMX6/lsb3::HIS5MX6</i>	Croisement de lsb3Δ avec yVD111
yVD135	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/LEU2 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ ura3Δ0 lsb4::KANMX6/lsb4::HIS5MX6</i>	Croisement de lsb4Δ avec yVD113
yVD137	<i>his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 lsb3::HIS5MX6/lsb3::HIS5MX6 lsb4::kanMX6/lsb4::kanMX6</i>	Croisement de yVD127 avec yVD130
yVD139	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 Met15Δ0 ura3Δ0 LSB3 (GFP GenR)</i>	Insertion <i>GFP/3' LSB3</i> dans la souche By4741
yVD141	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0 LSB3 (GFP GenR)</i>	Insertion <i>GFP/3' LSB3</i> dans la souche 1d
yVD148	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 (pGAL-GenR) LSB3 (GFP-HIS)</i>	Insertion <i>PGAL/5'</i> et <i>GFP/3' LSB3</i> dans la souche 11b
yVD150	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0 LSB3 (CHERRY KANMX6)</i>	Insertion <i>CHERRY/3' LSB3</i> dans la souche 1d
yVD171	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0 LSB3 : (HA His)</i>	Insertion <i>HA/3' LSB3</i> dans la souche 1d
yVD176	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 LSB4 : (HA KANMX6)</i>	Insertion <i>HA/3' LSB4</i> dans la souche 11b
yVD177	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 LSB4 : (HA HIS)</i>	Insertion <i>HA/3' LSB3</i> dans la souche 11b
yVD202	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 LSB3 : (MYC KANMX6)</i>	Insertion <i>MYC/3' LSB3</i> dans la souche 11b
yVD206	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 LSB4 : (MYC KANMX6)</i>	Insertion <i>MYC/3' LSB4</i> dans la souche 11b
yVD209	<i>Mat α his3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 LSB3 : (MYC KANMX6)</i>	Spore issue du croisement de yVD202 avec By4742
yVD211	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 LSB4 : (MYC KANMX6)</i>	Spore issue du croisement de yVD206 avec By4742
yVD212	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 LSB4 : (MYC KANMX6)</i>	Spore issue du croisement de yVD211 avec DDY2736
yVD233	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 Met15Δ0 ura3Δ0 Ent3 (GFP HIS3)</i>	Insertion <i>GFP/3' ENT3</i> dans la souche By4741
yVD236	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 Met15Δ0 ura3Δ0 ENT3 (CHERRY HIS3)</i>	Insertion <i>CHERRY/3' ENT3</i> dans la souche By4741
yVD247	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 Met15Δ0 ura3Δ0 ENT5 (CHERRY HIS3)</i>	Insertion <i>CHERRY/3' ENT5</i> dans la souche By4741
yVD301	<i>Mat a his3Δ1 ura3Δ0 lsb3 (GFP KANMX6) ENT3 (CHERRY His3)</i>	Spore issue du croisement de yVD141 avec yVD236
yVD302	<i>Mat α his3Δ1 ura3Δ0 lsb3 (GFP KANMX6) ENT5 (CHERRY HIS3)</i>	Spore issue du croisement de yVD141 avec yVD247
yVD320	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb3::KANMX6 ENT3 (GFP HIS3)</i>	Spore issue du croisement de lsb3Δ avec yVD233
yVD324	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb4::KANMX6 ENT3 (GFP HIS3)</i>	Spore issue du croisement de lsb4Δ avec yVD233
yVD328	<i>Mat α his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb3::KANMX6 ENT5 (CHERRY HIS3)</i>	Spore issue du croisement de lsb3Δ avec yVD247
yVD331	<i>Mat a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lsb4::KANMX6 ENT5 (CHERRY HIS3)</i>	Spore issue du croisement de lsb4Δ avec yVD247
yVD335	<i>Mat a his3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 lsb3 : (MYC KANMX6) LAS17 (GFP HIS3)</i>	Spore issue du croisement de yVD209 avec DDY 2736

**Tableau 7 : Souches utilisées et géotype.**

## **B. Conditions et milieux de croissance, conservation des cellules.**

La culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae* se fait soit en milieu liquide soit sur milieu solide. La température optimale de croissance des levures est de 30°C.

### **Milieu Complet YPD :**

extrait de levure : 10g/L ; Bactopeptone : 10g/L ; Glucose : 20g/L

De la Généticine (G418) peut être ajoutée au milieu YPD (150 mg/ml), après l'autoclavage, afin de permettre la sélection des levures possédant le gène de résistance. La généticine est toxique pour les cellules ne possédant pas le gène de résistance.

### **Milieu SC (synthetic complete) :**

Yeast nitrogen base avec  $\text{NH}_4^+$  : 6.7g/L ; Glucose : 20g/L

Un complément en acides aminés est additionné aux milieux dont la composition dépend des auxotrophies de la souche ainsi que des plasmides à maintenir.

Ces milieux sont stérilisés par autoclave à 110 °C sous une pression de 1,2 bar pendant 20 minutes. De l'Agar (20g/L) est ajouté, avant l'autoclave, pour obtenir du milieu solide. Pour les cultures en milieu liquide une unité d'absorbance à la longueur d'onde de 600 nm correspond approximativement à  $3 \cdot 10^7$  cellules.

Les cellules sont conservées dans du milieu glycérolé (25 %) à – 80°C.

## **C. Transformation d'ADN chez la levure.**

Afin de permettre l'expression de certaines protéines chez la levure ou de procéder à des insertions, délétions ou remplacement) il faut introduire de l'ADN plasmidique ou des fragments d'ADN linéaires dans les levures. Pour cela nous utilisons deux méthodes.

### **1. Traitement à l'acétate de lithium.**

La souche de levure à transformer est cultivée dans du YPD à 30°C. Lorsque une  $DO_{600}$  de 0.5 est atteinte, les cellules sont sédimentées par centrifugation, le culot est lavé plusieurs fois avec de l'eau puis resuspendu dans de l'eau (100  $\mu$ L d'eau pour 20 ml de culture à 0.5 de DO). Pour la transformation, 50  $\mu$ L de cellules sont mélangées à de l'ADN de sperme de saumon (200 ng/ $\mu$ L final) et l'ADN transformant (20 ng/ $\mu$ L final). L'ensemble est vortexé puis le mix de transformation PEG-Li (PEG : 30% final ; LiAc (88 mM final) est ajouté. La suspension cellulaire est incubée 40 minutes à 42°C. Les cellules sont ensuite lavées avec de l'eau et étalées sur un milieu sélectif adéquat. Dans le cas où les levures doivent subir une recombinaison homologe à partir de fragment de PCR ou de plasmide linéarisé (insertion, délétion, remplacement), les levures sont resuspendues dans 500  $\mu$ L de YPD et placées à régénérer au moins une heure à 30°C avant d'être étalées sur boîtes. Les transformants sont visibles après 2 - 3 jours d'incubation à 30°C.

### **2. Electroporation.**

La veille au soir les levures sont striées sur boîtes. Au matin les levures sont récupérées (environ 20 $\mu$ l) sur la boîte et placées dans un tube. Elles sont lavées 2 fois avec 1 ml de Sorbitol 1M, Hepes 20 mM pH 7.5 puis resuspendues dans 40  $\mu$ L de la même solution. A ces 40  $\mu$ L sont ajoutés 1 $\mu$ g d'ADN (dans un volume maximum de 5 $\mu$ L) et la solution est transférée dans une cuve d'électroporation préalablement placée dans la glace. La transformation est réalisée à l'aide d'un appareil d'électroporation " Gene pulser II " (BioRad) avec un voltage de 1,6 kV, une résistance de 200 Ohms et une capacité de 25  $\mu$ F. Immédiatement après la transformation, 1 ml de YPD est ajouté et les cellules sont placées à 30°C pendant 1h. Elles sont ensuite lavées et resuspendues dans 100  $\mu$ L de Sorbitol 1M, Hepes 20 mM pH 7.5 avant d'être étalées sur milieu de sélection.

## **D. Préparation d'ADN à partir des cellules de levures.**

Un volume de 5 ml d'YPD est inoculé avec la souche de levure d'intérêt. Les cellules sont cultivées à 30°C jusqu'à saturation (une nuit) puis sédimentées par centrifugation (2 000 g, 5 min). Le culot est resuspendu dans 500 µL 1M Sorbitol, 0.1 M EDTA (pH 7.5). Après ajout 20 µL de solution de zymolase 100,000 U (2.5 mg/ml) les cellules sont incubées à 37°C pendant 1 heure. Elles sont ensuite sédimentées par centrifugation (2 500 g, 1 min) et resuspendues dans 500 µL de Tris-HCl 50mM (pH 7.4), 20mM EDTA. 50 µl de SDS 10% sont ajoutés et les cellules sont incubées 30 min à 65°C. Au bout de 30 min, 200 µL de Potassium Acétate 5M sont ajoutés et les cellules sont placées à 4°C durant 1 heure. Après centrifugation (13 000 g, 5 min) le surnageant contenant l'ADN présent dans le surnageant est précipité avec 1 volume d'isopropanol 100 % (5 min, T° ambiante). Après une brève centrifugation (10 s), le culot d'ADN est séché à l'air libre puis repris dans 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4 ; EDTA 1 mM).

## **E. Techniques génétiques.**

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire se multipliant végétativement par bourgeonnement à l'état haploïde ou diploïde. Le passage de l'état haploïde à l'état diploïde se fait par conjugaison entre deux cellules de signe opposé (*MATa* et *MATα*). Le passage inverse se fait par sporulation, méiose d'une cellule diploïde aboutissant à la formation d'un asque contenant 4 spores haploïdes : 2 *MATa* et 2 *MATα*.

### **1. Conjugaison.**

Deux cellules haploïdes de signe opposé arrêtent leur cycle cellulaire en G1 en réponse aux phéromones et forment une protubérance (« shmoo ») vers leur partenaire pour fusionner. Le zygote ainsi formé commence aussitôt à bourgeonner. Pour obtenir une efficacité maximale de croisement, les cellules de signe *a* et *α* sont striées séparément sur milieu riche et incubées à 30°C pendant une nuit. Le lendemain matin les cellules sont mélangées sur le même milieu et incubées à 30°C. Après conjugaison, les diploïdes sont sélectionnés sur un milieu de sélection adéquat (contre-sélection des souches haploïdes). Dans les cas où les marqueurs de sélection ne peuvent être présents sur la même boîte (Résistance à la généticine et une prototrophie), le mélange du croisement est étalé sur un milieu minimum adéquat permettant la croissance des cellules diploïdes et d'un type de cellules parentales haploïdes

(contre-sélection d'une des souches haploïdes), le lendemain les clones de grosses tailles (ayant le plus de chance d'être diploïdes) sont striés sur le second milieu de sélection ne permettant que la croissance des cellules diploïdes (contre-sélection de la seconde souche haploïde).

## **2. Sporulation.**

La sporulation est induite en carençant les cellules en sources azotées et carbonées. Les cellules sont mises à pousser sur milieu riche pendant 1 nuit puis repiquées sur du milieu de sporulation (acétate de potassium 10 % ; agarose 1 %) et incubées à 25 °C pendant 1 semaine. L'apparition des ascospores est suivie au microscope.

## **3. Dissection des tétrades.**

La paroi des asques est digérée par de la zymolyase (1 mg/ml) pendant 10 min à température ambiante. La suspension cellulaire est étalée sur boîte YPD et les 4 spores de chaque tétrade sont séparées et déposées à des intervalles réguliers sur la surface de l'Agar à l'aide de l'aiguille fine d'un micromanipulateur (Singer). Les colonies issues de spores individuelles sont visibles après deux jours d'incubation à 30°C.



### III. Manipulations de l'ADN.

#### A Oligonucléotides.

Oligonucleotides pour expression bactérienne	
GATTACAGTCGACCCATGGGTATTAACAATCCTATTCCAAGGAGTTTAAAGAGT GAGACAAAAAAGCAGCGAAGATTTTGG	Forward <i>LSB3</i> dans pGEX4T1 (Sall)
GATACGTCGACCAATGGGTATCAATAATCCAATTCCTCGAAGCTTGAAAAGCGA GACCAAGAAGGCCGCGAA	Forward <i>YSC84</i> dans pGEX4T1 (Sall)
CGAGCGGCCGCTTAACTAGTTCAACGTAATTTG	Reverse <i>LSB3</i> dans pGEX4T1 (NotI)
CTGGAATTCATTAAGAACTCTAACGTAG	Reverse <i>YSC84</i> dans pGEX2TK (EcoRI)
GATACGTCGACCAATGGCAGGTGCTGGTGC	Forward <i>YAB LSB3</i> et <i>YSC84</i> dans pGEX4T1 (Sall)
GATACGCGGCCGCGCTAGTAATTAACGCCCTGGAC	Reverse <i>YAB LSB3</i> dans pGEX4T1 (NotI)
GATACGCGGCCGCGCTAAAAGTTGAACGCTCTTGATT	Reverse <i>YAB YSC84</i> dans pGEX4T1 (NotI)
ATCCAGGTCGACTATGGGTATTAACAATCCTAT	Forward <i>SH3 LSB3</i> dans pGEX2TK (SalI)
CTGTTGGATCCATGGGTATCAATAATCCAAT	Forward <i>SH3 YSC84</i> dans pGEX2TK (BamHI)
GGATCCATGAGTTTAGAGGATACATTA	Forward <i>ENT3</i> dans pGEX4T3 (BamHI)
GATAAGGGATCCGACTCATTATCAAAAAAGATTC	Forward <i>ENT5</i> dans pGEX4T1 (BamHI)
GTCGACAAAGGAAAGTAAATCGATTTCC	Reverse <i>ENT3</i> dans pGEX4T3 (Sall)
AGAATTCTCGAGTTAGACCAACGACTTGGA	Reverse <i>ENT5</i> dans pGEX4T1 (XhoI)
GCATAGCTCGAGTTAAAGTTCTCCCTTTTCTTAAT	Reverse <i>ENTH ENT5</i> dans pGEX4T1 (XhoI)
GAGGCTGGATCCATCTTGCAATACTTGAAGACTCACAA	Forward <i>ENT5ΔENTH</i> dans pGEX4T1 (BamHI)
Oligonucleotide pour modification au génome de levure	
GGTGGCAAAGAAATCAAAAACAAAAGCTGTATCACACGCACGGATCCCCGGGT TAATTA	F1 <i>LSB3</i>
TTTTCAAGAGTAGTGGTAATATCAAATCCAAAATCCAAAACGGATCCCCGGGT ATTA	F1 <i>YSC84</i>
CAATAACGTTTTCTCGTATTCTTTACTCTCCTTCAAATTTGAATTCGAGCTCGTT AAAC	R1 <i>LSB3</i>
AATTCTATATATAGGAACGAGACATATGGAGGACGATAATGAATTCGAGCTCGTT TAAAC	R1 <i>YSC84</i>
TTATAAACACATTTACATATTGTGTAACCAATAATATCACGAATTCGAGCTCGTT AAAC	R1 <i>ENT3</i>
CTGTATTGAATGATTGGGAGATGAAGGGGTATTTGGTGAGAATTCGAGCTCGT TTAAAC	R1 <i>ENT5</i>
GAGTCAACGGTAGAGAAGGTATATCCAGCAAATTACGTTGAAGTACTGTTCCGGA TCCCCGGGTAAATTA	F2 <i>LSB3</i>
GGACTAACGGAAAAGAAGGAATATCCCTGCAAACACGTTAGAGTTTCTCGGA TCCCCGGGTAAATTA	F2 <i>YSC84</i>
TAACCATACATCATCCAAAGAAATCGATTTACTTTCTTTCCGATCCCCGGGT ATTA	F2 <i>ENT3</i>
TGCATTTCCGACTTATTCTTACTCCAAGTCGTTGGTCCGGATCCCCGGGT ATTA	F2 <i>ENT5</i>
TACTTTGTCTCACTCTTAAACTCCTTGAATAGGATTGTTAATACCCATCATT GAGATCCGGGTTTT	R2 <i>LSB3</i>
TACTTGGTCTCGCTTTTCAAGCTTCGAGGAATTGGATTATTGATACCCATCATT TGAGATCCGGGTTTT	R2 <i>YSC84</i>
TTGTTCTTTAGTAGCAGCACCCTGTTGCTCGCCGACTCGCCGCATCTGAAT TCGAGCTCGTTAAAC	F4 <i>LSB3</i>
CGACGCTGACCGAAAACGACCTGAAGGGAATTAAGTTGACTACCCCTAGAAT TCGAGCTCGTTAAAC	F4 <i>YSC84</i>
TACTTTGTCTCACTCTTAAACTCCTTGAATAGGATTGTTAATACCCATTTGTA TAGTTCATCCATGC	R5 <i>LSB3</i>
TACTTGGTCTCGCTTTTCAAGCTTCGAGGAATTGGATTATTGATACCCATTTGT ATAGTTCATCCATGC	R5 <i>YSC84</i>
TACTTTGTCTCACTCTTAAACTCCTTGAATAGGATTGTTAATACCCATGTACA GCTCGTCCATGCCGC	R5C <i>LSB3</i>
TACTTGGTCTCGCTTTTCAAGCTTCGAGGAATTGGATTATTGATACCCATGTACA GCTCGTCCATGCCGC	R5C <i>YSC84</i>

**Tableau 8 : Oligonucléotides.**

- Les oligonucléotides F1 et R1 permettent de déléter le gène d'intérêt.
- Les oligonucléotides F2 et R1 permettent l'ajout d'étiquettes à l'extrémité C-terminale.
- Les oligonucléotides F4 et R2 permettent l'ajout d'un promoteur *GAL* en amont du gène d'intérêt.
- Les oligonucléotides F4 et R5 permettent l'ajout d'un promoteur *GAL* et du gène codant pour la GFP en amont du gène d'intérêt.
- Les oligonucléotides F4 et R5C permettent l'ajout d'un promoteur *GAL* du gène codant pour Cherry e, en amont du gène d'intérêt.

## B. Plasmides.

### 1. Plasmides spécifiques à *E. coli*.

Tous les plasmides utilisés portent le gène de résistance à l'ampicilline.

Plasmide	Background	Etiquette/position	Insert	Enzymes
pGST-SH3 Lsb3	pGEX2TK	<i>GST/5'</i>	<i>SH3-LSB3</i>	<i>Sall-NotI</i>
pGST-SH3 Lsb4	pGEX2TK	<i>GST/5'</i>	<i>SH3-LSB4</i>	<i>BamHI-NotI</i>
pVD17	pGEX4-T1	<i>GST/5'</i>	<i>LSB4</i>	<i>Sall-NotI</i>
pVD18	pGEX4-T1	<i>GST/5'</i>	<i>YAB-LSB3</i>	<i>Sall-NotI</i>
pVD19	pGEX4-T1	<i>GST/5'</i>	<i>YAB-LSB4</i>	<i>Sall-NotI</i>
pVD20	pGEX4-T1	<i>GST/5'</i>	<i>LSB3</i>	<i>Sall-NotI</i>
pFL594	pGEX4-T3	<i>GST/5'</i>	<i>ENT3</i>	<i>BamHI-Sall</i>
pFL638	pGEX4-T1	<i>GST/5'</i>	<i>ENT5</i>	<i>BamHI-XhoI</i>
pFL6	pGEX4-T3	<i>GST/5'</i>	<i>ENTH-ENT5</i>	<i>Sall-NotI</i>
pFL7	pGEX4-T3	<i>GST/5'</i>	<i>ENT5ΔENTH</i>	<i>Sall-NotI</i>
pGEX4-T1		<i>GST</i>		

Tableau 9 : Plasmides spécifiques à *E.coli*.

## 2. Plasmides d'expression dans *S. cerevisiae*.

Ces plasmides possèdent une origine de répllication bactérienne et une origine de répllication de levure (centromérique ou 2 $\mu$ ).

Plasmide	Background	Origine de répllication	Marqueur	Insert	Source
pG045	pRS426	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GFP-CPS-1</i>	Odorizzi et al, 1998
pG089	pRS426	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GFP-DPAPB</i>	Odorizzi et al, 1998
pGFP-Vam3	pRS426	2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>GFP-VAM3</i>	Darsow et al, 1998
pGFP-Phm5	pRS416	CEN	<i>URA3</i>	<i>GFP-PHM5</i>	Reggiori et Pelham, 2001
pGFP-Sna3	pRS416	CEN	<i>URA3</i>	<i>GFP-SNA3</i>	Reggiori et Pelham, 2001
pFL38		2 $\mu$	<i>URA3</i>	<i>FUR4-GFP</i>	Galan et al, 1996

Tableau 10 : Plasmide d'expression chez *S.cerevisiae*.

## 3. Plasmides utilisés pour la construction de levure.

Plasmide	Modification levure	Marqueur	Source
pfa6 KANMX6	Délétion	<i>KAN</i>	Longtine et al, 1998
pFA6-HIS5(pombe)	Délétion	<i>HIS5</i>	Longtine et al, 1998
pFA6-GFP-KANMX6	GFP/3'	<i>KAN</i>	Longtine et al, 1998
pFA6-GFP-HIS5(pombe)	GFP/3'	<i>HIS5</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-13Myc-KANMX6	Myc/3'	<i>KAN</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-13Myc-HIS3MX6	Myc/3'	<i>HIS5</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-3HA-KANMX6	HA/3'	<i>KAN</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-3HA-HIS3MX6	HA/3'	<i>HIS5</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-KANMX6-PGAL1-GFP	pGAL-GFP/5'	<i>KAN</i>	Longtine et al, 1998
pFA6a-HIS3MX6-PGAL1-GFP	pGAL-GFP/5'	<i>HIS5</i>	Longtine et al, 1998
pFA6-Cherry-KAN MX6	Cherry/3'	<i>KAN</i>	Cette étude
pFA6-Cherry-HIS5(pombe)	Cherry/3'	<i>HIS5</i>	Cette étude
pFA6a-KANMX6-PGAL1-Cherry	Cherry-GFP/5'	<i>KAN</i>	Cette étude
pFA6a-HIS3MX6-PGAL1-Cherry	Cherry-GFP/5'	<i>HIS5</i>	Cette étude

Tableau 11 : Plasmides utilisés pour les constructions chez la levure.

#### **4. Plasmides permettant d'ajouter l'étiquette Cherry aux protéines de levure.**

Les plasmides pFA6a-kanMX6-PGAL1-Cherry, pFA6a-kanMX6-PGAL1-Cherry, pFA6-Cherry-HIS5 et pFA6-Cherry-Kan MX6 ont été obtenus à partir des plasmides de Longtine et al par remplacement de la cassette *GFP* par la cassette *CHERRY* dérivée du gène codant pour la protéine mRFP de *Discosoma. Sp* (Shaner *et al.*, 2004). Ce travail a été réalisé par Dimitri Dolosor, stagiaire au laboratoire.

#### **C. Détermination de la concentration en ADN.**

La concentration d'une solution d'ADN est mesurée par spectrophotométrie à l'aide du BioPhotometer (Eppendorf). L'absorption est lue à 260 nm. Pour un trajet optique de 1 cm, une unité d'absorbance correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. Le rapport entre l'absorbance à 280 nm et à 260 nm permet d'estimer la pureté de la solution.

#### **D. Clonage des gènes.**

##### **1. Amplification enzymatique de l'ADN par PCR.**

Lors d'une PCR (Polymérase Chain Reaction) l'ADN à amplifier (100 ng) est dénaturé à 95°C pendant 5 min avant amplification en présence des amorces spécifiques sens et antisens (50 pmol), de dNTPs (0,25 mM), d'ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq polymérase, 2 U/ml) et de son tampon. Le volume réactionnel final est de 50 µL. Un cycle de PCR est constitué d'une dénaturation de l'ADN (30 s, 95°C), d'une hybridation des amorces (30 s, selon la T° de fusion des amorces) et d'une élongation (temps variable selon la taille du fragment à amplifier, 72°C). L'amplification est réalisée pendant 30 cycles. Un dixième de la réaction est déposé sur gel d'agarose afin de vérifier l'efficacité et la spécificité de l'amplification. Pour un clonage nécessitant qu'il n'y ait pas d'erreur, la High expand fidelity Polymerase peut remplacer la Taq polymerase car elle corrige les erreurs par son activité 3'-5' exonuclease.

## **2. Séparation électrophorétique des fragments d'ADN.**

Les acides nucléiques sont séparés sur gel d'agarose. L'agarose est dissout dans du tampon TAE qui sert aussi de tampon de migration. L'électrophorèse se fait à 100 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel repéré par le bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge. Le gel est ensuite incubé pendant 5-10 minutes dans un bain de TAE additionné de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN, permettant de visualiser les bandes d'acides nucléiques sous lumière UV. Le poids moléculaire d'un fragment d'ADN peut être évalué par comparaison à une échelle, constituée de fragment d'ADN de poids moléculaires connus, migrant sur le même gel.

**Tampon TAE :** Tris-base 0,2 M ; acide acétique 0,2 M ; EDTA 5 mM pH 8

**Tampon de charge (5 X) :** Saccharose 25 g ; EDTA 0,5 M pH 8 10 µL ; 1 pointe de spatule de bleu de bromophénol ; qsp 50 ml d'eau distillée

## **3. Purification des fragments d'ADN et digestion par les enzymes de restriction.**

La bande correspondant à l'échantillon d'ADN peut être purifiée à partir du gel d'agarose en suivant le protocole du kit de gel extraction (Qiagen).

Les enzymes de restriction permettent de générer des coupures double-brin au niveau de sites spécifiques de l'ADN. Les extrémités 5' et 3' résultantes de la digestion par les enzymes de restriction durant 2h à 37°C sont utilisées pour cloner des fragments d'ADN. Chaque enzyme est utilisée dans des tampons et des conditions qui lui sont spécifiques et qui sont indiqués par le fournisseur.

## **4. Déphosphorylation et ligation.**

Le vecteur dans lequel va être inséré le fragment est également digéré par les enzymes de restriction. Il est ensuite déphosphorylé grâce à la CIP (Calf Intestinal Phosphatase) dans son tampon durant 30 minutes à 37°C puis purifié en suivant le protocole de DNA purification (Qiagen).

La ligation entre les inserts et les plasmides digérés et déphosphorylés est réalisée par la T4 DNA ligase durant une nuit à température ambiante.

## **E. Séquençage de l'ADN.**

L'ADN est séquencé à la plate-forme génomique de l'institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) de Strasbourg.

## **IV. Manipulation de protéines.**

### **A. Préparation d'extrait protéiques bruts.**

#### **1. Extrait protéique de Bactéries.**

Les bactéries sont placées durant la nuit à 37°C. Au matin, elles sont diluées à une DO de 0.1. Lorsque la DO atteint 0.6 la surproduction de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG (0,1 – 1 mM final). Les bactéries sont alors placées à 30°C durant 2 – 4 h. Les bactéries issues d'une culture de 50 ml sont sédimentées par centrifugation, lavées puis resuspendues dans 2 ml de PBS contenant des inhibiteurs de protéases et du PMSF 1mM. Les cellules sont ensuite lysées en réalisant des sonications (cycle de 10s de sonication suivi de 10s dans la glace ; le tout durant 5 minutes). Chaque extrait est ensuite centrifugé (13 000 g, 15 min, 4°C), le surnageant est récupéré et sa concentration en protéines mesuré selon la méthode de Bradford.

#### **2. Extrait protéique de Levures.**

Les levures provenant d'une culture de 300 ml ( $Abs_{600nm} = 0,3 - 0,5$ ) sont sédimentées par centrifugation (2000 g, 10 min) et lavées avec 10 ml de tampon MS. Le culot est alors repris dans 1ml de tampon MS est placé dans un tube de 2ml. Des billes de verre (0,4 mm de diamètre) sont ajoutées et la suspension est fortement agitée à l'aide d'un appareil Fastprep pendant 30 secondes puis refroidie cinq minutes dans la glace. Cette agitation est répétée 5 fois. Après centrifugation (15 000 g, 15 min, 4°C), le surnageant est récupéré et sa concentration en protéines mesuré selon la méthode de Bradford.

**Tampon MS :** PBS, 100mM KCl, 50 mM Sucrose, 5mM EDTA et inhibiteurs de protéases.

#### **3. Quantification de la concentration protéique.**

La concentration en protéine des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode utilise la propriété du bleu de Coomassie à se fixer non spécifiquement sur les acides aminés nucléophiles, le complexe colorant-protéine formé montre un maximum d'absorption à 595 nm. Du colorant de Bradford (BioRad) (800 µl H<sub>2</sub>O + 200 µl de Bradford) est donc ajouté à 1 µL d'extrait et la concentration est lue sur le BioPhotometer, Eppendorf qui a été calibré en fonction d'une gamme étalon établie avec de la BSA.

## **B. Purification de protéines.**

### **1. Billes GST (GST pull-down).**

Les protéines fusionnées à la GST ont été purifiées avec des billes glutathione Sepharose (GE Healthcare). 50 µL de billes sont équilibrées dans du PBS + inhibiteur de protéases avant d'être incubées avec 5 ml d'extrait protéique bactérien durant 2h (ou la nuit) à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 6 fois avec 2 ml de PBS. Les protéines fixées sur les billes peuvent être éluées avec 40 µL de tampon Laemmli ou servir d'appât pour de nouvelles protéines dans le cas d'une expérience de GST pull-down.

Dans ce dernier cas, les billes ayant fixé des protéines étiquetées GST sont incubées pour la nuit avec 1 ml d'un extrait protéique de levure. Le lendemain les billes sont lavées 6 fois avec 2 ml de PBS et les protéines fixées sont éluées avec 40 µL de tampon Laemmli.

**Tampon Laemmli 3x** : Tris-HCl 175 mM pH 6.8 ; SDS 5% ; β-mercaptoéthanol 2.5% ; Glycérol 25% ; bleu de bromophénol 0.006% (p/v)

### **2. Anticorps (immunoprécipitation).**

Les billes Gamma Bind Sepharose (Pharmacia) sont équilibrées dans du tampon de fixation avant d'être incubées avec 4µg d'anticorps de lapin anti-Myc, anti-Cpy ou anti-Gap1, suivant les cas, pendant deux heures à 4°C. Après un lavage des billes avec du tampon de fixation, l'extrait protéique exprimant les protéines d'intérêt est déposé sur les billes. Les billes sont alors incubées pour la nuit à 4°C. Au matin elles sont lavées 6 fois avec 2 ml de PBS et les protéines fixées sont éluées avec 40 µL de tampon Laemmli.

**Tampon de fixation** : Hepes KOH pH6.8 ; Acétate de potassium 0.15 M ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; Sorbitol 0.25 M.

### **C. Séparation électrophorétique des protéines.**

Les protéines peuvent être séparées sur gel dénaturant de polyacrylamide (en présence de SDS) par migration dans un champ électrique. Le gel comprend 2 parties. La partie supérieure (gel de concentration) permet la concentration des protéines et une résolution plus fine des bandes. La partie inférieure (gel de séparation) permet la séparation des protéines en fonction de leur taille. L'échantillon protéique à analyser est dénaturé 5 min à 95°C dans le tampon de charge puis déposé dans les puits. L'électrophorèse se fait dans le tampon de migration à 100 – 150 V. Le poids moléculaire d'une protéine peut être évalué par comparaison à une échelle, constituée de protéines de poids moléculaires connus, migrant sur le même gel.

**Gel de séparation 8 – 12 %** : Acrylamide/ bisacrylamide 8 – 12 % ; Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1 % ; persulfate d'ammonium 0,1 % ; TEMED 0,1 %.

**Gel de concentration 5 %** : Acrylamide/ bisacrylamide 5 % ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% ; persulfate d'ammonium 0,1 % ; TEMED 0,1 %.

**Tampon de charge 1X** : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; glycérol 10 % ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 % ; bleu de bromophénol 0,1 %

**Tampon de migration** : Tris-HCl 20 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 1 g/L

### **D. Coloration des protéines dans un gel de polyacrilamide-SDS.**

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. Le gel est incubé à température ambiante, sous agitation, pendant 1 heure dans une solution de coloration. Il est ensuite baigné dans une solution de décoloration (plusieurs fois renouvelée) jusqu'à ce que les bandes soient bien visibles. La limite de détection de cette méthode de coloration est d'environ 0,4  $\mu$ g de protéines.

**Solution de coloration** : Ethanol 45 % ; acide acétique 10 % ; Coomassie Blue R250 0,25 %

**Solution de décoloration** : Ethanol 45 % ; acide acétique 0,7 %

## **E. Western blot.**

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE peuvent également être transférées sur une membrane de nitrocellulose Protan BA85 (Amersham). Le transfert s'effectue pendant 1 h à 4°C à une intensité de 100 V avec le système BioRad. Suite au transfert la présence des protéines sur la membrane peut être vérifiée par une coloration réversible au rouge Ponceau.

La membrane est ensuite saturée avec du tampon de blocage pendant 1 h à T° ambiante. La membrane est alors incubée 1 h à T° ambiante ou une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage. Après 3 lavages dans du PBS-Tween 0.2%, elle est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-Tween. Ce second anticorps est couplé à la Horse Radish Peroxidase (GE Healthcare). Après le second anticorps la membrane est lavée avec du PBS-Tween. La révélation se fait par chimiofluorescence en utilisant le kit de détection ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia) et en exposant sur la membrane un film autoradiographique.

**Tampon de transfert** : Tris-HCl 25 mM ; glycine 190 mM ; SDS 0,1 % ; éthanol 20 %  
pH8,3

**Tampon de blocage** : TBS-T ; lait écrémé en poudre 5 %

## F. Anticorps.

J'ai utilisé plusieurs anticorps différents au cours de ma thèse. Ces anticorps sont dilués dans PBS-Tween 0.2% additionné de lait afin de diminuer les fixations aspécifiques des anticorps sur la membrane de nitrocellulose. Les anticorps de souris et de rats sont des monoclonaux tandis que les anticorps de lapin sont polyclonaux.

Anticorps primaire	Origine	Dilution ou concentration	Provenance
Anti-HA	Souris	1/1000	Roche Diagnostics
Anti-HA	Rat	1/1000	Roche Diagnostics
Anti-Myc	Souris	4µl/ml	Novartis
Anti-GST	Souris	1/1000	Sigma
Anti-GFP	Souris	1/1000	Roche Diagnostics
Anti-Ent5	Lapin	1/500	S.Friant
Anti-Ent3	Lapin	1/2000	S.Friant
Anti-Pgk1	Souris	1/500	Molecular Probes
Anti-CPY	Lapin	3µl/ml	H Riezman
Anti-Gas1	Lapin	3µl/ml	H Riezman

**Tableau 12 : Anticorps.**

Les anticorps secondaires (GE Healthcare), couplés à la Horse Radish Peroxydase, sont dilués au 1/10 000 dans du tampon PBS-Tween 0.2% et sont révélés par chimioluminescence ECL (Amersham).



## **V. Méthodes cytologiques appliquées à la levure.**

### **A. Test de sensibilité à la latrunculine A (LatA).**

Les solutions de Latrunculine A 0.5 mM, 1mM et 2 mM ont été préparées par dilution à partir d'un stock (20 mM dans du DMSO). Les cellules de levures en phase exponentielle de croissance sont mélangées avec de l'Agar mou et le Mix résultant est coulé sur milieu YPD. Lorsque le Mix est solidifié, des disques de papier filtre stériles sont déposés sur les boîtes. 10µL de latrunculine A aux différentes concentrations est alors déposée sur les disques. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C et scannées après 48h de temps d'incubation.

### **B. Fixation des cellules.**

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont fixées et perméabilisées dans le milieu de culture par ajout de formaldéhyde (3,7 % final) et de Triton X-100 (0,04 % final). Elles sont ensuite incubées sous agitation pendant 30 min à la T° de croissance. Après centrifugation (1500 g, 2 min), elles sont resuspendues avec 1 ml de tampon de fixation puis incubées 2 h à T° ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS.

Les cellules ainsi fixées peuvent être conservées pendant quelques jours à 4°C.

**Tampon de fixation** : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 35 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM ; 4 % formaldéhyde ; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM.

### **C. Marquage par des colorants.**

#### **1. Phalloïdine couplée au TRITC.**

La phalloïdine a la propriété de se fixer spécifiquement sur les polymères d'actine. Cette toxine couplée à un fluorochrome permet la visualisation du cytosquelette d'actine dans les cellules. Les cellules fixées sont centrifugées et resuspendues dans 15 µL de PBS contenant 1 µM de phalloïdine-TRITC (Sigma). Après 90 min d'incubation à T° ambiante dans l'obscurité, les cellules sont lavées avec du PBS, montées entre lame et lamelle et observées au microscope à fluorescence avec le filtre TRITC.

## **2. Calcofluor White.**

Ce colorant (Fluorescent Brightener 28, Sigma) se lie spécifiquement à la chitine qui est un composant de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae*. Il est utilisé pour visualiser les anneaux de chitine laissés sur la paroi cellulaire de la cellule mère après séparation du bourgeon. Les cellules fixées sont resuspendues dans 100 µl de PBS contenant 200 µg/ml de Calcofluor White et incubées 5 min à l'abri de la lumière. Après 5 lavages dans du PBS, elles sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope à fluorescence avec le filtre DAPI.

## **D. Microscopie.**

L'observation des cellules se fait avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioVert200. L'objectif 100 X est utilisé ainsi que différents filtres en fonction de la fluorescence observée : GFP, DAPI, TRITC et DIC. Les prises de vues sont réalisées avec une caméra Hammamatsu CoolSnap HSQ2 pilotée par le logiciel du microscope.

## **VI. Trafic intracellulaire.**

### **A. Cargo sous promoteurs constitutifs.**

Des souches de levures délétées pour un ou des gènes d'intérêt ont été transformées avec les plasmides codant pour les protéines cargos (GFP-Cps1, GFP, Sna3, GFP, Phm5, GFP-DPAP-B ou GFP-Vam3). Les cellules sont inoculées dans du SC-URA le matin et sont diluées le soir de façon à obtenir une DO de 0.2 - 0.3 le lendemain matin. Lorsque cette DO de 0.2-0.3 est atteinte, 1 ml de culture est centrifugées (2000g, 2 minutes). Le culot est resuspendu dans 300  $\mu$ L de YPD contenant environ 2.5  $\mu$ M de FM4-64. Les cellules sont replacées 30 minutes à 30°C puis elles sont lavées avec du PBS et resuspendues dans 15  $\mu$ L avant d'être observées au microscope.

### **B. Induction et endocytose de Fur4.**

Les souches transformées par le plasmide portant le gène FUR4 sous contrôle du promoteur inductible *GAL1* sont cultivées en milieu SC-URA glycerol (2%) pendant une nuit. Le lendemain les levures sont diluées à DO=0.5 et, en fin de matinée, du galactose est ajouté au milieu (concentration finale : 2%). Après 2h d'induction, du glucose est ajouté au milieu (2% final) afin d'arrêter la production de Fur4-GFP. Les levures sont encore placées à 30°C durant 30 minutes puis l'internalisation par endocytose est déclenchée avec l'ajout de Cycloheximide (10 $\mu$ g/ $\mu$ L). A partir de ce temps, 0 1 ml de culture est prélevé à différents temps (30, 60, 120 min) et observé au microscope après lavage et resuspension dans du PBS.

### **C. Pulse-Chase.**

Le premier jour, des pré-cultures sont lancées dans du YPD et placées à 30°C. Le soir ces cultures sont diluées afin d'obtenir le lendemain matin une DO de 0.5. Lorsque la DO atteint une valeur comprise entre 0.5 et 0.75, 4.5 unités de DO sont récupérées dans des falcons 15. Ces levures sont ensuite centrifugées (10 min 5000 rpm) et lavées deux fois avec du milieu " DropOut–Met–Cys ". Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1,6 ml de milieu –Met–Cys et incubées 15 minutes à 30°C.

Après cette pré-incubation le Pulse est déclenché avec 540 µCi de Pro-Mix <sup>35</sup>S-Met/Cys par souche. Les cellules sont laissées à 30°C durant 10 minutes puis la chasse est déclenchée avec l'ajout de 17µL de Chase cocktail. A différents temps (0, 10 et 30 minutes) 500 µl de cellules sont récupérés et déposés dans des tubes eppendorf placés dans la glace et contenant 5µl de NaF 1M + 5µl de NaN3 1M.

Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à 4°C et 10000g et des extraits protéiques sont préparés en utilisant un vortex. A partir des extraits protéiques, des immunoprécipitation sur la nuit sont réalisées de manière séquentielle avec les anticorps anti-Cps1 et anti-Gas1. Les billes sont resuspendues dans du tampon Laemmli et chargées sur des gels acrylamide 10% qui après migration sont séchés et exposés dans une cassette autoradiographique puis analysés avec un PhosphorImager (Fuji, Bas2000).

**Chase medium** : Pour 1ml

200 µl 50x Met + Cys

500 µl 8% Yeast extract with a.a

300 µl Glucose 60%

## Bibliographie

- Adams, A. E., and J. R. Pringle, 1984, Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 98, p. 934-45.
- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, M. M. Kessels, and B. Qualmann, 2007, Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology: *Cell*, v. 131, p. 337-50.
- Amberg, D. C., J. E. Zahner, J. W. Mulholland, J. R. Pringle, and D. Botstein, 1997, Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites: *Mol Biol Cell*, v. 8, p. 729-53.
- Anderson, B. L., I. Boldogh, M. Evangelista, C. Boone, L. A. Greene, and L. A. Pon, 1998, The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization: *J Cell Biol*, v. 141, p. 1357-70.
- Asao, H., Y. Sasaki, T. Arita, N. Tanaka, K. Endo, H. Kasai, T. Takeshita, Y. Endo, T. Fujita, and K. Sugamura, 1997, Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth: *J Biol Chem*, v. 272, p. 32785-91.
- Ayscough, K., 1998c, Use of latrunculin-A, an actin monomer-binding drug: *Methods Enzymol*, v. 298, p. 18-25.
- Ayscough, K. R., 1998a, In vivo functions of actin-binding proteins: *Curr Opin Cell Biol*, v. 10, p. 102-11.
- Ayscough, K. R., J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews, and D. G. Drubin, 1997, High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A: *J Cell Biol*, v. 137, p. 399-416.
- Azmi, I., B. Davies, C. Dimaano, J. Payne, D. Eckert, M. Babst, and D. J. Katzmann, 2006, Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1: *J Cell Biol*, v. 172, p. 705-17.
- Azmi, I. F., B. A. Davies, J. Xiao, M. Babst, Z. Xu, and D. J. Katzmann, 2008, ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1: *Dev Cell*, v. 14, p. 50-61.
- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr, 2002b, Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting: *Dev Cell*, v. 3, p. 271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland, and S. D. Emr, 2002a, Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body: *Dev Cell*, v. 3, p. 283-9.
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr, 1997, Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p: *Embo J*, v. 16, p. 1820-31.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr, 1998, The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function: *Embo J*, v. 17, p. 2982-93.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark, 2003, Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes: *J Cell Biol*, v. 162, p. 435-42.

- Balasubramanian, M. K., A. Feoktistova, D. McCollum, and K. L. Gould, 1996, Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionarily conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function: *Embo J*, v. 15, p. 6426-37.
- Bankaitis, V. A., L. M. Johnson, and S. D. Emr, 1986, Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, p. 9075-9.
- Banta, L. M., J. S. Robinson, D. J. Klionsky, and S. D. Emr, 1988, Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting: *J Cell Biol*, v. 107, p. 1369-83.
- Bear, J. E., J. F. Rawls, and C. L. Saxe, 3rd, 1998, SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development: *J Cell Biol*, v. 142, p. 1325-35.
- Ben-Yaacov, S., R. Le Borgne, I. Abramson, F. Schweisguth, and E. D. Schejter, 2001, Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling: *J Cell Biol*, v. 152, p. 1-13.
- Benedetti, H., S. Raths, F. Crausaz, and H. Riezman, 1994, The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast: *Mol Biol Cell*, v. 5, p. 1023-37.
- Benmerah, A., M. Bayrou, N. Cerf-Bensussan, and A. Dautry-Varsat, 1999, Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant: *J Cell Sci*, v. 112 ( Pt 9), p. 1303-11.
- Bi, E., 2001, Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation: *Cell Struct Funct*, v. 26, p. 529-37.
- Bi, E., P. Maddox, D. J. Lew, E. D. Salmon, J. N. McMillan, E. Yeh, and J. R. Pringle, 1998, Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis: *J Cell Biol*, v. 142, p. 1301-12.
- Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer, and R. C. Piper, 2002, The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 534-9.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, W. R. Kearney, A. D. Robertson, and R. C. Piper, 2003, Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome: *J Cell Biol*, v. 163, p. 237-43.
- Blondel, M. O., J. Morvan, S. Dupre, D. Urban-Grimal, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Volland, 2004, Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation: *Mol Biol Cell*, v. 15, p. 883-95.
- Bompard, G., and E. Caron, 2004, Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short: *J Cell Biol*, v. 166, p. 957-62.
- Bork, P., C. Sander, and A. Valencia, 1992, An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, p. 7290-4.
- Botstein, D., S. A. Chervitz, and J. M. Cherry, 1997, Yeast as a model organism: *Science*, v. 277, p. 1259-60.
- Bowers, K., B. P. Levi, F. I. Patel, and T. H. Stevens, 2000, The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Biol Cell*, v. 11, p. 4277-94.
- Bowers, K., J. Lottridge, S. B. Helliwell, L. M. Goldthwaite, J. P. Luzio, and T. H. Stevens, 2004, Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Traffic*, v. 5, p. 194-210.
- Bowers, K., and T. H. Stevens, 2005, Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Biochim Biophys Acta*, v. 1744, p. 438-54.

- Brazil, D. P., Z. Z. Yang, and B. A. Hemmings, 2004, Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts: *Trends Biochem Sci*, v. 29, p. 233-42.
- Brembu, T., P. Winge, M. Seem, and A. M. Bones, 2004, NAPP and PIRP encode subunits of a putative wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis: *Plant Cell*, v. 16, p. 2335-49.
- Bretscher, A., 1993, Microfilaments and membranes: *Curr Opin Cell Biol*, v. 5, p. 653-60.
- Bretscher, A., 2003, Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors: *J Cell Biol*, v. 160, p. 811-6.
- Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler, and D. E. Wakeham, 2001, Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 17, p. 517-68.
- Buchwald, G., E. Hostinova, M. G. Rudolph, A. Kraemer, A. Sickmann, H. E. Meyer, K. Scheffzek, and A. Wittinghofer, 2001, Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation: *Mol Cell Biol*, v. 21, p. 5179-89.
- Burd, C. G., and S. D. Emr, 1998, Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains: *Mol Cell*, v. 2, p. 157-62.
- Bustelo, X. R., V. Sauzeau, and I. M. Berenjeno, 2007, GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo: *Bioessays*, v. 29, p. 356-70.
- Carrier, M. F., 1991, Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly: *Curr Opin Cell Biol*, v. 3, p. 12-7.
- Carrier, M. F., P. Nioche, I. Broutin-L'Hermite, R. Boujemaa, C. Le Clainche, C. Egile, C. Garbay, A. Ducruix, P. Sansonetti, and D. Pantaloni, 2000, GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex: *J Biol Chem*, v. 275, p. 21946-52.
- Carrier, M. F., S. Wiesner, C. Le Clainche, and D. Pantaloni, 2003, Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro: *C R Biol*, v. 326, p. 161-70.
- Casamayor, A., and M. Snyder, 2002, Bud-site selection and cell polarity in budding yeast: *Curr Opin Microbiol*, v. 5, p. 179-86.
- Cereghino, J. L., E. G. Marcusson, and S. D. Emr, 1995, The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization: *Mol Biol Cell*, v. 6, p. 1089-102.
- Chant, J., and I. Herskowitz, 1991, Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway: *Cell*, v. 65, p. 1203-12.
- Chereau, D., M. Boczkowska, A. Skwarek-Maruszewska, I. Fujiwara, D. B. Hayes, G. Rebowski, P. Lappalainen, T. D. Pollard, and R. Dominguez, 2008, Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells: *Science*, v. 320, p. 239-43.
- Chesarone, M. A., and B. L. Goode, 2009, Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay: *Curr Opin Cell Biol*, v. 21, p. 28-37.
- Chu, T., J. Sun, S. Saksena, and S. D. Emr, 2006, New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly: *J Cell Biol*, v. 175, p. 815-23.
- Chvatchko, Y., I. Howald, and H. Riezman, 1986, Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response: *Cell*, v. 46, p. 355-64.
- Ciccarelli, F. D., C. Proukakis, H. Patel, H. Cross, S. Azam, M. A. Patton, P. Bork, and A. H. Crosby, 2003, The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia: *Genomics*, v. 81, p. 437-41.
- Ciechanover, A., 1998, The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life: *Embo J*, v. 17, p. 7151-60.

- Collins, K. M., N. L. Thorngren, R. A. Fratti, and W. T. Wickner, 2005, Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion: *Embo J*, v. 24, p. 1775-86.
- Collins, K. M., and W. T. Wickner, 2007, Trans-SNARE complex assembly and yeast vacuole membrane fusion: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 8755-60.
- Conibear, E., and T. H. Stevens, 2000, Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi: *Mol Biol Cell*, v. 11, p. 305-23.
- Conradt, B., A. Haas, and W. Wickner, 1994, Determination of four biochemically distinct, sequential stages during vacuole inheritance in vitro: *J Cell Biol*, v. 126, p. 99-110.
- Cooke, F. T., S. K. Dove, R. K. McEwen, G. Painter, A. B. Holmes, M. N. Hall, R. H. Michell, and P. J. Parker, 1998, The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*: *Curr Biol*, v. 8, p. 1219-22.
- Cooper, A. A., and T. H. Stevens, 1996, Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases: *J Cell Biol*, v. 133, p. 529-41.
- Cope, M. J., S. Yang, C. Shang, and D. G. Drubin, 1999, Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast: *J Cell Biol*, v. 144, p. 1203-18.
- Cory, G. O., R. Cramer, L. Blanchoin, and A. J. Ridley, 2003, Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP: *Mol Cell*, v. 11, p. 1229-39.
- Costaguta, G., M. C. Duncan, G. E. Fernandez, G. H. Huang, and G. S. Payne, 2006, Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p: *Mol Biol Cell*, v. 17, p. 3907-20.
- Cowles, C. R., W. B. Snyder, C. G. Burd, and S. D. Emr, 1997, Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component: *Embo J*, v. 16, p. 2769-82.
- Curtiss, M., C. Jones, and M. Babst, 2007, Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 636-45.
- D'Hondt, K., A. Heese-Peck, and H. Riezman, 2000, Protein and lipid requirements for endocytosis: *Annu Rev Genet*, v. 34, p. 255-295.
- Darsow, T., C. G. Burd, and S. D. Emr, 1998, Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE: *J Cell Biol*, v. 142, p. 913-22.
- Dayel, M. J., E. A. Holleran, and R. D. Mullins, 2001, Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 14871-6.
- De Camilli, P., H. Chen, J. Hyman, E. Panepucci, A. Bateman, and A. T. Brunger, 2002, The ENTH domain: *FEBS Lett*, v. 513, p. 11-8.
- Del Pozo, M. A., W. B. Kiosses, N. B. Alderson, N. Meller, K. M. Hahn, and M. A. Schwartz, 2002, Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 232-9.
- Deloche, O., and R. W. Schekman, 2002, Vps10p cycles between the TGN and the late endosome via the plasma membrane in clathrin mutants: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 4296-307.
- Derry, J. M., H. D. Ochs, and U. Francke, 1994, Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome: *Cell*, v. 78, p. 635-44.

- Dewar, H., D. T. Warren, F. C. Gardiner, C. G. Gourlay, N. Satish, M. R. Richardson, P. D. Andrews, and K. R. Ayscough, 2002, Novel proteins linking the actin cytoskeleton to the endocytic machinery in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 3646-61.
- Dove, S. K., F. T. Cooke, M. R. Douglas, L. G. Sayers, P. J. Parker, and R. H. Michell, 1997, Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis: *Nature*, v. 390, p. 187-92.
- Dove, S. K., and Z. E. Johnson, 2007, Our FABulous VACation: a decade of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: *Biochem Soc Symp*, p. 129-39.
- Dove, S. K., R. C. Piper, R. K. McEwen, J. W. Yu, M. C. King, D. C. Hughes, J. Thuring, A. B. Holmes, F. T. Cooke, R. H. Michell, P. J. Parker, and M. A. Lemmon, 2004, Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors: *Embo J*, v. 23, p. 1922-33.
- Drubin, D. G., H. D. Jones, and K. F. Wertman, 1993, Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site: *Mol Biol Cell*, v. 4, p. 1277-94.
- Dulic, V., and H. Riezman, 1989, Characterization of the END1 gene required for vacuole biogenesis and gluconeogenic growth of budding yeast: *Embo J*, v. 8, p. 1349-59.
- Duncan, M. C., M. J. Cope, B. L. Goode, B. Wendland, and D. G. Drubin, 2001, Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex: *Nat Cell Biol*, v. 3, p. 687-90.
- Duncan, M. C., G. Costaguta, and G. S. Payne, 2003, Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif: *Nat Cell Biol*, v. 5, p. 77-81.
- Dunn, T. M., and D. Shortle, 1990, Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 10, p. 2308-14.
- Dupre, S., and R. Haguenaer-Tsapis, 2001a, Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase: *Mol Cell Biol*, v. 21, p. 4482-94.
- Eden, S., R. Rohatgi, A. V. Podtelejnikov, M. Mann, and M. W. Kirschner, 2002, Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck: *Nature*, v. 418, p. 790-3.
- Efe, J. A., R. J. Botelho, and S. D. Emr, 2007, Atg18 regulates organelle morphology and Fab1 kinase activity independent of its membrane recruitment by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 4232-44.
- Eitzen, G., 2003, Actin remodeling to facilitate membrane fusion: *Biochim Biophys Acta*, v. 1641, p. 175-81.
- Eitzen, G., L. Wang, N. Thorngren, and W. Wickner, 2002, Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion: *J Cell Biol*, v. 158, p. 669-79.
- Ellson, C. D., S. Andrews, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins, 2002, The PX domain: a new phosphoinositide-binding module: *J Cell Sci*, v. 115, p. 1099-105.
- Engqvist-Goldstein, A. E., and D. G. Drubin, 2003, Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 19, p. 287-332.
- Epple, U. D., E. L. Eskelinen, and M. Thumm, 2003, Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function?: *J Biol Chem*, v. 278, p. 7810-21.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall, 2002, Rho GTPases in cell biology: *Nature*, v. 420, p. 629-35.

- Eugster, A., E. I. Pecheur, F. Michel, B. Winsor, F. Letourneur, and S. Friant, 2004, Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body: *Mol Biol Cell*, v. 15, p. 3031-41.
- Evangelista, M., K. Blundell, M. S. Longtine, C. J. Chow, N. Adames, J. R. Pringle, M. Peter, and C. Boone, 1997, Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis: *Science*, v. 276, p. 118-22.
- Evangelista, M., B. M. Klebl, A. H. Tong, B. A. Webb, T. Leeuw, E. Leberer, M. Whiteway, D. Y. Thomas, and C. Boone, 2000, A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex: *J Cell Biol*, v. 148, p. 353-62.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D. C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher, 2002, Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 260-9.
- Faix, J., and R. Grosse, 2006, Staying in shape with formins: *Dev Cell*, v. 10, p. 693-706.
- Falet, H., K. M. Hoffmeister, R. Neujahr, J. E. Italiano, Jr., T. P. Stossel, F. S. Southwick, and J. H. Hartwig, 2002, Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 16782-7.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger, and R. Jahn, 1998, Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 15781-6.
- Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans, and H. T. McMahon, 2002, Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin: *Nature*, v. 419, p. 361-6.
- Frank, M., C. Egile, J. Dyachok, S. Djakovic, M. Nolasco, R. Li, and L. G. Smith, 2004, Activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization by plant proteins distantly related to Scar/WAVE: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 16379-84.
- Friant, S., E. I. Pecheur, A. Eugster, F. Michel, Y. Lefkir, D. Nourrisson, and F. Letourneur, 2003, Ent3p Is a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> effector required for protein sorting to the multivesicular body: *Dev Cell*, v. 5, p. 499-511.
- Fujita, A., C. Oka, Y. Arikawa, T. Katagai, A. Tonouchi, S. Kuhara, and Y. Misumi, 1994, A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes: *Nature*, v. 372, p. 567-70.
- Galletta, B. J., D. Y. Chuang, and J. A. Cooper, 2008, Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis: *PLoS Biol*, v. 6, p. e1.
- Gary, J. D., A. E. Wurmser, C. J. Bonangelino, L. S. Weisman, and S. D. Emr, 1998, Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis: *J Cell Biol*, v. 143, p. 65-79.
- Geli, M. I., R. Lombardi, B. Schmelzl, and H. Riezman, 2000, An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization: *Embo J*, v. 19, p. 4281-91.
- Gill, D. J., H. Teo, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, S. D. Emr, and R. L. Williams, 2007, Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking: *Embo J*, v. 26, p. 600-12.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton, and H. Stenmark, 2000, Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells: *Embo J*, v. 19, p. 4577-88.
- Gitai, Z., N. Dye, and L. Shapiro, 2004, An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 8643-8.

- Goley, E. D., S. E. Rodenbusch, A. C. Martin, and M. D. Welch, 2004, Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor: *Mol Cell*, v. 16, p. 269-79.
- Goley, E. D., and M. D. Welch, 2006, The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 713-26.
- Goode, B. L., and M. J. Eck, 2007, Mechanism and function of formins in the control of actin assembly: *Annu Rev Biochem*, v. 76, p. 593-627.
- Goode, B. L., and A. A. Rodal, 2001b, Modular complexes that regulate actin assembly in budding yeast: *Curr Opin Microbiol*, v. 4, p. 703-12.
- Goode, B. L., A. A. Rodal, G. Barnes, and D. G. Drubin, 2001a, Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p: *J Cell Biol*, v. 153, p. 627-34.
- Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik, and D. D. Sabatini, 1993, Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells: *J Cell Biol*, v. 120, p. 695-710.
- Graumann, P. L., 2007, Cytoskeletal elements in bacteria: *Annu Rev Microbiol*, v. 61, p. 589-618.
- Gurunathan, S., D. David, and J. E. Gerst, 2002, Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast: *Embo J*, v. 21, p. 602-14.
- Haas, A., B. Conradt, and W. Wickner, 1994, G-protein ligands inhibit in vitro reactions of vacuole inheritance: *J Cell Biol*, v. 126, p. 87-97.
- Harborth, J., S. M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, and K. Weber, 2001, Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs: *J Cell Sci*, v. 114, p. 4557-65.
- Helliwell, S. B., S. Losko, and C. A. Kaiser, 2001, Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease: *J Cell Biol*, v. 153, p. 649-62.
- Herman, P. K., J. H. Stack, and S. D. Emr, 1991, A genetic and structural analysis of the yeast Vps15 protein kinase: evidence for a direct role of Vps15p in vacuolar protein delivery: *Embo J*, v. 10, p. 4049-60.
- Hershko, A., and A. Ciechanover, 1998, The ubiquitin system: *Annu Rev Biochem*, v. 67, p. 425-79.
- Hicke, L., and R. Dunn, 2003, Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 19, p. 141-72.
- Hickey, C. M., C. Stroupe, and W. Wickner, 2009, The major role of the Rab Ypt7p in vacuole fusion is supporting HOPS membrane association: *J Biol Chem*, v. 284, p. 16118-25.
- 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: *Nature*, v. 431, p. 221-5.
- Higgs, H. N., and T. D. Pollard, 2000, Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex: *J Cell Biol*, v. 150, p. 1311-20.
- Higgs, H. N., and T. D. Pollard, 2001a, Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins: *Annu Rev Biochem*, v. 70, p. 649-76.
- Hing, H., J. Xiao, N. Harden, L. Lim, and S. L. Zipursky, 1999, Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*: *Cell*, v. 97, p. 853-63.
- Hirst, J., A. Motley, K. Harasaki, S. Y. Peak Chew, and M. S. Robinson, 2003, EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1: *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 625-41.

- Ho, H. Y., R. Rohatgi, A. M. Lebensohn, M. Le, J. Li, S. P. Gygi, and M. W. Kirschner, 2004, Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex: *Cell*, v. 118, p. 203-16.
- Hofken, T., and E. Schiebel, 2002, A role for cell polarity proteins in mitotic exit: *Embo J*, v. 21, p. 4851-62.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch, 1990, Atomic model of the actin filament: *Nature*, v. 347, p. 44-9.
- Holtzman, D. A., S. Yang, and D. G. Drubin, 1993, Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 122, p. 635-44.
- Howard, J. P., J. L. Hutton, J. M. Olson, and G. S. Payne, 2002, Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPF(1,2)D-mediated endocytosis: *J Cell Biol*, v. 157, p. 315-26.
- Huckaba, T. M., A. C. Gay, L. F. Pantalena, H. C. Yang, and L. A. Pon, 2004, Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 167, p. 519-30.
- Hurley, J. H., and S. D. Emr, 2006, The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network: *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v. 35, p. 277-98.
- Hurley, J. H., and D. Yang, 2008, MIT domainia: *Dev Cell*, v. 14, p. 6-8.
- Idrissi, F. Z., H. Grotsch, I. M. Fernandez-Golbano, C. Presciatto-Baschong, H. Riezman, and M. I. Geli, 2008, Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane: *J Cell Biol*, v. 180, p. 1219-32.
- Imai, K., S. Nonoyama, and H. D. Ochs, 2003, WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype: *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, v. 3, p. 427-36.
- Insall, R., A. Muller-Taubenberger, L. Machesky, J. Kohler, E. Simmeth, S. J. Atkinson, I. Weber, and G. Gerisch, 2001, Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis: *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 50, p. 115-28.
- Ivey, F. D., and C. S. Hoffman, 2005, Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 Galpha of the glucose signaling pathway: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 6108-13.
- Jaffe, A. B., and A. Hall, 2005, Rho GTPases: biochemistry and biology: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 21, p. 247-69.
- Jones, E. W., 1977, Proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 85, p. 23-33.
- Jones, L. J., R. Carballido-Lopez, and J. Errington, 2001, Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*: *Cell*, v. 104, p. 913-22.
- Jonsdottir, G. A., and R. Li, 2004, Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles: *Curr Biol*, v. 14, p. 1604-9.
- Jorgensen, M. U., S. D. Emr, and J. R. Winther, 1999, Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*: *Eur J Biochem*, v. 260, p. 461-9.
- Kabsch, W., and K. C. Holmes, 1995, The actin fold: *Faseb J*, v. 9, p. 167-74.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes, 1990, Atomic structure of the actin:DNase I complex: *Nature*, v. 347, p. 37-44.
- Kaksonen, M., Y. Sun, and D. G. Drubin, 2003, A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization: *Cell*, v. 115, p. 475-87.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, and D. G. Drubin, 2005, A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery: *Cell*, v. 123, p. 305-20.

- Kalthoff, C., S. Groos, R. Kohl, S. Mahrhold, and E. J. Ungewickell, 2002, Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 4060-73.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr, 2001, Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I: *Cell*, v. 106, p. 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr, 2002, Receptor downregulation and multivesicular-body sorting: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 893-905.
- Katzmann, D. J., S. Sarkar, T. Chu, A. Audhya, and S. D. Emr, 2004, Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S: *Mol Biol Cell*, v. 15, p. 468-80.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, and S. D. Emr, 2003, Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting: *J Cell Biol*, v. 162, p. 413-23.
- Kay, B. K., M. P. Williamson, and M. Sudol, 2000, The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains: *Faseb J*, v. 14, p. 231-41.
- Kellis, M., B. W. Birren, and E. S. Lander, 2004, Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Nature*, v. 428, p. 617-24.
- Kelly, A. E., H. Kranitz, V. Dotsch, and R. D. Mullins, 2006, Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex: *J Biol Chem*, v. 281, p. 10589-97.
- Kieffer, C., J. J. Skalicky, E. Morita, I. De Domenico, D. M. Ward, J. Kaplan, and W. I. Sundquist, 2008, Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding: *Dev Cell*, v. 15, p. 62-73.
- Kilmartin, J. V., and A. E. Adams, 1984, Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*: *J Cell Biol*, v. 98, p. 922-33.
- Kim, A. S., L. T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G. A. Liu, and M. K. Rosen, 2000, Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein: *Nature*, v. 404, p. 151-8.
- Kim, K., B. J. Galletta, K. O. Schmidt, F. S. Chang, K. J. Blumer, and J. A. Cooper, 2006, Actin-based motility during endocytosis in budding yeast: *Mol Biol Cell*, v. 17, p. 1354-63.
- Kirchhausen, T., and S. C. Harrison, 1981, Protein organization in clathrin trimers: *Cell*, v. 23, p. 755-61.
- Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton, and J. Gruenberg, 1998, A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function: *Nature*, v. 392, p. 193-7.
- Kolluri, R., K. F. Talias, C. L. Carpenter, F. S. Rosen, and T. Kirchhausen, 1996, Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 5615-8.
- Kubler, E., and H. Riezman, 1993, Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast: *Embo J*, v. 12, p. 2855-62.
- 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: *J Virol*, v. 80, p. 9465-80.
- Lata, S., M. Roessle, J. Solomons, M. Jamin, H. G. Gottlinger, D. I. Svergun, and W. Weissenhorn, 2008, Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3: *J Mol Biol*, v. 378, p. 818-27.
- Lazzarino, D. A., I. Boldogh, M. G. Smith, J. Rosand, and L. A. Pon, 1994, Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity: *Mol Biol Cell*, v. 5, p. 807-18.

- Lechler, T., A. Shevchenko, and R. Li, 2000, Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization: *J Cell Biol*, v. 148, p. 363-73.
- Lee, W. L., M. Bezanilla, and T. D. Pollard, 2000, Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp: *J Cell Biol*, v. 151, p. 789-800.
- Lemmon, S. K., and L. M. Traub, 2000, Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells: *Curr Opin Cell Biol*, v. 12, p. 457-66.
- Leon, S., Z. Erpapazoglou, and R. Haguenaer-Tsapis, 2008, Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 2379-88.
- Li, R., 1997, Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton: *J Cell Biol*, v. 136, p. 649-58.
- Lippincott, J., and R. Li, 1998, Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis: *J Cell Biol*, v. 140, p. 355-66.
- Long, R. M., R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, and R. P. Jansen, 1997, Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA: *Science*, v. 277, p. 383-7.
- Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard, and S. N. Cohen, 2003, TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 7626-31.
- Luna, E. J., and A. L. Hitt, 1992, Cytoskeleton--plasma membrane interactions: *Science*, v. 258, p. 955-64.
- Madania, A., P. Dumoulin, S. Grava, H. Kitamoto, C. Scharer-Brodbeck, A. Soulard, V. Moreau, and B. Winsor, 1999, The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex: *Mol Biol Cell*, v. 10, p. 3521-38.
- Marchand, J. B., D. A. Kaiser, T. D. Pollard, and H. N. Higgs, 2001, Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex: *Nat Cell Biol*, v. 3, p. 76-82.
- Marcusson, E. G., B. F. Horazdovsky, J. L. Cereghino, E. Gharakhanian, and S. D. Emr, 1994, The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene: *Cell*, v. 77, p. 579-86.
- Martin, A. C., M. D. Welch, and D. G. Drubin, 2006, Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation: *Nat Cell Biol*, v. 8, p. 826-33.
- Mayer, B. J., M. Hamaguchi, and H. Hanafusa, 1988, A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C: *Nature*, v. 332, p. 272-5.
- McCollum, D., A. Feoktistova, M. Morphey, M. Balasubramanian, and K. L. Gould, 1996, The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin: *Embo J*, v. 15, p. 6438-46.
- McCormick, F., 1993, Signal transduction. How receptors turn Ras on: *Nature*, v. 363, p. 15-6.
- McCullough, J., P. E. Row, O. Lorenzo, M. Doherty, R. Beynon, M. J. Clague, and S. Urbe, 2006, Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery: *Curr Biol*, v. 16, p. 160-5.
- Meyer, D. M., P. Crottet, B. Maco, E. Degtyar, D. Cassel, and M. Spiess, 2005, Oligomerization and dissociation of AP-1 adaptors are regulated by cargo signals and by ArfGAP1-induced GTP hydrolysis: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 4745-54.

- Miki, H., K. Miura, and T. Takenawa, 1996, N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases: *Embo J*, v. 15, p. 5326-35.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa, 1998, WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac: *Embo J*, v. 17, p. 6932-41.
- Millard, T. H., S. J. Sharp, and L. M. Machesky, 2004, Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex: *Biochem J*, v. 380, p. 1-17.
- Mills, I. G., G. J. Praefcke, Y. Vallis, B. J. Peter, L. E. Olesen, J. L. Gallop, P. J. Butler, P. R. Evans, and H. T. McMahon, 2003, EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking: *J Cell Biol*, v. 160, p. 213-22.
- Mitchell, D. A., T. K. Marshall, and R. J. Deschenes, 1993, Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast: *Yeast*, v. 9, p. 715-22.
- Mizuno, E., K. Kawahata, M. Kato, N. Kitamura, and M. Komada, 2003, STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif: *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 3675-89.
- Mizuno, E., K. Kawahata, A. Okamoto, N. Kitamura, and M. Komada, 2004, Association with Hrs is required for the early endosomal localization, stability, and function of STAM: *J Biochem*, v. 135, p. 385-96.
- Molk, J. N., and K. Bloom, 2006, Microtubule dynamics in the budding yeast mating pathway: *J Cell Sci*, v. 119, p. 3485-90.
- Moon, S. Y., and Y. Zheng, 2003, Rho GTPase-activating proteins in cell regulation: *Trends Cell Biol*, v. 13, p. 13-22.
- Moreau, V., J. M. Galan, G. Devilliers, R. Haguenaer-Tsapis, and B. Winsor, 1997, The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis: *Mol Biol Cell*, v. 8, p. 1361-75.
- Moreau, V., A. Madania, R. P. Martin, and B. Winson, 1996, The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton: *J Cell Biol*, v. 134, p. 117-32.
- Morvan, J., M. Froissard, R. Haguenaer-Tsapis, and D. Urban-Grimal, 2004, The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies: *Traffic*, v. 5, p. 383-92.
- Moseley, J. B., and B. L. Goode, 2005, Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6: *J Biol Chem*, v. 280, p. 28023-33.
- Moseley, J. B., and B. L. Goode, 2006, The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 70, p. 605-45.
- Mulholland, J., D. Preuss, A. Moon, A. Wong, D. Drubin, and D. Botstein, 1994, Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane: *J Cell Biol*, v. 125, p. 381-91.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser, and T. D. Pollard, 1998, The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 6181-6.
- Mullins, R. D., W. F. Stafford, and T. D. Pollard, 1997, Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*: *J Cell Biol*, v. 136, p. 331-43.
- Munn, A. L., and H. Riezman, 1994, Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes: *J Cell Biol*, v. 127, p. 373-86.

- Munn, A. L., B. J. Stevenson, M. I. Geli, and H. Riezman, 1995, end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Biol Cell*, v. 6, p. 1721-42.
- Muziol, T., E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Gottlinger, and W. Weissenhorn, 2006, Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3: *Dev Cell*, v. 10, p. 821-30.
- Nakamura, N., A. Hirata, Y. Ohsumi, and Y. Wada, 1997, Vam2/Vps41p and Vam6/Vps39p are components of a protein complex on the vacuolar membranes and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 272, p. 11344-9.
- Newpher, T. M., R. P. Smith, V. Lemmon, and S. K. Lemmon, 2005, In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast: *Dev Cell*, v. 9, p. 87-98.
- Nicholson-Dykstra, S., H. N. Higgs, and E. S. Harris, 2005, Actin dynamics: growth from dendritic branches: *Curr Biol*, v. 15, p. R346-57.
- Nickerson, D. P., C. L. Brett, and A. J. Merz, 2009, Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic: *Curr Opin Cell Biol*, v. 21, p. 543-51.
- Nickerson, D. P., M. R. Russell, and G. Odorizzi, 2007, A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting: *EMBO Rep*, v. 8, p. 644-50.
- Nickerson, D. P., M. West, and G. Odorizzi, 2006, Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes: *J Cell Biol*, v. 175, p. 715-20.
- Nicot, A. S., H. Fares, B. Payrastra, A. D. Chisholm, M. Labouesse, and J. Laporte, 2006, The phosphoinositide kinase PIKfyve/Fab1p regulates terminal lysosome maturation in *Caenorhabditis elegans*: *Mol Biol Cell*, v. 17, p. 3062-74.
- Nijman, S. M., M. P. Luna-Vargas, A. Velds, T. R. Brummelkamp, A. M. Dirac, T. K. Sixma, and R. Bernards, 2005, A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes: *Cell*, v. 123, p. 773-86.
- Nikko, E., and B. Andre, 2007, Split-ubiquitin two-hybrid assay to analyze protein-protein interactions at the endosome: application to *Saccharomyces cerevisiae* Bro1 interacting with ESCRT complexes, the Doa4 ubiquitin hydrolase, and the Rsp5 ubiquitin ligase: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 1266-77.
- Nilsen, T., A. W. Yan, G. Gale, and M. B. Goldberg, 2005, Presence of multiple sites containing polar material in spherical *Escherichia coli* cells that lack MreB: *J Bacteriol*, v. 187, p. 6187-96.
- Nothwehr, S. F., N. J. Bryant, and T. H. Stevens, 1996, The newly identified yeast GRD genes are required for retention of late-Golgi membrane proteins: *Mol Cell Biol*, v. 16, p. 2700-7.
- Novick, P., and D. Botstein, 1985, Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants: *Cell*, v. 40, p. 405-16.
- Novick, P., B. C. Osmond, and D. Botstein, 1989, Suppressors of yeast actin mutations: *Genetics*, v. 121, p. 659-74.
- Obita, T., S. Saksena, S. Ghazi-Tabatabai, D. J. Gill, O. Perisic, S. D. Emr, and R. L. Williams, 2007, Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4: *Nature*, v. 449, p. 735-9.
- Odorizzi, G., M. Babst, and S. D. Emr, 1998, Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body: *Cell*, v. 95, p. 847-58.
- Oestreich, A. J., M. Aboian, J. Lee, I. Azmi, J. Payne, R. Issaka, B. A. Davies, and D. J. Katzmann, 2007a, Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 707-20.

- Oestreich, A. J., B. A. Davies, J. A. Payne, and D. J. Katzmann, 2007b, Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 646-57.
- Oikawa, T., H. Yamaguchi, T. Itoh, M. Kato, T. Ijuin, D. Yamazaki, S. Suetsugu, and T. Takenawa, 2004, PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia: *Nat Cell Biol*, v. 6, p. 420-6.
- Ostrowicz, C. W., C. T. Meiringer, and C. Ungermann, 2008, Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics: *Autophagy*, v. 4, p. 5-19.
- Palmer, R. E., D. S. Sullivan, T. Huffaker, and D. Koshland, 1992, Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 119, p. 583-93.
- Pan, F., C. Egile, T. Lipkin, and R. Li, 2004, ARPC1/Arc40 mediates the interaction of the actin-related protein 2 and 3 complex with Wiskott-Aldrich syndrome protein family activators: *J Biol Chem*, v. 279, p. 54629-36.
- Panchal, S. C., D. A. Kaiser, E. Torres, T. D. Pollard, and M. K. Rosen, 2003, A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex: *Nat Struct Biol*, v. 10, p. 591-8.
- Panek, H. R., J. D. Stepp, H. M. Engle, K. M. Marks, P. K. Tan, S. K. Lemmon, and L. C. Robinson, 1997, Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex: *Embo J*, v. 16, p. 4194-204.
- Papa, F. R., and M. Hochstrasser, 1993, The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene: *Nature*, v. 366, p. 313-9.
- Peplowska, K., D. F. Markgraf, C. W. Ostrowicz, G. Bange, and C. Ungermann, 2007, The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis: *Dev Cell*, v. 12, p. 739-50.
- Pickart, C. M., 2001, Mechanisms underlying ubiquitination: *Annu Rev Biochem*, v. 70, p. 503-33.
- Pineda-Molina, E., H. Belrhali, A. J. Piefer, I. Akula, P. Bates, and W. Weissenhorn, 2006, The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment: *Traffic*, v. 7, p. 1007-16.
- Piper, R. C., N. J. Bryant, and T. H. Stevens, 1997, The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway: *J Cell Biol*, v. 138, p. 531-45.
- Pobbati, A. V., A. Stein, and D. Fasshauer, 2006, N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion: *Science*, v. 313, p. 673-6.
- Poch, O., and B. Winsor, 1997, Who's who among the *Saccharomyces cerevisiae* actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family: *Yeast*, v. 13, p. 1053-8.
- Pollard, T. D., 1986, Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments: *J Cell Biol*, v. 103, p. 2747-54.
- Pollard, T. D., 2007, Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins: *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v. 36, p. 451-77.
- Pollard, T. D., and G. G. Borisy, 2003, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments: *Cell*, v. 112, p. 453-65.
- Pollard, T. D., and M. S. Mooseker, 1981, Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores: *J Cell Biol*, v. 88, p. 654-9.
- Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, and P. P. Di Fiore, 2002, A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins: *Nature*, v. 416, p. 451-5.

- 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: *J Cell Biol*, v. 162, p. 425-34.
- Price, A., D. Seals, W. Wickner, and C. Ungermann, 2000, The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein: *J Cell Biol*, v. 148, p. 1231-8.
- Pruyne, D., and A. Bretscher, 2000, Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states: *J Cell Sci*, v. 113 ( Pt 3), p. 365-75.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone, 2002, Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association: *Science*, v. 297, p. 612-5.
- Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong, and A. Bretscher, 2004, Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 20, p. 559-91.
- Puertollano, R., P. A. Randazzo, J. F. Presley, L. M. Hartnell, and J. S. Bonifacino, 2001, The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN: *Cell*, v. 105, p. 93-102.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, E. Kerkhoff, and R. D. Mullins, 2005, *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor: *Nature*, v. 433, p. 382-8.
- Quintero-Monzon, O., A. A. Rodal, B. Strokopytov, S. C. Almo, and B. L. Goode, 2005, Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 3128-39.
- 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: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 394-8.
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, and H. Stenmark, 2001a, FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes: *J Cell Sci*, v. 114, p. 2255-63.
- Raiborg, C., J. Wesche, L. Malerod, and H. Stenmark, 2006, Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains: *J Cell Sci*, v. 119, p. 2414-24.
- Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz, and H. Riezman, 1993, end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 120, p. 55-65.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater, and T. H. Stevens, 1992, Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants: *Mol Biol Cell*, v. 3, p. 1389-402.
- Read, E. B., H. H. Okamura, and D. G. Drubin, 1992, Actin- and tubulin-dependent functions during *Saccharomyces cerevisiae* mating projection formation: *Mol Biol Cell*, v. 3, p. 429-44.
- Reggiori, F., and H. R. Pelham, 2001, Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting: *Embo J*, v. 20, p. 5176-86.
- Reggiori, F., and H. R. Pelham, 2002, A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 117-23.
- Ren, J., Y. Kee, J. M. Huibregtse, and R. C. Piper, 2007, Hse1, a component of the yeast Hrs-STAM ubiquitin-sorting complex, associates with ubiquitin peptidases and a ligase to control sorting efficiency into multivesicular bodies: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 324-35.
- Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore, 1993, Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site: *Science*, v. 259, p. 1157-61.

- Riezman, H., 1985, Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis: *Cell*, v. 40, p. 1001-9.
- Robertson, A. S., E. G. Allwood, A. P. Smith, F. C. Gardiner, R. Costa, S. J. Winder, and K. R. Ayscough, 2009, The WASP Homolog Las17 Activates the Novel Actin-regulatory Activity of Ysc84 to Promote Endocytosis in Yeast: *Mol Biol Cell*.
- Rocco, V., M. J. Daly, V. Matre, M. Lichten, and A. Nicolas, 1993, Identification of two divergently transcribed genes centromere-proximal to the ARG4 locus on chromosome VIII of *Saccharomyces cerevisiae*: *Yeast*, v. 9, p. 1111-20.
- Rodal, A. A., L. Kozubowski, B. L. Goode, D. G. Drubin, and J. H. Hartwig, 2005a, Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 372-84.
- Rodal, A. A., A. L. Manning, B. L. Goode, and D. G. Drubin, 2003, Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins: *Curr Biol*, v. 13, p. 1000-8.
- Rodal, A. A., O. Sokolova, D. B. Robins, K. M. Daugherty, S. Hippenmeyer, H. Riezman, N. Grigorieff, and B. L. Goode, 2005b, Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation: *Nat Struct Mol Biol*, v. 12, p. 26-31.
- Rohatgi, R., H. Y. Ho, and M. W. Kirschner, 2000, Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate: *J Cell Biol*, v. 150, p. 1299-310.
- Rothman, J. E., 1994, Intracellular membrane fusion: *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, v. 29, p. 81-96.
- Rothman, J. H., and T. H. Stevens, 1986, Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway: *Cell*, v. 47, p. 1041-51.
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J. M. Cherry, S. Henikoff, M. P. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M. S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S. E. Celniker, S. A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R. F. Galle, W. M. Gelbart, R. A. George, L. S. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N. L. Harris, B. A. Hay, R. A. Hoskins, J. Li, Z. Li, R. O. Hynes, S. J. Jones, P. M. Kuehl, B. Lemaitre, J. T. Littleton, D. K. Morrison, C. Mungall, P. H. O'Farrell, O. K. Pickeral, C. Shue, L. B. Vosshall, J. Zhang, Q. Zhao, X. H. Zheng, and S. Lewis, 2000, Comparative genomics of the eukaryotes: *Science*, v. 287, p. 2204-15.
- Rue, S. M., S. Mattei, S. Saksena, and S. D. Emr, 2008, Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 475-84.
- Rutherford, A. C., C. Traer, T. Wassmer, K. Pattni, M. V. Bujny, J. G. Carlton, H. Stenmark, and P. J. Cullen, 2006, The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport: *J Cell Sci*, v. 119, p. 3944-57.
- Sachse, M., S. Urbe, V. Oorschot, G. J. Strous, and J. Klumperman, 2002, Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 1313-28.
- Sagot, I., S. K. Klee, and D. Pellman, 2002a, Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 42-50.
- Sagot, I., A. A. Rodal, J. Moseley, B. L. Goode, and D. Pellman, 2002b, An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 626-31.
- Saint-Pol, A., B. Yelamos, M. Amessou, I. G. Mills, M. Dugast, D. Tenza, P. Schu, C. Antony, H. T. McMahon, C. Lamaze, and L. Johannes, 2004, Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes: *Dev Cell*, v. 6, p. 525-38.

- 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, p. 97-109.
- Salmon, E. D., 1989, Cytokinesis in animal cells: *Curr Opin Cell Biol*, v. 1, p. 541-7.
- Sato, T. K., P. Rehling, M. R. Peterson, and S. D. Emr, 2000, Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion: *Mol Cell*, v. 6, p. 661-71.
- Sawa, M., S. Suetsugu, A. Sugimoto, H. Miki, M. Yamamoto, and T. Takenawa, 2003, Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure: *J Cell Sci*, v. 116, p. 1505-18.
- Sbrissa, D., O. C. Ikonomov, and A. Shisheva, 2002a, Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization: *J Biol Chem*, v. 277, p. 6073-9.
- Schmidt, A., and A. Hall, 2002, Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch: *Genes Dev*, v. 16, p. 1587-609.
- Schu, P. V., K. Takegawa, M. J. Fry, J. H. Stack, M. D. Waterfield, and S. D. Emr, 1993, Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting: *Science*, v. 260, p. 88-91.
- Schwartz, M. L., and A. J. Merz, 2009, Capture and release of partially zipped trans-SNARE complexes on intact organelles: *J Cell Biol*, v. 185, p. 535-49.
- Seals, D. F., G. Eitzen, N. Margolis, W. T. Wickner, and A. Price, 2000, A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 9402-7.
- Seaman, M. N., E. G. Marcusson, J. L. Cereghino, and S. D. Emr, 1997, Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products: *J Cell Biol*, v. 137, p. 79-92.
- Sekiya-Kawasaki, M., A. C. Groen, M. J. Cope, M. Kaksonen, H. A. Watson, C. Zhang, K. M. Shokat, B. Wendland, K. L. McDonald, J. M. McCaffery, and D. G. Drubin, 2003, Dynamic phosphoregulation of the cortical actin cytoskeleton and endocytic machinery revealed by real-time chemical genetic analysis: *J Cell Biol*, v. 162, p. 765-72.
- Sevrioukov, E. A., N. Moghrabi, M. Kuhn, and H. Kramer, 2005, A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in *Drosophila*: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 2301-12.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien, 2004, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein: *Nat Biotechnol*, v. 22, p. 1567-72.
- Shaw, J. D., H. Hama, F. Sohrabi, D. B. DeWald, and B. Wendland, 2003, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> is required for delivery of endocytic cargo into the multivesicular body: *Traffic*, v. 4, p. 479-90.
- Sheterline, P., and J. C. Sparrow, 1994, Actin: Protein Profile, v. 1, p. 1-121.
- Shiflett, S. L., D. M. Ward, D. Huynh, M. B. Vaughn, J. C. Simmons, and J. Kaplan, 2004, Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 279, p. 10982-90.
- Shim, S., S. A. Merrill, and P. I. Hanson, 2008, Novel interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their implications for ESCRT-III disassembly: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 2661-72.
- Shortle, D., J. E. Haber, and D. Botstein, 1982, Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation: *Science*, v. 217, p. 371-3.

- Shortle, D., P. Novick, and D. Botstein, 1984, Construction and genetic characterization of temperature-sensitive mutant alleles of the yeast actin gene: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, p. 4889-93.
- Simonsen, A., A. E. Wurmser, S. D. Emr, and H. Stenmark, 2001, The role of phosphoinositides in membrane transport: *Curr Opin Cell Biol*, v. 13, p. 485-92.
- Slagsvold, T., R. Aasland, S. Hirano, K. G. Bache, C. Raiborg, D. Trambaiolo, S. Wakatsuki, and H. Stenmark, 2005, Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain: *J Biol Chem*, v. 280, p. 19600-6.
- Sloane, J. A., and T. K. Vartanian, 2007, WAVE1 and regulation of actin nucleation in myelination: *Neuroscientist*, v. 13, p. 486-91.
- Smythe, E., and K. R. Ayscough, 2003, The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton: *EMBO Rep*, v. 4, p. 246-51.
- Soetens, O., J. O. De Craene, and B. Andre, 2001, Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1: *J Biol Chem*, v. 276, p. 43949-57.
- Soulard, A., T. Lechler, V. Spiridonov, A. Shevchenko, R. Li, and B. Winsor, 2002, *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 7889-906.
- Stack, J. H., B. Horazdovsky, and S. D. Emr, 1995, Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 11, p. 1-33.
- Stahl, M. L., C. R. Ferez, K. L. Kelleher, R. W. Kriz, and J. L. Knopf, 1988, Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src: *Nature*, v. 332, p. 269-72.
- Stawiecka-Mirota, M., W. Pokrzywa, J. Morvan, T. Zoladek, R. Haguenaer-Tsapis, D. Urban-Grimal, and P. Morsomme, 2007, Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation: *Traffic*, v. 8, p. 1280-96.
- Stenmark, H., R. Aasland, and P. C. Driscoll, 2002, The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger: *FEBS Lett*, v. 513, p. 77-84.
- Stepp, J. D., K. Huang, and S. K. Lemmon, 1997, The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole: *J Cell Biol*, v. 139, p. 1761-74.
- Stossel, T. P., 1993, On the crawling of animal cells: *Science*, v. 260, p. 1086-94.
- Stroupe, C., K. M. Collins, R. A. Fratti, and W. Wickner, 2006, Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p: *Embo J*, v. 25, p. 1579-89.
- Stuchell-Brereton, M. D., J. J. Skalicky, C. Kieffer, M. A. Karren, S. Ghaffarian, and W. I. Sundquist, 2007, ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases: *Nature*, v. 449, p. 740-4.
- Suetsugu, S., H. Miki, and T. Takenawa, 1999, Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 260, p. 296-302.
- Sun, Y., A. C. Martin, and D. G. Drubin, 2006, Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity: *Dev Cell*, v. 11, p. 33-46.
- 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: *Mol Cell*, v. 13, p. 783-9.

- Symons, M., J. M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke, and A. Abo, 1996, Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization: *Cell*, v. 84, p. 723-34.
- Takenawa, T., and H. Miki, 2001, WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement: *J Cell Sci*, v. 114, p. 1801-9.
- Takizawa, P. A., A. Sil, J. R. Swedlow, I. Herskowitz, and R. D. Vale, 1997, Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast: *Nature*, v. 389, p. 90-3.
- Tan, P. K., N. G. Davis, G. F. Sprague, and G. S. Payne, 1993, Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast: *J Cell Biol*, v. 123, p. 1707-16.
- Tang, H. Y., A. Munn, and M. Cai, 1997, EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 17, p. 4294-304.
- Tang, H. Y., J. Xu, and M. Cai, 2000, Pan1p, End3p, and Sla1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis: *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 12-25.
- Teis, D., S. Saksena, and S. D. Emr, 2008, Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation: *Dev Cell*, v. 15, p. 578-89.
- Teo, H., D. J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, Y. Vallis, S. D. Emr, and R. L. Williams, 2006, ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes: *Cell*, v. 125, p. 99-111.
- Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez, and R. L. Williams, 2004b, ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes: *Dev Cell*, v. 7, p. 559-69.
- Teo, H., D. B. Veprintsev, and R. L. Williams, 2004a, Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins: *J Biol Chem*, v. 279, p. 28689-96.
- Thanabalu, T., and A. L. Munn, 2001, Functions of Vrp1p in cytokinesis and actin patches are distinct and neither requires a WH2/V domain: *Embo J*, v. 20, p. 6979-89.
- Thrasher, A. J., 2002, WASp in immune-system organization and function: *Nat Rev Immunol*, v. 2, p. 635-46.
- Tolliday, N., L. VerPlank, and R. Li, 2002, Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis: *Curr Biol*, v. 12, p. 1864-70.
- Tong, A. H., B. Drees, G. Nardelli, G. D. Bader, B. Brannetti, L. Castagnoli, M. Evangelista, S. Ferracuti, B. Nelson, S. Paoluzi, M. Quondam, A. Zucconi, C. W. Hogue, S. Fields, C. Boone, and G. Cesareni, 2002, A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules: *Science*, v. 295, p. 321-4.
- Tonikian, R., X. Xin, C. P. Toret, D. Gfeller, C. Landgraf, S. Panni, S. Paoluzi, L. Castagnoli, B. Currell, S. Seshagiri, H. Yu, B. Winsor, M. Vidal, M. B. Gerstein, G. D. Bader, R. Volkmer, G. Cesareni, D. G. Drubin, P. M. Kim, S. S. Sidhu, and C. Boone, 2009, Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins: *PLoS Biol*, v. 7, p. e1000218.
- Toret, C. P., and D. G. Drubin, 2006, The budding yeast endocytic pathway: *J Cell Sci*, v. 119, p. 4585-7.

- Toret, C. P., L. Lee, M. Sekiya-Kawasaki, and D. G. Drubin, 2008, Multiple pathways regulate endocytic coat disassembly in *Saccharomyces cerevisiae* for optimal downstream trafficking: *Traffic*, v. 9, p. 848-59.
- Torres, E., and M. K. Rosen, 2003, Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP: *Mol Cell*, v. 11, p. 1215-27.
- Toshima, J., J. Y. Toshima, A. C. Martin, and D. G. Drubin, 2005, Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis: *Nat Cell Biol*, v. 7, p. 246-54.
- Toshima, J. Y., J. Toshima, M. Kaksonen, A. C. Martin, D. S. King, and D. G. Drubin, 2006, Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 5793-8.
- Urbanowski, J. L., and R. C. Piper, 2001, Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole: *Traffic*, v. 2, p. 622-30.
- Urano, T., J. Liu, P. Zhang, Y. Fan, C. Egile, R. Li, S. C. Mueller, and X. Zhan, 2001, Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin: *Nat Cell Biol*, v. 3, p. 259-66.
- van den Ent, F., L. A. Amos, and J. Lowe, 2001, Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton: *Nature*, v. 413, p. 39-44.
- Wada, Y., Y. Ohsumi, and Y. Anraku, 1992, Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of two classes of vam mutants: *J Biol Chem*, v. 267, p. 18665-70.
- Walther, T. C., J. H. Brickner, P. S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja, and P. Walter, 2006, Eisosomes mark static sites of endocytosis: *Nature*, v. 439, p. 998-1003.
- Wang, G., J. M. McCaffery, B. Wendland, S. Dupre, R. Haguener-Tsapis, and J. M. Huibregtse, 2001, Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway: *Mol Cell Biol*, v. 21, p. 3564-75.
- Wang, H. R., A. A. Ogunjimi, Y. Zhang, B. Ozdamar, R. Bose, and J. L. Wrana, 2006, Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase: *Methods Enzymol*, v. 406, p. 437-47.
- Wasiak, S., V. Legendre-Guillemain, R. Puertollano, F. Blondeau, M. Girard, E. de Heuvel, D. Boismenu, A. W. Bell, J. S. Bonifacino, and P. S. McPherson, 2002, Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics: *J Cell Biol*, v. 158, p. 855-62.
- Weaver, A. M., J. E. Heuser, A. V. Karginov, W. L. Lee, J. T. Parsons, and J. A. Cooper, 2002, Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex: *Curr Biol*, v. 12, p. 1270-8.
- Weaver, A. M., A. V. Karginov, A. W. Kinley, S. A. Weed, Y. Li, J. T. Parsons, and J. A. Cooper, 2001, Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation: *Curr Biol*, v. 11, p. 370-4.
- Wegner, A., and G. Isenberg, 1983, 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, p. 4922-5.
- Weisman, L. S., 2006, Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 243-52.
- Weisman, L. S., S. D. Emr, and W. T. Wickner, 1990, Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that block intervacuole vesicular traffic and vacuole division and segregation: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 1076-80.

- Welch, M. D., A. H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison, 1997b, The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly: *J Cell Biol*, v. 138, p. 375-84.
- Welch, M. D., A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison, 1997a, Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*: *Nature*, v. 385, p. 265-9.
- Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison, 1998, Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation: *Science*, v. 281, p. 105-8.
- Wendland, B., 2002, Epsins: adaptors in endocytosis?: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 971-7.
- Wendland, B., and S. D. Emr, 1998, Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis: *J Cell Biol*, v. 141, p. 71-84.
- Wendland, B., K. E. Steece, and S. D. Emr, 1999, Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis: *Embo J*, v. 18, p. 4383-93.
- Wennerberg, K., and C. J. Der, 2004, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it): *J Cell Sci*, v. 117, p. 1301-12.
- Whitley, P., B. J. Reaves, M. Hashimoto, A. M. Riley, B. V. Potter, and G. D. Holman, 2003, Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization: *J Biol Chem*, v. 278, p. 38786-95.
- Wild, A. C., J. W. Yu, M. A. Lemmon, and K. J. Blumer, 2004, The p21-activated protein kinase-related kinase Cla4 is a coincidence detector of signaling by Cdc42 and phosphatidylinositol 4-phosphate: *J Biol Chem*, v. 279, p. 17101-10.
- Wilkinson, K. D., 1997, Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes: *Faseb J*, v. 11, p. 1245-56.
- Williams, R. L., and S. Urbe, 2007, The emerging shape of the ESCRT machinery: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, p. 355-68.
- Winter, D., T. Lechler, and R. Li, 1999a, Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein: *Curr Biol*, v. 9, p. 501-4.
- Winter, D., A. V. Podtelejnikov, M. Mann, and R. Li, 1997, The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches: *Curr Biol*, v. 7, p. 519-29.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz, and J. H. Hurley, 2009, Membrane scission by the ESCRT-III complex: *Nature*, v. 458, p. 172-7.
- Wurmser, A. E., T. K. Sato, and S. D. Emr, 2000, New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion: *J Cell Biol*, v. 151, p. 551-62.
- Xiao, J., H. Xia, J. Zhou, I. F. Azmi, B. A. Davies, D. J. Katzmann, and Z. Xu, 2008, Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway: *Dev Cell*, v. 14, p. 37-49.
- Yamamoto, A., D. B. DeWald, I. V. Boronenkov, R. A. Anderson, S. D. Emr, and D. Koshland, 1995a, Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast: *Mol Biol Cell*, v. 6, p. 525-39.
- Yamamoto, K., S. Ebina, H. Nakanishi, and N. Nakahata, 1995b, Thromboxane A2 receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells: *Gen Pharmacol*, v. 26, p. 1489-98.
- Yang, H. C., and L. A. Pon, 2002, Actin cable dynamics in budding yeast: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 751-6.

- Yeo, S. C., L. Xu, J. Ren, V. J. Boulton, M. D. Wagle, C. Liu, G. Ren, P. Wong, R. Zahn, P. Sasajala, H. Yang, R. C. Piper, and A. L. Munn, 2003, Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Sci*, v. 116, p. 3957-70.
- Yeung, B. G., H. L. Phan, and G. S. Payne, 1999, Adaptor complex-independent clathrin function in yeast: *Mol Biol Cell*, v. 10, p. 3643-59.
- Yoon, Y., J. Tong, P. J. Lee, A. Albanese, N. Bhardwaj, M. Kallberg, M. A. Digman, H. Lu, E. Gratton, Y. K. Shin, and W. Cho, 2009, Molecular basis of the potent membrane remodeling activity of the epsin1 ENTH domain: *J Biol Chem*.
- Yorikawa, C., H. Shibata, S. Waguri, K. Hatta, M. Horii, K. Katoh, T. Kobayashi, Y. Uchiyama, and M. Maki, 2005, Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting: *Biochem J*, v. 387, p. 17-26.
- Young, M. E., J. A. Cooper, and P. C. Bridgman, 2004, Yeast actin patches are networks of branched actin filaments: *J Cell Biol*, v. 166, p. 629-35.
- Zallen, J. A., Y. Cohen, A. M. Hudson, L. Cooley, E. Wieschaus, and E. D. Schejter, 2002, SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*: *J Cell Biol*, v. 156, p. 689-701.
- Zamborlini, A., Y. Usami, S. R. Radoshitzky, E. Popova, G. Palu, and H. Gottlinger, 2006, Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 19140-5.
- Zarrinpar, A., and W. A. Lim, 2000, Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition: *Nat Struct Biol*, v. 7, p. 611-3.
- Zeng, G., X. Yu, and M. Cai, 2001, Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p: *Mol Biol Cell*, v. 12, p. 3759-72.